

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



TESIS DOCTORAL

PARATUBERCULOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL

Bovine paratuberculosis: evaluation of diagnosis techniques and control

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad de Córdoba

D. Francisco Luis Jurado Martos

Directores

Dra. Carmen Tarradas Iglesias

Dra. Inmaculada Luque Moreno

Dr. Fernando Cardoso Toset

Departamento de Sanidad Animal



Córdoba, 10 de Julio de

TITULO: *PARATUBERCULOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE
DIAGNOSTICO Y CONTROL*

AUTOR: *Francisco Luis Jurado Martos*

© Edita: UCOPress. 2023
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

**INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS**Este documento se presentará junto con el depósito de la tesis en <https://moodle.uco.es/ctp3/>**DOCTORANDA/O**

FRANCISCO LUIS JURADO MARTOS

TÍTULO DE LA TESIS:

PARATUBERCULOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y CONTROL

INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS**(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)**

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral constituye un ejemplo de investigación colaborativa que surge de la cooperación entre el mundo académico y empresarial, y por ello se solicita la mención de doctorado industrial. El proyecto ha contado con la participación de la Universidad de Córdoba, representada por el grupo de investigación PAIDI AGR-256 "Sanidad Animal: diagnóstico y control de enfermedades", y el grupo PAIDI AGR-263 "Investigación Agroalimentaria", del Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de Los Pedroches (CICAP), un centro tecnológico dotado de un Departamento de I+D+i y laboratorios agroalimentarios, gracias al convenio de colaboración firmado entre la UCO y el CICAP.

El doctorando, D. Francisco Luis Jurado Martos, licenciado en Veterinaria, ha desarrollado su trabajo de investigación en el laboratorio de diagnóstico de sanidad animal del CICAP, donde ejerce su actividad profesional durante sus estudios de doctorado en el programa de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Córdoba. Este estudio ha sido financiado en parte por el proyecto concedido al Grupo Operativo autónomo "InnoTuber: nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía". En este proyecto se han estudiado nuevas técnicas de diagnóstico de la tuberculosis bovina y de la paratuberculosis bovina, que nos ha permitido realizar el muestreo y análisis de parte de las muestras utilizadas en los estudios de esta Tesis Doctoral.

Los trabajos realizados han permitido validar técnicas de diagnóstico rápidas para la detección de animales infectados en vivo, mediante qPCR-fecal y ELISA, y la confirmación en matadero con la técnica qPCR-tejido intestinal (válvula ileocecal y nódulos linfáticos ileocecales) así como interpretar los resultados de acuerdo a la prevalencia de paratuberculosis en la zona de estudio y el estatus de tuberculosis de los animales. Asimismo, esta tesis doctoral aporta información de gran interés para abordar el control de la enfermedad de acuerdo a los factores de riesgo identificados en explotaciones de ganado bovino lechero en Andalucía. Consideramos que la aplicación de estas técnicas, así como la categorización de las explotaciones en nuestra región en función del riesgo de paratuberculosis supone un avance para el sector y cumple los objetivos propuestos inicialmente.

Fruto del trabajo desarrollado, los resultados obtenidos se han enviado para su publicación en revistas indexadas del Journal of Citation Reports, de acuerdo con los requisitos exigidos por la UCO, y se presenta uno de los artículos ya publicado en la revista Research in Veterinary Science (<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.06.007>), situada en el Q1 de la categoría de Ciencias Veterinarias. Asimismo, parte de los resultados se han presentado en distintos congresos de ámbito nacional e internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 10 de julio de 2023

Las/los directoras/es

Firmado por LUQUE MORENO INMACULADA CONCEPCION - ***2533** el día 10/07/2023 con un certificado emitido por AC FNMT Usuarios

CARDOSO TOSET FERNANDO - 30998832F
 Fdo.: _____
 Nombre y Apellidos

Digitally signed by CARDOSO TOSET FERNANDO - 30998832F
 Date: 2023.07.11 08:51:21 +02'00'

TARRADAS IGLESIAS MARIA CARMEN - 30466843P
 Firmado digitalmente por TARRADAS IGLESIAS MARIA CARMEN - 30466843P
 Fecha: 2023.07.11 09:05:59 +02'00'

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha supuesto una etapa de aprendizaje en la que he crecido personal y profesionalmente. Me gustaría expresar mi profundo agradecimiento a mis tres directores, quienes, de una forma u otra, con una paciencia inmensa, me han guiado y forjado a lo largo de este camino

Gracias a mi directora, la Dra. Carmen Tarradas, apareciste en mi vida en un momento en el que me sentía perdido, a punto de terminar la carrera, pero sin tener muy claro a qué me quería dedicar. La pasión que transmitías en clase, tu forma de enseñar y, en definitiva, tu profesionalidad, me cautivaron e inspiraron. Me abriste las puertas del maravilloso mundo de la sanidad animal y me hiciste creer en esta profesión. Gracias a ti, encontré el camino que tanto buscaba. Después de haber sido tu alumno, de haber sido mi directora del trabajo fin de máster y de haber compartido esta andadura, puedo decirte que has sido uno de los pilares fundamentales en mi formación y desarrollo profesional. Gracias por darme la oportunidad de crecer junto a ti. Tu guía y apoyo han sido constantes y siempre estaré agradecido por todo lo que he aprendido a tu lado.

Gracias a mi directora, la Dra. Inmaculada Luque, no existen palabras suficientes para describir el apoyo que me has brindado a lo largo de estos años. Has sido la fuerza incansable que me ha impulsado, el viento que ha guiado mi camino, el agua que ha saciado mi sed, la pieza clave que ha unido todo. ¿Qué habría hecho yo sin ti? En esta tesis, al igual que en la vida misma, hemos enfrentado algunos desafíos. No sabes cuánta tranquilidad me ha dado tener a mi lado a una persona optimista, pero con los pies en la tierra. Eres alguien que transmite serenidad, que sabe relativizar, que no juzga y, sobre todo, que entiende que trabaja con personas. Tengo mucho que aprender de ti en todos los aspectos. Espero poder seguir trabajando juntos mientras tarareas esa canción tan tuya. Desde lo más profundo de mi corazón, te doy las gracias, Inma. Tu apoyo ha sido inmenso y valoro enormemente tu presencia en mi vida personal y profesional.

Gracias a mi director, el Dr. Fernando Cardoso, con quien he compartido mi trayectoria profesional, Desde el primer momento me has guiado y enseñado gran parte de los conocimientos y destrezas del diagnóstico. Trabajando contigo, codo con codo, es cuando más realizado me he sentido, me transmites seguridad y rigor. A lo largo de este tiempo, hemos seguido caminos laborales diferentes, lo cual me ha hecho valorarte aún más en el ámbito profesional. Quiero agradecerte el hecho de haber estado hasta el último día apoyando la dirección de esta Tesis. Ahora se abre otra nueva etapa, la cual creo que debemos de aprovechar para sumar recursos y seguir aprendiendo. Gracias por el apoyo y la comprensión.

Por otro lado, me gustaría expresar mi agradecimiento a CICAP por brindarme la oportunidad laboral y de realizar esta Tesis. Tengo la suerte de poder decir que me encanta mi trabajo, creo en CICAP y en su labor. Gracias a todos mis compañeros, los cuales han sido un apoyo y han contribuido de alguna forma u otra a la realización de esta Tesis. Asimismo, me gustaría agradecer a todos los profesores y compañeros del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Córdoba, especialmente a la Dra. Belén Huerta, con la que es un honor aprender epidemiología.

Gracias al equipo de muestreo en el matadero: Ángela, José, Inés, Eduardo, Fernanda y Pablo. Fue una etapa desafiante, con largas jornadas de trabajo, pero al mismo tiempo divertida, llena de aventuras y compañerismo. Me llevo la amistad de todos.

En lo personal, esta tesis ha representado una nueva etapa en mi vida en la que he tenido la fortuna de conocer a personas maravillosas que se han convertido en los mejores amigos que podría imaginar. Quiero expresar mi agradecimiento a mi mejor amigo y compañero, Cristian, un fuera de serie con el que comparto aventuras de emprendimiento. Es la persona más empática que conozco, con la que puedo contar para todo lo que se me ocurra. También quiero agradecer a su mujer, Clara, por su paciencia, apoyo y bondad. Ambos sois un pilar fundamental que me llevaré allá donde vaya. A mi amiga, la Dra. Ana, una investigadora con un potencial ilimitado. No tienes límites, eres capaz de lograr todo lo que te propongas. Me has enseñado mucho y me has brindado un gran apoyo. Espero que en esta nueva etapa podamos seguir creciendo juntos. A mi amiga María, quien, a pesar de su juventud, me ha inspirado con su forma de trabajar y afrontar la vida. Gracias por preocuparte y por el apoyo que me has brindado. A mi querida Sánchez, gracias por tus consejos, eres una persona increíblemente sabia y siempre estás dispuesta a brindar tu apoyo incondicional.

A mis amigos Antonio, Ana Alicia, Manuel y Elisabeth, con vosotros comenzó todo. Habéis sido mi familia desde el primer momento en Pozoblanco y hemos vivido momentos inolvidables juntos. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Antonio y Ana Alicia, ambos sois dos referentes para mí. Cuando tengo dudas, sois mis mejores consejeros y siempre he contado con vuestro apoyo. Gracias a Manuel y especialmente a Elisabeth, una persona excepcional. Debo agradecerte profundamente tu implicación en el estudio del cuestionario epidemiológico. Tienes la virtud de ser una líder y sabes hacer equipo. Te deseo lo mejor en la vida.

Todo comenzó con un grupo de cinco amigos, pero creo que no somos conscientes de lo que hemos creado. Ahora somos un maravilloso grupo de más de 30 amigos, con quienes recorreremos cada una de las ferias y fiestas de la comarca. Es genial contar con un grupo de amigos así. Muchos de ellos son compañeros veterinarios, a quienes tengo que agradecer su implicación y apoyo. Gracias a Emilio, Antonio, Inma, Sofía y Robert.

Por último, me queda agradecer a mi familia, a quienes les debo todo. Su apoyo y motivación han sido constantes a lo largo de este camino. Quiero expresar mi gratitud a mis padres, mi hermana, mi cuñado, mis tías, primos, abuelos y a los que están por venir. Somos una familia unida que celebra los logros de los demás. Por eso, este trabajo, que es un ejemplo de superación, va dedicado a vosotros y, en particular, a mis abuelos, de quienes he aprendido que la constancia es la base del éxito.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	7
Antecedentes	13
Capítulo I. Introducción	18
Capítulo II. Objetivos	43
Capítulo III. Estudios.....	47
Estudio I.....	49
RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA QPCR MULTIPLEX IS900/F57 SOBRE MUESTRAS FECALES Y TEJIDO INTESTINAL PARA LA DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> EN GANADO BOVINO.....	49
Estudio II.....	66
EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA SEROLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS EN RELACIÓN CON SU ESTADO FRENTE A LA TUBERCULOSIS.....	66
Estudio III.....	81
DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA COMO APOYO AL DIAGNÓSTICO E IMPLEMENTACIÓN DE MEDIDAS DE CONTROL DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS DE VACUNO LECHERO EN LA COMARCA DE LOS PEDROCHES ..	81
Capítulo IV. Discusión General.....	99
Capítulo V. Conclusiones	109
Capítulo VI. Bibliografía	113

Resumen

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa de los rumiantes, especialmente en el ganado vacuno lechero, que causa graves pérdidas económicas y está producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Esta Tesis Doctoral se enmarca en un proyecto de Grupos Operativos "InnoTuber: nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía", donde se han evaluado técnicas de diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina. Los objetivos planteados en este trabajo han sido evaluar herramientas de diagnóstico rápidas y eficaces que permitan la detección de animales infectados por MAP en una zona endémica de tuberculosis, y en segundo lugar realizar una propuesta de control de la enfermedad en la ganadería de vacuno de leche en Andalucía, con un enfoque práctico, que garantice la aplicabilidad de los resultados obtenidos.

El objetivo 1 ha sido abordado a través de dos trabajos de investigación a partir de un estudio epidemiológico transversal en 228 bovinos sacrificados en el matadero de los que se tomaron muestras de sangre, heces y tejidos intestinales [válvula ileocecal (VIC) y nódulos linfáticos ileocecales (NLIC)] para establecer el diagnóstico de paratuberculosis, así como muestras de nódulos linfáticos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mesentéricos para establecer el diagnóstico de TBb de los animales mediante cultivo microbiológico de estos tejidos. La técnica de referencia para determinar el estatus de infección frente a paratuberculosis fue el cultivo microbiológico en muestras de VIC y NLIC. Para la qPCR sobre muestras fecales e intestinales y para el ELISA, se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), razones de verosimilitud positiva (RVP) y negativa (RVN) y la probabilidad post-prueba en base a la prevalencia de infección.

En el trabajo se ha evaluado una qPCR múltiple, basada en la detección de la diana IS900 y el fragmento F57, sobre muestras fecales y tejido intestinal para la detección de MAP. Los resultados obtenidos muestran que el valor diagnóstico de la qPCR fecal para confirmar la infección por MAP fue moderado (S 50,3%, E 93,5%, RVP 7,8), y bajo para descartarla (RVN 0,5). En las zonas con una prevalencia de PTB superior al 23%, la credibilidad de los resultados positivos fue superior al 70%. En los resultados negativos, la credibilidad fue superior al 90% en rebaños con una tasa de infección inferior al 19%, por lo que la qPCR fecal sería muy útil en estas zonas para certificar la ausencia de infección. Para el diagnóstico *post-mortem*, la qPCR en muestras de VIC mostró una buena precisión diagnóstica para confirmar la enfermedad (S 71,7%, E 93,3%, RVP 10,8), con una credibilidad superior al 70% en animales procedentes de zonas o rebaños con una prevalencia de infección mayor o igual al 18%. La mejor estrategia para descartar la enfermedad fue la combinación en paralelo de ambos tejidos (VIC+NLIC) (SE 81,3%, ES 89,5%, RVN 0,2), con una credibilidad de los resultados negativos superior al 95% en animales procedentes de zonas con una prevalencia de infección del 0-20%.

En el segundo trabajo se ha evaluado la precisión diagnóstica y utilidad de la técnica ELISA-PTB (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) en muestras de suero, obteniendo una SE del 40,7% y una ES del 94,7% en el total de animales. Un animal positivo al ELISA-PTB tendría una probabilidad $\geq 70\%$ de estar infectado en zonas con una prevalencia de PTB $\geq 23\%$. Un resultado negativo al ELISA-PTB, en zonas con una prevalencia de PTB $\leq 41\%$, descartaría la enfermedad con más del 70% de certeza. En animales positivos a tuberculosis, la SE aumentó del 25,1%, en animales TBb negativos, al 94,4% y la ES disminuyó del 99,4% al 82,6%. La prueba ELISA-PTB es una buena herramienta para descartar la coinfección por PTB en animales positivos a TBb, mientras que en animales negativos a TB permite confirmar la enfermedad con una probabilidad $>70\%$ si la prevalencia de la enfermedad es $\geq 6\%$.

El segundo objetivo de este estudio se centró en proponer medidas de control de la paratuberculosis en vacuno lechero. Realizamos un estudio epidemiológico para determinar la seroprevalencia de la infección en el ganado vacuno lechero de la comarca de los Pedroches y se diseñó un cuestionario que permitiera clasificar a las ganaderías en base al riesgo de infección por MAP en tres niveles (nivel I, riesgo bajo; nivel II, riesgo moderado; y nivel III, riesgo elevado). El cuestionario incluye 31 factores con respuesta cerrada agrupados en tres bloques: "Características, bioseguridad e instalaciones de la ganadería", con diez factores relacionados con infraestructuras y manejo para el control de enfermedades transmisibles; "Estatus productivo y sanitario", que abarca siete factores relacionados con la PTBb; "Manejo del periparto, la recría y la reposición", que engloba 14 factores directamente relacionados con la transmisión de la enfermedad.

El cuestionario diseñado se utilizó en 41 ganaderías de la comarca en colaboración con los veterinarios responsables de las explotaciones, que permitió obtener una clasificación de las explotaciones. En términos generales se observó que el 51,2 por ciento de las ganaderías presentaron un nivel de riesgo bajo, el 26,8 por ciento un riesgo moderado, y el 22 por ciento un riesgo elevado. En base a estos resultados, se propone un programa de vigilancia y control de la paratuberculosis bovina para las ganaderías de vacuno lechero del sur de España, con el objetivo de reducir la prevalencia en explotaciones afectadas y certificar la ausencia de la enfermedad en explotaciones libres. Estas medidas se han dividido en cuatro grupos:

1. *Caracterizar el riesgo de infección por MAP a nivel de rebaño*, utilizando la encuesta diseñada y validada que permitirá categorizar el riesgo de infección por MAP en cada ganadería. En base a los resultados de la encuesta, el veterinario responsable de la explotación evaluará las prácticas de manejo llevadas a cabo durante el parto, la lactación, la adquisición de animales vivos y las medidas de bioseguridad y mantenimiento de instalaciones.

2. *Identificar animales infectados en las explotaciones*, para la detección de los animales excretores de MAP. Una vez conocido el estatus sanitario de los animales, se podrán aplicar medidas de control, dependiendo de la situación epidemiológica. Para identificar los animales excretores, recomendamos utilizar ELISA en explotaciones con presencia de animales que muestren signos clínicos, en granjas con sospecha de alta prevalencia de paratuberculosis o positivas a tuberculosis bovina. Por otro lado, recomendamos el uso de la técnica qPCR-fecal en explotaciones con bajo riesgo de paratuberculosis. Los animales que den positivo en cualquiera de estas técnicas no deberán estar en contacto con animales jóvenes o bien serán eliminados del rebaño.

3. *Establecer un sistema de vigilancia de PTB en matadero*: los animales sacrificados en matadero (desvieje, campañas de saneamiento, otras causas) serán sometidos a vigilancia utilizando la técnica qPCR-tejido intestinal para confirmar el diagnóstico en explotaciones afectadas o descartar la presencia de MAP en explotaciones aparentemente libres (utilizando muestras de VIC y NLIC). Este sistema de vigilancia aportará datos valiosos para conocer la evolución de la enfermedad en la zona y validar la eficacia de las medidas de control implementadas, además de certificar la ausencia de la enfermedad.

4. *Adoptar una guía de buenas prácticas de manejo en las distintas fases de producción*, relacionadas con la mayor probabilidad de contagio de la enfermedad, durante el parto, la lactación, la cría de novillas y la adquisición de animales vivos, además de un conjunto de medidas de bioseguridad.

Todos los resultados presentados en esta tesis doctoral suponen un avance para el control de la paratuberculosis bovina en una zona endémica de tuberculosis. Ante la falta de directrices oficiales para abordar el control de la paratuberculosis, se debe adoptar un enfoque holístico que integre diferentes estrategias y fomente la colaboración entre ganaderos, servicios veterinarios y administraciones públicas.

Summary

Paratuberculosis (PTB) is an infectious disease of ruminants, especially in dairy cattle, which causes severe economic losses and is caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). This Doctoral Thesis is part of an Operational Group project "InnoTuber: new measures and techniques for the control of bovine tuberculosis in Andalusia", where diagnostic techniques for bovine tuberculosis and paratuberculosis have been evaluated. The objectives of this work have been to evaluate rapid and effective diagnostic tools that allow the detection of MAP-infected animals in a tuberculosis endemic area, and secondly to make a proposal for the control of the disease in dairy cattle livestock in Andalusia, with a practical approach that guarantees the applicability of the results obtained.

The objective 1 has been addressed through two research studies based on a cross-sectional epidemiological study in 228 cattle slaughtered at the abattoir from which blood samples were taken, faeces and intestinal tissues [ileocaecal valve (ICV) and ileocaecal lymph nodes (ICLN)] were taken to establish the diagnosis of paratuberculosis, as well as samples of retropharyngeal, tracheobronchial and mesenteric lymph nodes to establish the diagnosis of TBb in the animals by microbiological culture of these tissues. The reference technique to determine paratuberculosis infection status was microbiological culture on ICV and ICLN samples. For qPCR on faecal and intestinal samples and for ELISA, sensitivity (Se), specificity (Sp), positive (PLR) and negative (NLR) likelihood ratios and post-test probability were calculated based on the prevalence of infection.

A multiplex qPCR, based on the detection of the IS900 target and the F57 fragment, was evaluated on faecal samples and intestinal tissue for the detection of MAP. The results obtained show that the diagnostic value of faecal qPCR to confirm MAP infection was moderate (SE 50.3%, SP 93.5%, PLR 7.8), and low to rule it out (NLR 0.5). In areas with a PTB prevalence above 23%, the credibility of positive results was above 70%. For negative results, the credibility was above 90% in herds with an infection rate below 19%, so faecal qPCR would be very useful in these areas to certify the absence of infection. For post-mortem diagnosis, qPCR on ICV samples showed good diagnostic accuracy to confirm disease (SE 71.7%, SP 93.3%, PLR 10.8), with a credibility higher than 70% in animals from areas or herds with a prevalence of infection greater than or equal to 18%. The best strategy to rule out disease was the parallel combination of both tissues (ICV+ICLN) (SE 81.3%, SP 89.5%, NLR 0.2), with a credibility of negative results higher than 95% in animals from areas with an infection prevalence of 0-20%.

In the second study, the diagnostic accuracy and usefulness of the ELISA-PTB technique (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) was evaluated in serum samples, obtaining an SE of 40.7% and an SP of 94.7% in the total number of animals. A PTBb-ELISA positive animal would have a $\geq 70\%$ probability of being infected in areas with a

PTBb prevalence $\geq 23\%$. A negative PTBb-ELISA result, in areas with a PTBb prevalence $\leq 41\%$, would rule out the disease with more than 70% certainty. In TBb-positive animals, SE increased from 25.1% in TBb-negative animals to 94.4% and SP decreased from 99.4% to 82.6%. The PTBb-ELISA is a good tool to rule out PTBb co-infection in TBb-positive animals, while in TBb-negative animals it can confirm disease with $>70\%$ probability if disease prevalence is $\geq 6\%$.

The second objective of this study focused on proposing measures to control paratuberculosis in dairy cattle. We conducted an epidemiological study to determine the seroprevalence of infection in dairy cattle in the *Comarca de los Pedroches* and a questionnaire was designed to classify farms based on the risk of infection by MAP in three levels (level I, low risk; level II, moderate risk; and level III, high risk). The questionnaire includes 31 closed-response factors grouped into three blocks: "Livestock characteristics, biosecurity and facilities", with ten factors related to infrastructure and management for the control of transmissible diseases; "Productive and sanitary status", which covers seven factors related to PTBb; "Management of peripartum, rearing and replacement", which includes 14 factors directly related to the transmission of the disease.

The questionnaire designed was used in 41 farms in collaboration with the veterinarians responsible, and a classification was obtained. In general terms, 51.2% of the farms showed a low risk level, 26.8% a moderate risk and 22% a high risk. Based on these results, a surveillance and control programme for bovine paratuberculosis is proposed for dairy cattle farms in southern Spain, with the aim of reducing the prevalence in affected farms and certifying the absence of the disease in free farms. These measures have been divided into four groups:

1. *Characterise the risk of MAP infection at herd level*, using the designed and validated survey that will allow categorising the risk of MAP infection in each herd. Based on the results of the survey, the veterinarian responsible for the farm will evaluate the management practices carried out during calving, lactation, procurement of live animals, biosecurity measures and maintenance of facilities.

2. *Identify infected animals, by detecting animals MAP-shedding in faeces animals*. Once the health status of the animals is known, control measures can be applied, ranging from avoiding contact with susceptible animals to culling of the herd, depending on the epidemiological situation. Two techniques can be used to identify excreting animals: BT-ELISA and faecal qPCR. According to the results obtained in the validation of these tests, we recommend the use of ELISA in farms with the presence of animals showing clinical signs, in farms with suspected high prevalence of paratuberculosis or positive for bovine tuberculosis. On the other hand, we recommend the use of the faecal qPCR technique on farms with a low risk of paratuberculosis. Animals testing positive to either of these

techniques should not be in contact with young animals or they should be removed from the herd.

3. *Establish a surveillance system for PTBb in slaughterhouses:* animals slaughtered in slaughterhouses (culling, sanitary campaigns, other causes) will be subjected to surveillance using the qPCR-intestinal tissue technique to confirm the diagnosis in affected farms or to rule out the presence of PTBb in apparently free farms (using ICV and ICLN samples). This surveillance system will provide valuable data to know the evolution of the disease in the area and to validate the effectiveness of the control measures implemented, as well as to certify the absence of the disease.

4. *Adopt a guide of good management practices in the different phases of production,* related to the highest probability of contagion of the disease, during calving, lactation, heifer rearing and the acquisition of live animals, in addition to a set of biosecurity measures.

The results presented in this PhD thesis represent a breakthrough for the control of bovine paratuberculosis in a tuberculosis endemic area. In the absence of official guidelines to address the control of paratuberculosis, a holistic approach should be adopted that integrates different strategies and encourages collaboration between farmers, veterinary services and public administrations.

Antecedentes

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral constituye un ejemplo de investigación colaborativa que surge de la cooperación entre el mundo académico y empresarial. El proyecto ha contado con la participación de la Universidad de Córdoba, representada por el grupo de investigación PAIDI AGR-256 “*Sanidad Animal: diagnóstico y control de enfermedades*”, y el grupo PAIDI AGR-263 “*Investigación Agroalimentaria*”, del Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de Los Pedroches (CICAP), un centro tecnológico dotado de un Departamento de I+D+i y un laboratorio agroalimentario.

CICAP se encuentra ubicado estratégicamente en la Comarca de los Pedroches, una zona situada al norte de la provincia de Córdoba, reconocida por su importante actividad ganadera. El centro cuenta con las infraestructuras necesarias para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, convirtiéndolo así en un referente en materia de sanidad animal a nivel comarcal como autonómico. Su reputación se ve respaldada por la participación en numerosas convocatorias competitivas de proyectos de I+D+i nacionales y regionales, donde desempeña un papel fundamental en la transferencia del conocimiento, promoviendo la creación de sinergias entre la Universidad y la Empresa e impulsando al avance científico y tecnológico de la zona.

Ambos grupos de investigación han trabajado previamente en el desarrollo de proyectos de I+D+i en el ámbito de la sanidad animal y la seguridad alimentaria. Algunos se pueden relacionar con el tema de esta Tesis Doctoral como son “*BIODHESA: impacto y medidas de control de la linfadenitis del cerdo ibérico en la dehesa*”¹ y “*Linfadenitis caseosa en ganado porcino en extensivo: desarrollo y evaluación de herramientas diagnósticas rápidas*”², cuyos resultados han puesto de manifiesto la importancia de la linfadenitis en los animales criados en la dehesa y el impacto causado por la infección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) en el cerdo ibérico (Cardoso-Toset, Gómez-Laguna, et al., 2015; Cardoso-Toset, Luque, et al., 2015). Por otro lado, en el proyecto “*CAPRITEC: tecnologías para la optimización de la sanidad animal, producción y productos de leche de cabra en Andalucía*”³, donde se investigó, entre otros temas, la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP) en la cabaña ganadera de caprino de Andalucía (Barrero-Domínguez et al., 2019).

¹ Proyecto financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) (referencia: IDI-20111633).

² Proyecto financiado por la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (referencia: AGR-2685).

³ Proyecto subvencionado por el Programa FEDER-INTERCONECTA y cofinanciado por CDTI (referencia: ITC-20131070).

En línea con el estudio de enfermedades causadas por micobacterias, colaboramos en los trabajos del Grupo Operativo autonómico "*InnoTuber: nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía*"⁴. En este proyecto se han estudiado nuevas técnicas de diagnóstico de la tuberculosis bovina, así como las posibles interferencias con otras enfermedades causadas por micobacterias como la paratuberculosis bovina, causada por MAP (Sánchez-Carvajal et al., 2021). Esto ha permitido llevar a cabo el muestreo y análisis de una parte de las muestras utilizadas en los estudios de esta Tesis Doctoral, que se han centrado en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina.

El conocimiento previo adquirido por ambos grupos de investigación ha revelado que las enfermedades causadas por micobacterias siguen presentando un desafío para la cabaña ganadera en Andalucía. Hasta el momento, el control de la paratuberculosis bovina no se ha abordado en la región, lo cual es preocupante debido al posible impacto significativo que esta enfermedad podría tener en la cabaña ganadera, especialmente en el ganado vacuno lechero. Es por ello, que, ante las exigencias de los mercados internacionales para la exportación de animales vivos y productos derivados, las perspectivas de futuro sobre la intensificación de los sistemas productivos y la idiosincrasia de los sistemas ganaderos andaluces, sea necesario aportar al sector herramientas para abordar el control de la paratuberculosis bovina.

En base a estos antecedentes, esta Tesis Doctoral profundiza en el diagnóstico de la paratuberculosis bovina, evaluando herramientas de diagnóstico rápidas y eficaces que permitan la detección de animales infectados en una zona endémica de tuberculosis, así como propuestas de control de la enfermedad en la ganadería de vacuno de leche en Andalucía, con un enfoque práctico que garantice la aplicabilidad de los resultados obtenidos. Los resultados y hallazgos logrados nos permitirán conocer mejor los aspectos clave de la paratuberculosis bovina y su repercusión en el ganado vacuno en general, desarrollando estrategias de control más efectivas y adaptadas a las necesidades específicas de cada región, mejorando su rentabilidad y contribuyendo a fortalecer la visión y el desarrollo del sector ganadero en su conjunto.

⁴ Proyecto subvencionado con fondos FEADER y por la Junta de Andalucía a través de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible (referencia: GOP2I-CO-16-0010GOP2I-CO-16-0010-SUBP).

Capítulo I. Introducción

Introducción

Aproximación al sector vacuno

El sector bovino, tanto en su aptitud cárnica como lechera, ha desempeñado un papel fundamental en la ganadería nacional a lo largo de la historia. Desde los primeros tiempos de la humanidad, hemos aprovechado la capacidad del ganado bovino para utilizar recursos derivados de los pastos, lo cual nos ha permitido obtener carne, leche, cuero y utilizar su fuerza de trabajo (MAPA, 2019). Es importante destacar que tanto la producción cárnica como la lechera presentan características distintivas que requieren enfoques y sistemas de producción específicos. En el caso de la producción cárnica, el objetivo principal es criar y engordar al ganado bovino para obtener carne de alta calidad. Por otro lado, la producción lechera se enfoca en la obtención de leche de calidad para consumo humano y otros productos lácteos.

En cuanto al sector de vacuno cárnico, la Unión Europea (UE) se sitúa como el tercer productor mundial de carne de vacuno, después de América y Asia. En el año 2021, la UE-27⁵ produjo 6,8 millones de toneladas de carne, lo que representa el 18,3 por ciento de la producción global (FAOSTAT, 2023). En España, el sector de vacuno cárnico actualmente constituye el 16,5 por ciento de la producción final ganadera del país, posicionándose como el tercer sector más importante en términos económicos, por detrás del sector porcino y el sector lácteo (MAPA, 2022). Esta producción ganadera se sostiene sobre dos grandes actividades complementarias, la cría y manejo de vacas nodrizas y la cría y engorde de terneros. En el año 2021, se contabilizaban un total de 144.540 explotaciones, con un censo de 6 millones de cabezas, concentradas en cuatro comunidades autónomas, Castilla y León, Galicia, Extremadura y Cataluña (MAPA, 2022). Andalucía, representa el 11 por ciento de la cabaña ganadera de vacas nodrizas de España y el 8,5 por ciento del censo total de vacuno de carne, siendo la quinta comunidad en importancia. El vacuno cárnico es producido en Andalucía bajo régimen extensivo, aprovechando la existencia de más de 1,2 millones de hectáreas de dehesa, un ecosistema mediterráneo único, predominante en el suroeste de España. Es relevante destacar que, en el desglose por provincias, Córdoba alberga el mayor número de explotaciones y censo de este tipo de ganaderías, siendo la comarca de Los Pedroches (Córdoba) responsable del 19,6 por ciento del total de Andalucía (SGAGyA, 2021) (*Figura 1*).

⁵ **UE-27:** este término hace referencia a los 27 Estados miembro que constituyen la Unión Europea tras la salida de Reino Unido en febrero de 2020. (Alemania, Bélgica, Croacia, Dinamarca, España, Francia, Irlanda, Letonia, Luxemburgo, Países Bajos, Suecia, Bulgaria, Eslovaquia, Estonia, Grecia, Malta, Polonia, República Checa, Austria, Chipre, Eslovenia, Finlandia, Hungría, Italia, Lituania, Portugal y Rumanía).

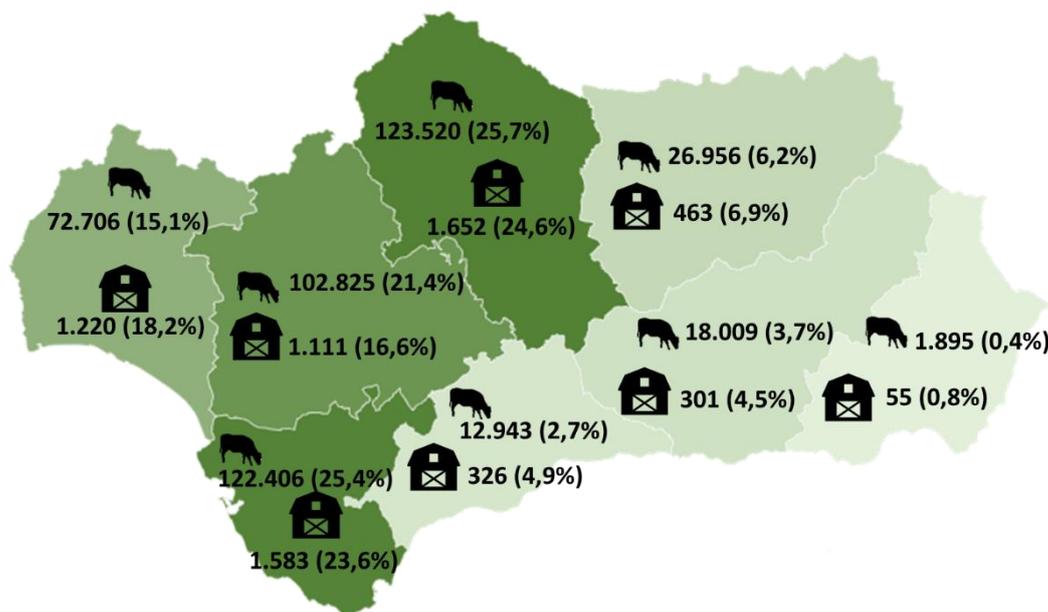


Figura 1. Distribución del censo de vacas nodrizas de carne y explotaciones de vacuno de cárnico en Andalucía. Fuente: SGAGyA, 2021; elaboración propia.

En relación al sector vacuno lechero, la UE-27 es reconocida como una importante productora de leche y productos lácteos, siendo el alimento más producido en su territorio (FAOSTAT, 2023). En 2021, la UE-27 produjo 143,83 millones de toneladas de leche, que supone el 19,3 por ciento de la producción mundial (FAOSTAT, 2023; SGPGyC y DGPYMA, 2022), siendo considerada la mayor exportadora de leche y productos lácteos del mundo (SGACE, 2022). Dentro de Europa, España se encuentra en la séptima posición, con una producción total de 7,49 millones de toneladas, lo que representa el 5 por ciento de la producción total de la UE-27 (SGPGyC & DGPYMA, 2022a). Por otro lado, Andalucía alberga el 7,5 por ciento del censo nacional de ganado vacuno lechero, situándose como la sexta comunidad autónoma en términos de censo y la quinta en importancia productiva. Todas las explotaciones de vacuno de leche en Andalucía son de tipo intensivo, con una media de animales por explotación superior a la nacional y europea. Al igual que en el sector de vacuno de carne, la provincia de Córdoba destaca como la más relevante, concentrando el 64,7 por ciento del censo de ganado vacuno lechero en Andalucía y el 64,1 por ciento en número de ganaderías. De manera específica, la comarca de Los Pedroches representa el 60 por ciento del censo bovino lechero de toda Andalucía, e este (SGAGyA, 2021) (Figura 2).

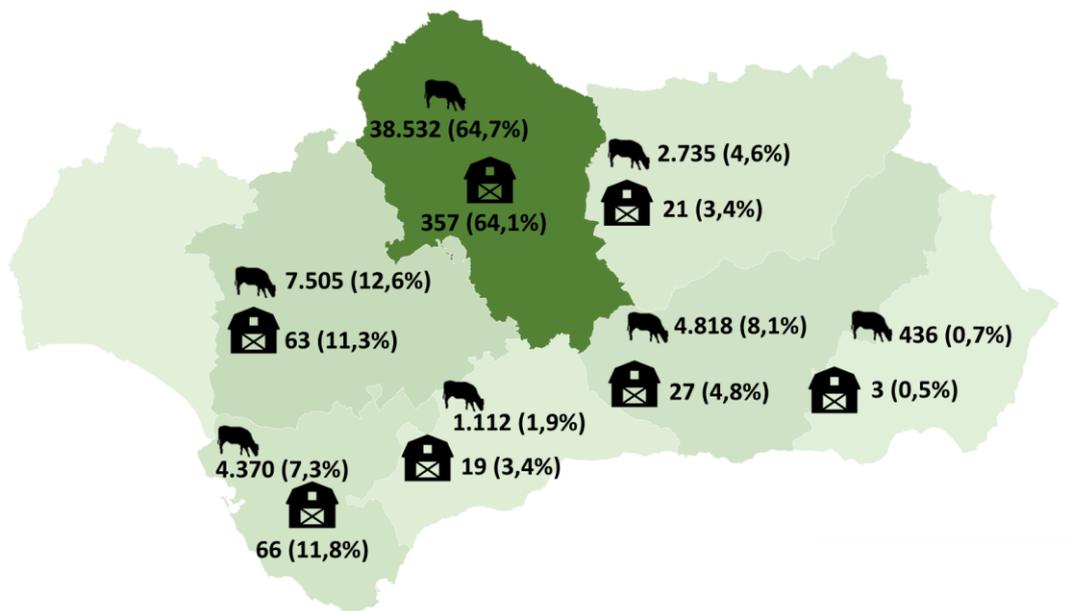


Figura 2. Distribución del censo de vacas de leche mayores de 24 meses y explotaciones de vacuno lechero en Andalucía. Fuente: SGAGyA, 2021; elaboración propia.

En términos generales, tanto el sector vacuno cárnico como el lechero representan una actividad ganadera estratégica y de gran importancia desde diferentes perspectivas, ya sea económica, social o medioambiental (MAPA, 2022; SGPGyC & DGPyMA, 2022a). Sin embargo, ambos sectores enfrentan desafíos significativos, especialmente en relación con la adaptación al cambio climático. En este sentido, en mayo de 2020, la Comisión Europea presentó el Pacto Verde Europeo (*European Green Deal*) (European Commission, 2020), un acuerdo que tiene como objetivo reducir la huella medioambiental y climática del sistema alimentario de la Unión Europea y que regirá las perspectivas de futuro del sector ganadero.

Como resultado, se espera una disminución continua en el número de animales y explotaciones (INLAC, 2022; MAPA, 2022). Se prevé que las explotaciones con un menor número de animales tenderán a desaparecer, dando lugar al predominio de explotaciones más grandes y tecnificadas, especialmente en el sector de vacuno lechero. Sin embargo, el número de animales por granja estará limitado por las políticas del Pacto Verde, con su objetivo de alcanzar el 25% de producción ecológica en 2050 (INLAC, 2022).

A pesar de la disminución de unidades productoras, se pronostica un aumento progresivo tanto en la producción de carne de vacuno como en la producción de leche. Todos los esfuerzos se centrarán en mejorar el rendimiento productivo de los animales bajo la estrategia de «producir más con menos» (INLAC, 2022). En este contexto, la sanidad animal desempeñará un papel decisivo, ya que las producciones ganaderas

pueden verse afectadas por enfermedades infecciosas que causan grandes pérdidas económicas y perjuicios para la salud y el bienestar animal, además del riesgo que representan estas enfermedades para la salud pública debido a su capacidad de transmitirse al ser humano, ya sea de forma directa o indirecta (Raszek et al., 2016).

Por este motivo, las autoridades competentes en materia de sanidad animal aplican diferentes programas de vigilancia, control y erradicación de enfermedades con los que se pretende garantizar un nivel elevado de sanidad animal y salud pública para fomentar la mejora de la productividad del sector ganadero y contribuir a la sostenibilidad económica (Tribunal De Cuentas Europeo, 2016). La normativa de Sanidad Animal, incluida en el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016⁶, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales, establece normas para la prevención y el control de las enfermedades de los animales transmisibles, incluidas las zoonosis. Este reglamento, base de la nueva legislación de sanidad animal en la Unión Europea, se desarrolla mediante diferentes reglamentos derivados, que establecen la clasificación de las enfermedades por categorías (Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018⁷).

Entre las enfermedades infecciosas que pueden afectar al ganado bovino, España es un país libre de algunas, como la leucosis bovina enzoótica, dermatosis nodular contagiosa, fiebre aftosa, peste bovina, perineumonía contagiosa bovina, fiebre del Valle del Rift y fiebre hemorrágica del Congo-Crimea. En el año 2021, nuestro país fue declarado oficialmente libre de brucelosis, tanto en bovino como en pequeños rumiantes, lo que supone un éxito de los programas de lucha llevados a cabo desde la década de los noventa (López, 2021). Sin embargo, otras enfermedades como la lengua azul, tuberculosis bovina, rinotraqueítis infecciosa bovina o encefalopatía esponjiforme bovina, entre otras, están actualmente sujetas a medidas de vigilancia, control y erradicación en todo el territorio nacional (MAPA, 2023).

De todas las enfermedades incluidas en planes de control, la tuberculosis bovina resulta de especial interés, por el impacto económico y sanitario para el ganado bovino, pero también por su implicación zoonótica. Esta enfermedad, producida por micobacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) está sometida

⁶ Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex%3A32016R0429> (Acceso 14 mayo 2023)

⁷ Reglamento de ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión de 3 de diciembre de 2018 relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1882> (Acceso 14 mayo 2023)

a un programa nacional de erradicación desde el año 1996, y según los datos publicados, en el año 2022 se obtuvieron valores de prevalencia de rebaños del 1,4 por ciento, con una incidencia de rebaños del 0,8 por ciento y del 0,3 por ciento en animales (DGSPA, 2022). No obstante, la situación no es homogénea en todo el territorio, ya que Asturias, Canarias, Galicia y País Vasco se consideran zonas libres, mientras que, en ciertas comunidades autónomas, entre ellas Andalucía, Castilla La Mancha, Extremadura, o La Rioja, presentan datos de prevalencia de rebaño superiores al 4 por ciento.

En Andalucía, la prevalencia de la enfermedad a nivel de rebaño se mantiene por encima del 6% desde 2014 (DGSPA, 2022). Hay que tener en cuenta que la tuberculosis es una enfermedad compleja y persistente, y que su erradicación puede estar influenciada por diversos factores, como el estrecho contacto con la fauna silvestre, el estado inmunológico de los animales y la coinfección con otras micobacterias (Morales et al., 2020).

En este contexto, tanto la tuberculosis como la paratuberculosis, causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), son enfermedades crónicas producidas por micobacterias que tienen un largo período de incubación. Además, comparten similitudes en su mecanismo de acción patógena (Raffo et al., 2020). Varios estudios han demostrado que la coinfección con CMT y MAP, puede influir en la respuesta inmunológica y, por lo tanto, interferir en las pruebas de diagnóstico utilizadas para detectar animales positivos a tuberculosis y paratuberculosis (Julio Álvarez et al., 2009; Raffo et al., 2020). Por lo tanto, es importante tener en cuenta la situación de ambas enfermedades antes de implementar un programa de control basado en el diagnóstico.

A pesar de su importancia, la paratuberculosis bovina no está sujeta a control oficial. Sin embargo, se considera una enfermedad de declaración obligatoria para la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) y en España se encuentra incluida en la «Categoría E» de las enfermedades sometidas a vigilancia según el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión, de 3 de diciembre de 2018.

Paratuberculosis

La paratuberculosis, producida por MAP, también conocida como Enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa crónica e incurable que origina una enteritis granulomatosa progresiva que afecta fundamentalmente a rumiantes domésticos y silvestres (Salem et al., 2012; R. Whittington et al., 2019). La infección también ha sido descrita en otras especies no rumiantes como conejos y cerdos, que pueden actuar como reservorios de la enfermedad (Daniels et al., 2003; Miranda et al., 2011). Debido a su carácter crónico, la mayoría de los casos son subclínicos y solo un grupo reducido de animales desarrolla síntomas como debilitamiento irreversible, diarrea crónica, pérdida de peso y, finalmente, la muerte. Tanto los animales clínicamente enfermos como los

asintomáticos son la principal fuente de infección a través de la eliminación del agente patógeno en las heces (McAloon et al., 2019a; S. S. Nielsen & Toft, 2008).

La historia de la paratuberculosis se remonta a finales del siglo XIX, cuando se describió por primera vez la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en el intestino de vacas con diarrea (Johne & Frothingham, 1895). Durante los siguientes 25 años, la enfermedad se notificó en Europa y América (Lienuax & van den Eeckhout, 1906; McFadyean, 1906; Pearson, 1908), y fue en este período cuando se identificó su agente etiológico (Twort & Ingram, 1912). Inicialmente se denominó *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johnei*, pero posteriormente recibió los nombres de *Bacterium paratuberculosis* (Bergey et al., 1923), *Bacillus paratuberculosis* (Krasil'nikov, 1941), *Mycobacterium johnei* (Francis, 1943) y finalmente se estableció el nombre con el que se reconoce actualmente (M. F. Thorel et al., 1990). Se trata de una enfermedad de distribución mundial y se considera de gran importancia debido a su impacto en el bienestar y la salud animal, la economía y la salud pública (R. Whittington et al., 2019).

Aunque resulta difícil cuantificar el impacto económico exacto de la paratuberculosis en el ganado vacuno, esta enfermedad se considera una de las más devastadoras para la industria láctea a nivel mundial (Mallikarjunappa et al., 2021). La infección por MAP compromete el sistema inmunológico de los animales afectados, lo que aumenta su susceptibilidad a otras infecciones (Raizman et al., 2007). Estudios previos han demostrado un aumento en la incidencia de mastitis clínica en vacas infectadas con MAP (Pritchard et al., 2017; Rossi et al., 2017a) e incremento en el recuento de células somáticas (K. Donat et al., 2014; Machado et al., 2018; Martins et al., 2018; Pritchard et al., 2017). Además, se ha observado una reducción en la fertilidad de las vacas infectadas (García-Ispuerto & López-Gatius, 2016; Ozsvári et al., 2020). Asimismo, la paratuberculosis bovina también se asocia con otras pérdidas productivas directas, como la disminución en la producción y calidad de la leche (Machado et al., 2018; Martins et al., 2018; Ozsvári et al., 2020; Pritchard et al., 2017; Wiszniewska-Łaszczych et al., 2020), un aumento en la tasa de mortalidad y sacrificio, la merma en el rendimiento de la canal y los gastos relacionados con las pruebas de diagnóstico y tratamiento (García & Shalloo, 2015; Kudahl & Nielsen, 2009; Ozsvári et al., 2020; Raizman et al., 2007; Richardson & More, 2009).

Desde el punto de vista sanitario, es una enfermedad muy similar a la enfermedad de Crohn en el hombre: se trata de una enteritis granulomatosa que comparte signos de localización intestinal, tipo de lesiones y manifestaciones clínicas con la paratuberculosis bovina (McNees et al., 2015; Sechi & Dow, 2015). Aunque no existen evidencias que demuestren el papel de MAP en la enfermedad de Crohn u otras enfermedades

autoinmunes, su potencial zoonótico no puede ser ignorado (Waddell et al., 2016), especialmente cuando se ha detectado la presencia de esta micobacteria viable en leche pasteurizada y en fórmulas infantiles, como leche en polvo (Botsaris et al., 2016; Gill et al., 2011). Sin embargo, las autoridades internacionales no establecen directrices oficiales para su control debido a la falta de evidencias científicas que confirmen de manera definitiva el carácter zoonótico de la enfermedad (Mallikarjunappa et al., 2021).

El género *Mycobacterium* se empleó en 1896 para designar a las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Lehman & Neumann, 1896). Actualmente, gracias a los avances en biología molecular y genética bacteriana, se ha logrado clasificar un total de 266 especies, las cuales están registradas en la lista de nombres procariontes con base en la nomenclatura [*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*, (LPSN, 2023) (Parte et al., 2020)]. Desde una perspectiva taxonómica, las micobacterias se incluyen en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae* y género *Mycobacterium* (Shinnick & Good, 1994). Este género es el único presente en la familia *Mycobacteriaceae* y abarca especies patógenas clave como *Mycobacterium avium*, *M. bovis*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*.

Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilos pleomórficos rectos o ligeramente curvados, con dimensiones que oscilan entre 0,2 y 0,6 μm de ancho, y de 1,0 a 10 μm de largo. En ocasiones, pueden presentar formas ramificadas, filamentosas o similares a micelios, que tienen la capacidad de fragmentarse en elementos bacilares o cocoides. Estas bacterias son aerobias, inmóviles y no forman esporas. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 30 °C y 45 °C (García-Martos & García-Agudo, 2012; Shinnick & Good, 1994).

Son bacterias Gram positivas, aunque no se tiñen fácilmente con los colorantes anilínicos habituales debido a la elevada composición de lípidos de la pared celular (40%), por ello, se emplean para su tinción otros colorantes, como la tinción de Ziehl-Neelsen, y se tiñen con la fucsina básica fenicada, apareciendo en las preparaciones con un color rosa intenso (Reynolds et al., 2009). La pared celular de las micobacterias presenta una estructura distintiva, compuesta por una capa interna y una capa externa que rodean a la membrana citoplasmática. La capa externa está formada por lípidos y proteínas, los cuales se asocian a la capa interna de la pared celular mediante ácidos grasos de cadena corta y larga. Entre los lipopolisacáridos presentes en esta capa, se encuentran el lipoarabinomanano (LAM), el lipomanano y diversos lípidos tiocerol (Hett & Rubin, 2008). El LAM es el principal componente antigénico de superficie de las micobacterias, atraviesa toda la pared celular y su composición difiere entre las diferentes especies del género (Nigou et al., 2003). Estas proteínas y lípidos externos son componentes solubles

de la pared celular y desempeñan una función esencial en la interacción entre las micobacterias y el sistema inmunológico del huésped (Brennan, 2003).

En la práctica y en el ámbito científico, se han utilizado varios criterios para clasificar las especies de este género, siendo uno de los más empleados su velocidad de crecimiento en medios de cultivo sólido, pudiéndose distinguir micobacterias de crecimiento rápido (aquellas que dan lugar a colonias visibles en menos de 7 días) y micobacterias de crecimiento lento (que tardan más de 7 días en producir colonias visibles). Dentro de estas últimas se incluyen las micobacterias de mayor importancia en medicina humana y veterinaria, las llamadas micobacterias tuberculosas que forman parte del CMT (Figura 3) y las micobacterias atípicas no tuberculosas, entre las que se encuentran las especies del complejo *Mycobacterium avium* (CMA) (Levy-Frebault & Portaels, 1992).

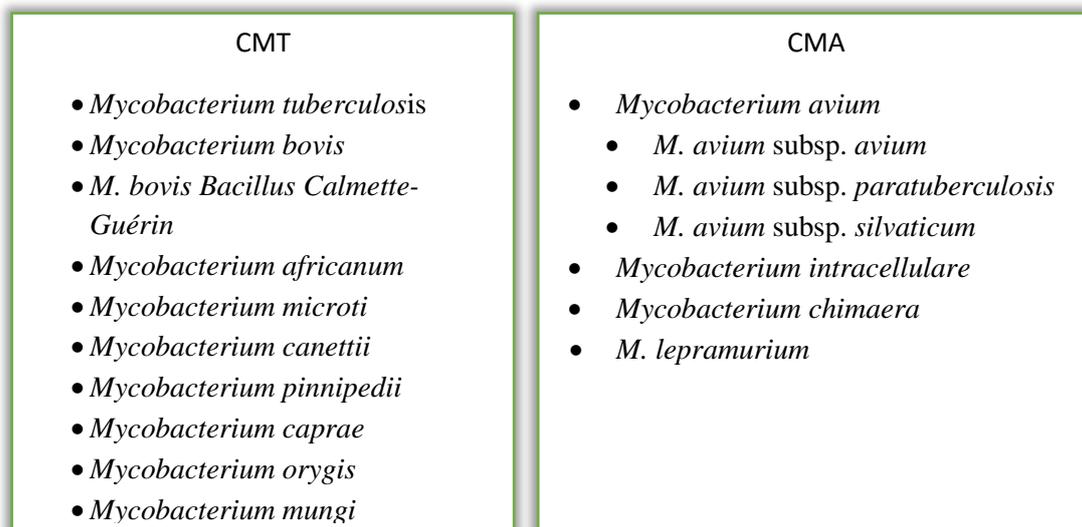


Figura 3. Diagrama simplificado con las principales especies que albergan el CMT y el CMA. elaboración propia.

El CMA comprende varias especies de micobacterias de crecimiento lento que se encuentran principalmente en entornos medioambientales, veterinarios y clínicos (Eslami et al., 2019; Falkinham, 2002; M. Thorel et al., 1997). Hasta la fecha, se han identificado doce especies dentro del CMA mediante métodos de taxonomía molecular: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. marseillense*, *M. timonense*, *M. bouchedurhonense*, *M. yongonense*, *M. paraintracellulare* y *M. lepramurium* (Stevenson & Kapur, 2020). Todas estas especies muestran un alto grado de conservación en los genes del ARN ribosómico (16S, 23S y 5S) (Rogall et al., 1990; Van der Giessen et al., 1994), lo que dificulta su diferenciación a nivel de especie. De

hecho, debido a su homología, se han propuesto que *M. yongonense* y *M. chimaera* se consideren subespecies de *M. intracellulare* para simplificar su clasificación (Castejon et al., 2018; Nouioui et al., 2018). La especie más relevante en veterinaria es *M. avium*, la cual se divide a su vez en tres subespecies en función de sus características bioquímicas, como son *M. avium* subesp. *avium* (*agente causal de la tuberculosis aviar*), *M. avium* subesp. *silvaticum* y MAP (Van Ingen et al., 2018). Es importante mencionar que se ha descrito una subespecie adicional, *M. avium* subesp. *hominissuis*, la cual tiene como objetivo distinguir las cepas de *M. avium* aisladas en humanos y cerdos. Sin embargo, esta subespecie no ha sido oficialmente validada (Stevenson & Kapur, 2020).

El agente causante de la paratuberculosis, MAP, es un pequeño bacilo Gram positivo, ácido-alcohol resistente, aerobio e inmóvil, con dimensiones aproximadas de 1-2 µm de longitud y hasta 0,5 µm de ancho (Fernandez, 2017; Harris & Barletta, 2001; Manning & Collins, 2001). Forma colonias rugosas no pigmentadas y se caracteriza por su crecimiento lento, que puede requerir un período medio de 8 a 16 semanas (Bull et al., 2017; Dane et al., 2023; Richard J. Whittington et al., 2013). Debido a su lento crecimiento, las pruebas bioquímicas tienen un valor limitado y no se utilizan para su identificación (De Juan Ferré, 2005).

En cuanto a sus características nutricionales, MAP depende de la adición de micobactina, lo que ha sido utilizado como una característica distintiva de esta subespecie en el cultivo *in vitro*, si bien, no supone una característica específica de la misma. Actualmente se requiere confirmar el crecimiento microbiológico con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dane et al., 2023). El conocimiento del genoma completo de MAP ha permitido detectar la presencia de los genes relacionados con la síntesis de micobactina (gen *mtbA*) en MAP, existiendo diferencias significativas en su tamaño al comparar estos genes entre MAP, *M. tuberculosis* y *M. avium*, siendo el gen *mtbA* más reducido en aminoácidos en MAP. Esta diferencia podría explicar por qué la síntesis de micobactina está atenuada en la mayoría de las cepas de MAP (Li et al., 2005).

La secuenciación del genoma de MAP realizada por Li et al. (2005) ha proporcionado información sobre las características de su genoma, incluyendo su secuencia circular única compuesta por 4.829.781 pares de bases. Además, esta secuenciación ha permitido identificar las relaciones entre linajes, lo que ha brindado una visión más completa para la clasificación de las cepas de MAP (Bryant et al., 2016).

Se reconocen dos grupos principales de cepas de acuerdo con el origen: las cepas "Tipo S" (*Sheep-type* u ovinas) y las cepas "Tipo C" (*Cattle-type* o bovinas) (Bryant et al., 2016; D. M. Collins et al., 1990). Sin embargo, no siempre existe una correlación

entre el tipo de cepa y el hospedador. Por esta razón, algunos investigadores prefieren designar las cepas "Tipo S" como Tipo I y las cepas "Tipo C" como Tipo II, con el objetivo de evitar confusiones (Bryant et al., 2016; Mizzi et al., 2021).

La paratuberculosis bovina es una enfermedad endémica en la mayoría de los países, con una prevalencia notificada en los rebaños que varía entre el 10 y el 90 por ciento. Solo tres países, Tailandia, Noruega y Suecia afirman estar libres de la enfermedad, con prevalencias inferiores al 1 por ciento. Sin embargo, es importante considerar que la ausencia de la enfermedad es difícil de documentar y requiere un amplio sistema de vigilancia sanitaria. Por lo tanto, es necesario tratar esta información con cautela (Stevenson & Kapur, 2020; R. Whittington et al., 2019).

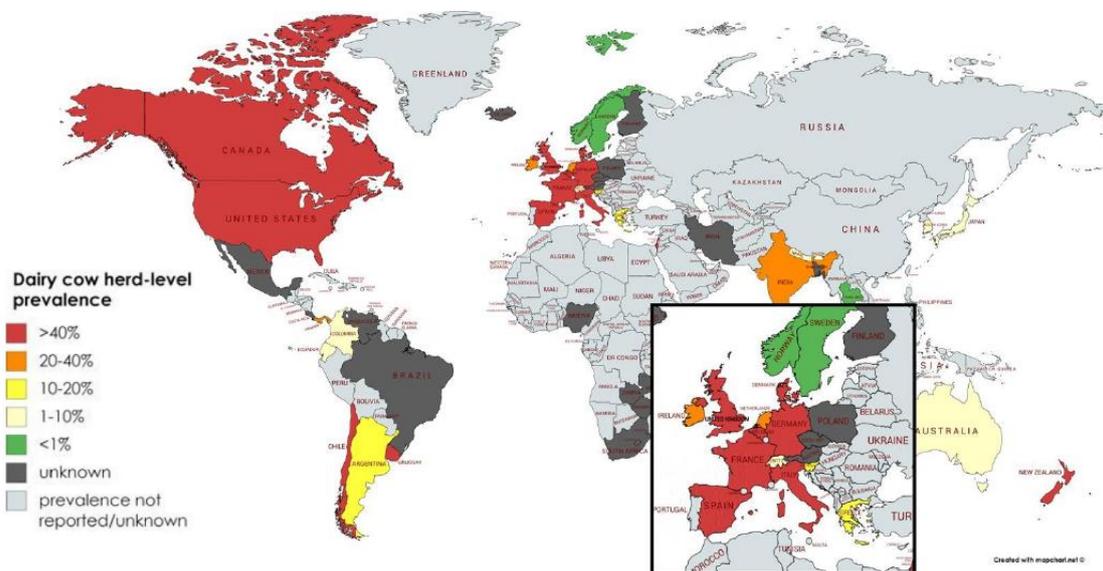


Figura 4. Prevalencia mundial de la infección por MAP a nivel de rebaño en ganado lechero (Fuente: Stevenson y Kapur, 2020; adaptado de Whittington et al., 2019)

La mayoría de los países desarrollados presentan una prevalencia a nivel de rebaño superior al 20 por ciento (R. Whittington et al., 2019), con valores de hasta el 71 y 85 por ciento para Pises Bajos o algunas regiones de Alemania, respectivamente (Geraghty et al., 2014; Johannes Lorenz Khol & Baumgartner, 2012; Stevenson & Kapur, 2020). A nivel individual, las prevalencias detectadas oscilan entre el 5 y el 15 por ciento (R. Whittington et al., 2019). En España, los estudios publicados son limitados, con prevalencias del 10 por ciento utilizando muestras de tanque de leche (S. S. Nielsen & Toft, 2009; Sevilla et al., 2002). Por otra parte, un estudio realizado en Galicia, utilizando muestras de suero de animales mayores de doce meses, estimó una seroprevalencia a nivel de granja del 10 por ciento en ganado vacuno lechero y cercano al 3 por ciento en ganaderías mixtas, no detectando animales seropositivos en ganaderías de aptitud cárnica (Diéguez et al., 2007)

Además de los bovinos, los pequeños rumiantes también sufren y transmiten la enfermedad. La transmisión entre rumiantes ha sido previamente descrita y puede suponer un factor de riesgo en aquellas ganaderías donde ambas especies cohabitan o en zonas de pastos comunales (Verdugo et al., 2014). Asimismo, el uso de pastos compartidos con bovinos de otras explotaciones (Fecteau et al., 2010) o el abonado con estiércol procedente de otras ganaderías también puede ser una vía de entrada de MAP en la ganadería (Salgado et al., 2011).

Por otro lado, se está generando un interés creciente por conocer el papel que juega la fauna silvestre como reservorio de MAP (R. Whittington et al., 2019). La bibliografía consultada demuestra la elevada frecuencia de aislamiento de MAP en especies animales de vida silvestre. Se ha observado que los ciervos y los conejos podrían ser posibles reservorios de la bacteria (Carta et al., 2013). En el caso específico de los conejos, se ha demostrado que pueden excretar en promedio $7,6 \times 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces (Daniels et al., 2003). Sin embargo, aún se requieren más estudios para determinar con precisión el verdadero papel de la fauna silvestre en el ciclo de infección de los animales de producción (McAloon et al., 2019a; R. Whittington et al., 2019).

Para comprender la epidemiología de la paratuberculosis, es fundamental tener en cuenta que se trata de una enfermedad incurable y que MAP es un patógeno intracelular obligado, lo que significa que no puede replicarse en el medio ambiente. En consecuencia, el riesgo de contagio está estrechamente relacionado con la cantidad de micobacterias que excretan los animales infectados, y la supervivencia de la bacteria en el medio.

Por otro lado, hay que considerar que los animales infectados no presentan síntomas clínicos durante un periodo prolongado, que puede variar de 2 a 10 años, y estos síntomas suelen estar asociados a situaciones de estrés fisiológico como el parto, la lactación, o a la presencia de otras enfermedades, que debiliten su sistema inmune, como son las parasitaciones o enfermedades infecciosas (Stevenson & Kapur, 2020). Durante este período, los animales infectados son portadores asintomáticos, y pueden excretar la bacteria intermitentemente en las heces (McAloon et al., 2019b; S. S. Nielsen & Toft, 2008).

Se ha observado que la dosis infectiva juega un papel fundamental en la transmisión de la enfermedad y en la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Mortier et al., 2013, 2015). Sin embargo, hasta el momento, no se ha establecido una dosis mínima que sea capaz de causar la infección (Fernandez, 2017; McAloon et al., 2019a); aunque hay estudios que indican que dosis superiores a $1,5 \times 10^6$ UFC pueden generar una infección (Sweeney et al., 2006).

La principal ruta de transmisión de la enfermedad en bovinos es la vía fecal-oral. Los animales jóvenes son más susceptibles a la infección (McAloon et al., 2019b; Mortier et al., 2013). Esta mayor susceptibilidad puede estar relacionada con la mayor permeabilidad del intestino en el animal recién nacido (Sweeney, 1996). Por otro lado, se ha observado que los animales que se infectan de adultos presentan una respuesta inmune más intensa, lo que podría conferirles una mayor resistencia a sufrir la enfermedad (Mortier et al., 2015). Así mismo, se ha planteado que la exposición repetida a MAP a medida que los animales envejecen puede fortalecer su resistencia a la infección (Delgado et al., 2013). Por último, también se ha planteado la hipótesis de que el efecto dilución del rumen, que aumenta con la edad, podría contribuir a disminuir la probabilidad de infección (Windsor & Whittington, 2010).

Teniendo en cuenta la mayor susceptibilidad de los terneros durante sus primeros días de vida y considerando que la principal vía de transmisión de la enfermedad es fecal-oral, se ha establecido que el calostro y la leche son los principales vehículos de contagio debido a una contaminación fecal. Las malas prácticas de higiene durante el ordeño, el proceso de amamantamiento y el alojamiento de los terneros aumentan potencialmente el riesgo de infección (Karsten Donat et al., 2016; Künzler et al., 2014; Wolf et al., 2016). También se ha observado que la ausencia de un corral de partos y la lactancia natural, entre otros factores, pueden contribuir a la transmisión de la enfermedad de la madre a los terneros (McAloon et al., 2019a; Wolf et al., 2016).

Por otro lado, se ha observado que MAP puede encontrarse directamente en el calostro y la leche, ya que es excretado por la glándula mamaria. Sin embargo, este fenómeno es poco frecuente y ocurre principalmente en animales en etapas avanzadas de la enfermedad (J. L. Khol et al., 2013; Stabel et al., 2014). En consecuencia, se cree que gran parte del MAP presente en el calostro y la leche se debe a la contaminación ambiental, relacionada con malas prácticas de higiene, y no a la propia excreción de la bacteria a través de la leche (Beaver et al., 2017).

Otras vías alternativas de transmisión descritas, aunque con menor importancia epidemiológica, incluyen la transmisión vía uterina (Eisenberg et al., 2015), vía respiratoria, basada en la capacidad de MAP para "esporular" en determinadas (Beaver et al., 2017; McAloon et al., 2019b) condiciones (Corner et al., 2004; Lamont et al., 2012), y la transmisión de ternero a ternero (Corbett et al., 2017). Esta última ha sido demostrada experimentalmente, mostrando una fase inicial de excreción con potencial para transmitir la enfermedad a otros terneros, por lo que el alojamiento en el mismo compartimento podría ser un factor de riesgo (Corbett et al., 2017; McAloon et al., 2019b).

La adquisición de animales infectados es la principal vía de entrada de la enfermedad en una explotación libre (Kirkeby et al., 2017; Rangel et al., 2015), existiendo

un mayor riesgo en granjas que realizan reposición externa anualmente, riesgo que se incrementa debido a la limitación de las técnicas de diagnóstico actuales para detectar la infección en las primeras fases (S. S. Nielsen & Toft, 2008). Para mitigar el riesgo de introducción de la paratuberculosis en el rebaño, algunos países han implementado un sistema de certificación (Dufour et al., 2004; Kirkeby et al., 2017; Søren Saxmose Nielsen, 2011). Este sistema de certificación garantizaría que los animales adquiridos provengan de explotaciones libres de paratuberculosis. De esta manera, se reduciría significativamente la posibilidad de introducir la enfermedad en el rebaño (Weber et al., 2004).

Una vez ingerido, MAP atraviesa las células M que tapizan los folículos linfoides de las placas de Peyer del epitelio intestinal. Al llegar a la submucosa, la bacteria es fagocitada por los macrófagos subepiteliales del hospedador, donde finalmente reside en los fagosomas (Bermudez et al., 2010). Las cepas virulentas de MAP han desarrollado estrategias que le permiten sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos (Arsenault et al., 2014). Durante el transcurso de la infección, algunos de los macrófagos infectados pueden activarse y secretar citoquinas y quimioquinas que desencadenan una respuesta inflamatoria que favorecen el reclutamiento de nuevos macrófagos y linfocitos T procedentes de la sangre y tejidos hacia el sitio de la infección. Por ello, la bacteria puede persistir en el interior de las células durante varios años (Yoo & Shin, 2012). En condiciones estresantes para el animal, por ejemplo, después del parto, MAP puede llegar a reactivarse, escapar de los granulomas y originar nuevas lesiones en otras zonas del tejido intestinal y otros órganos (Vazquez et al., 2014).

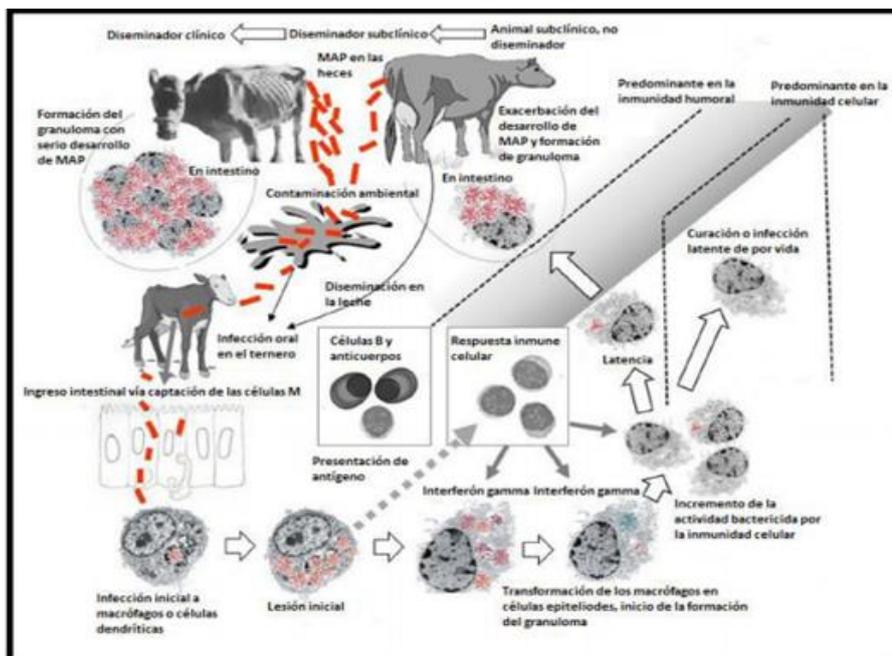


Figura 5. Diagrama simplificado del desarrollo de inmunidad en la paratuberculosis bovina. Fuente: Koets y Gröhn (2015).

En las etapas tempranas de la infección, las lesiones se encuentran restringidas a las paredes del intestino delgado y provocan el drenaje de los nódulos linfáticos mesentéricos. Cuando progresa la enfermedad, aparecen lesiones macroscópicas en el yeyuno, íleon, válvula ileocecal, ciego y colon y en los nódulos linfáticos mesentéricos. Las lesiones intestinales son responsables de la pérdida de proteínas y del síndrome de malabsorción proteica, lo que conduce a un desgaste muscular (WOAH, 2022).

Los signos clínicos de la enfermedad suelen ser poco evidentes y están asociados a las diferentes fases de la misma: fase I o infección silente, fase II o infección subclínica, fase III o infección clínica y fase IV o clínica avanzada (*Tabla 1*) (S. S. Nielsen & Toft, 2008)(S. S. Nielsen & Toft, 2008). A nivel general, tras varias semanas de infección, comienza una fase de multiplicación de MAP en las paredes del intestino delgado. Dependiendo de la resistencia natural del individuo, se elimina la infección o el animal permanece infectado como portador asintomático (fase I). A medida que evoluciona la infección los animales asintomáticos comienzan a excretar MAP de forma intermitente (fase II), hasta que tras un proceso que comprometa la inmunidad del animal, como un proceso de estrés fisiológico, los animales alcanzan la fase clínica, donde es común la pérdida progresiva de peso, aunque el animal afectado tenga un apetito normal, además se observa una diarrea (Olsen et al., 2002). Algunas veces se observa fiebre leve y edema secundario a la hipoproteinemia, visible en la región submandibular. A medida intermitente que la infección progresa, puede producirse la diseminación de la bacteria a otros órganos, como el útero y la glándula mamaria (Stevenson & Kapur, 2020). Se estima que por cada caso clínico avanzado de paratuberculosis hay de 15 a 25 animales afectados: de uno a dos animales con signos clínicos leves (fase III), 4 a 8 casos con infección subclínica (II) y 10 a 14 bovinos con infección silente (fase I), es lo que se ha denominado el “fenómeno iceberg”, donde la parte visible del problema es mínima, mientras que la parte invisible está compuesta por la mayoría de casos, que están en la fase silente y subclínica, y que generalmente no son detectados (Magombedze et al., 2013)

Tabla 1. Fases de la infección causada por MAP y síntomas clínicos causados en bovinos.

Fase de infección	Características y sintomatología
<p>Fase I Silente</p>	<p>Presente en terneros, novillas y ocasionalmente en animales adultos. Ausencia de signos clínicos de enfermedad.</p>
<p>Fase II Subclínica</p>	<p>Animales adultos portadores de MAP. No presentan sintomatología. La mayoría de los animales son negativos al cultivo de heces, pero excretan carga micobacteriana baja intermitente. Pueden mostrar anticuerpos circulantes o respuestas inmunes celulares alteradas.</p>
<p>Fase III Clínica</p>	<p>Animales adultos tras varios años de infección. Signos clínicos iniciales: pérdida de la producción de leche y peso, pelo hirsuto y diarrea intermitente. Se detectan por técnicas directas como el cultivo y la qPCR fecal y técnicas indirectas como el ELISA.</p>
<p>Fase IV Clínica avanzada</p>	<p>Transición rápida desde la fase anterior. Letargo debilitación y emaciación Edema submandibular, hipoproteinemia, caquexia y diarrea profusa. Sacrificio o muerte de los animales.</p>

Esta clasificación de la enfermedad en fases de infección proporciona una estructura conceptual clara y precisa para la definición de casos y la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas (S. S. Nielsen & Toft, 2008). De esta manera, se utiliza la terminología de "animal infectado" para aquellos animales en los que MAP ha colonizado los tejidos (fase I), "animal infeccioso" cuando MAP se encuentra presente en las heces (fase II), y "animal afectado por MAP" cuando los animales presentan síntomas clínicos de la enfermedad y excretan MAP en las heces u otras secreciones fisiológicas (fase III-IV) (Reddacliff et al., 2006).

El diagnóstico de la paratuberculosis, al igual que el de otras micobacterias, es complejo, especialmente en la detección de animales en fase subclínica. El diagnóstico clínico-lesional puede orientar al diagnóstico definitivo. Los primeros síntomas se observan generalmente durante los periodos de lactación, de manera que en algunos animales se observa una excesiva pérdida de la condición corporal, adelgazamiento progresivo, sin perder el apetito. En algunos animales hay hipertermia y la diarrea se presenta de forma intermitente (Raizman et al., 2007). No obstante, estos signos pueden ser compatibles con otras enfermedades, por ello, el diagnóstico clínico individual se tiene

que completar siempre con un estudio epidemiológico dentro del rebaño. Así, la persistencia de bajas a lo largo del tiempo, junto con la observación de varios casos con cuadro de adelgazamiento progresivo, caquexia y diarreas intermitentes o continuas, afectando generalmente animales de entre 2 y 4 años, fundamentalmente hembras inmediatamente después del parto son datos característicos de la presencia de paratuberculosis en un rebaño (Stevenson & Kapur, 2020).

Para el diagnóstico laboratorial, existen muchas pruebas diagnósticas disponibles, enfocadas a detectar la presencia y viabilidad del agente causal, o la respuesta inmune celular y humoral que origina (Gilardoni et al., 2012; S. S. Nielsen & Toft, 2008; R. Whittington et al., 2019) El diagnóstico de la paratuberculosis en animales que presentan signos clínicos se basa en los hallazgos típicos, que deben ser confirmados detectando la presencia de MAP en las heces mediante microscopía, cultivo o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La tinción ácida rápida con Ziehl-Neelsen es el método de diagnóstico más simple, rápido y económico, pero la especificidad y la sensibilidad son bajas, ya que es difícil diferenciar entre MAP y otros bacilos ácido-alcohol resistentes. La tinción de Ziehl-Neelsen se puede usar para el cribado inicial de MAP, pero debe confirmarse mediante otras pruebas específicas, como PCR o inmunoensayos (WOAH, 2022).

Dentro de las técnicas directas, el cultivo microbiológico es el método utilizado para aislar MAP viable, y proporciona un diagnóstico definitivo o asertivo, siendo considerado tradicionalmente la técnica de referencia para el diagnóstico de la paratuberculosis (R. J. Whittington et al., 2000). El cultivo se puede realizar utilizando diferentes tipos de muestras, como son las heces, la leche y el calostro y el tejido intestinal, entre otros.

El aislamiento de MAP a partir de muestras fecales permite diagnosticar la enfermedad en animales vivos, mientras que el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de tejidos permite confirmar la enfermedad tras la muerte o sacrificio de los animales. Sin embargo, es importante destacar que el cultivo fecal solo permite el diagnóstico de animales en fase infecciosa, es decir, animales que están excretando MAP. Esto ha planteado un obstáculo para los estudios de validación de técnicas de diagnóstico que han utilizado el cultivo fecal, ya que solo permite validar la capacidad de las técnicas para detectar animales excretores (McKenna et al., 2005).

Se ha observado que la monitorización continuada del ganado mediante cultivo fecal puede detectar entre el 40 y el 60 por ciento de los animales subclínicos hasta tres años antes de que manifiesten signos clínicos (R. H. Whitlock et al., 2000; R. J. Whittington et al., 2000). En este sentido, la sensibilidad del cultivo fecal ha mostrado valores que oscilan entre el 13 por ciento en animales asintomáticos, hasta el 74 por ciento en animales que presentan signos clínicos de la enfermedad. En cuanto a su especificidad, se considera del 100%, a excepción de los casos en los que se aplica en animales expuestos a altas concentraciones de MAP. En estas situaciones, teóricamente se pueden

encontrar animales excretores no infectados debido al consumo de alimentos contaminados con MAP, lo que reduce la especificidad del cultivo fecal al 98 por ciento (R. H. Whitlock et al., 2000; R. J. Whittington et al., 2000).

Por otro lado, el aislamiento microbiológico a partir de muestras de leche se utiliza para determinar el riesgo de presencia de MAP viable en esta matriz. Se estima que su sensibilidad es del 28 por ciento y su especificidad del 32 por ciento. También es posible analizar la presencia de MAP en muestras de calostro, las cuales han demostrado ser más sensibles que la leche (Streeter et al., 1995). Los mejores resultados para el aislamiento de MAP en muestras de tejido se han obtenido mediante raspados de la VIC y NLIC o nódulos yeyunales (Ayele et al., 2004; Hasonova et al., 2009). La sensibilidad del cultivo microbiológico a partir de muestras de tejido ha sido del 70 por ciento, con valores de especificidad del 95 por ciento (Gilardoni et al., 2012).

Independientemente de la matriz utilizada, el aislamiento de MAP consta de varias fases, entre las que deberíamos destacar, la preparación de la muestra y la descontaminación del inóculo como pasos cruciales para mejorar la precisión del cultivo microbiológico de MAP (Dane et al., 2023) y eliminar así otros géneros bacterianos y fúngicos de crecimiento rápido que prevalecen sobre MAP. Para ello, se han utilizado varios métodos como son los tratamientos con ácido oxálico, NaOH, hipoclorito sódico, fenol, cloruro de benzalconio y cloruro hexadecil piridinio (HPC) (Dane et al., 2023; WOA, 2022).

Los medios de cultivo más utilizados contienen yema de huevo, como el medio de Herrold con micobactina (HEYM) o el Löwestein-Jensen con o sin micobactina. También hay medios elaborados a base de suero, como el Dubos, e incluso medios sintéticos, como el de Middlebrook y sus variantes (7H10, 7H11 o 7H9), o el de Watson-Reid (Dane et al., 2023; WOA, 2022).

El cultivo en el medio de agar HEYM es ampliamente utilizado y considerado el método estándar para detectar MAP en muestras fecales. Los medios sintéticos, como el Middlebrook, permiten un crecimiento más rápido del microorganismo en comparación con el HEYM (Kuenstner et al., 2017; WOA, 2022). Por esta razón, el Middlebrook es el más utilizado, especialmente en su variante en medio líquido Middlebrook 7H9 (Pozzato et al., 2011). Además, se ha confirmado que los medios de Middlebrook, cuando se complementan con ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa/albúmina-dextrosa-catalasa y micobactina, son los más compatibles con una amplia gama de cepas de MAP (Richard J. Whittington et al., 2011)

El cultivo en medio líquido es ampliamente utilizado en los laboratorios de diagnóstico veterinario debido a su eficacia. Se realiza mediante el uso de equipos automatizados que ofrecen ventajas significativas en comparación con los métodos de cultivo convencionales (WOA, 2022). Entre los sistemas de cultivo automatizados más destacados se encuentran los radiométricos BACTEC y los no radiométricos como el MGIT 960 (fluorométrico), que se utiliza ampliamente debido a su capacidad para medir

el agotamiento de oxígeno como indicador del crecimiento bacteriano (Laurin et al., 2015), y el MB/BacT, que utiliza métodos colorimétricos (Stich et al., 2004).

La confirmación del crecimiento obtenido en el cultivo se realiza mediante PCR, basada en la amplificación de secuencias específicas de MAP, como IS900 o F57. Esta técnica, altamente sensible y específica, permite identificar pequeños segmentos de ADN (Laurin et al., 2015) y cuantificar la presencia de MAP (Gilardoni et al., 2012; Ireng et al., 2009). La PCR, además de su precisión diagnóstica, destaca por su rapidez al proporcionar resultados en 24 a 72 horas y por su habilidad para identificar cepas de MAP, facilitando el estudio de la epidemiología y variabilidad genética de la enfermedad (Gilardoni et al., 2012)

Existen diferentes variantes de la PCR, como alternativas a la PCR convencional, el modelo más utilizado en el diagnóstico de rutina veterinario se encuentra la PCR en tiempo real (qPCR), que presenta la ventaja de poder cuantificar el ADN y se propone como técnica de referencia en sustitución del cultivo microbiológico (R. D. Berghaus et al., 2006; Kawaji et al., 2020). La sensibilidad y especificidad de la qPCR dependerá principalmente de la naturaleza de la muestra utilizada, del proceso de extracción de ADN, del tipo de PCR empleado y de las dianas utilizadas.

En cuanto a la naturaleza de la muestra, las heces son comúnmente empleadas para el diagnóstico *antemortem* basado en qPCR, ya que son fáciles de recolectar de forma no invasiva. Sin embargo, trabajar con muestras fecales puede ser complicado debido a que presentan abundante microbiota fecal y restos no digeridos, entre otros componentes, que pueden inhibir las reacciones de qPCR debido a interacciones con los componentes involucrados en la amplificación del ADN, lo que puede conducir a resultados falsos negativos. Así pues, en términos generales, la qPCR fecal ha sido considerada una técnica valores de sensibilidad similares o superiores empleando la qPCR fecal respecto al cultivo (Prendergast et al., 2018)

En el caso de las muestras de tejido, la sensibilidad de la qPCR es mayor que a partir de heces, al producirse menos efectos inhibidores de la reacción (J. M. Garrido et al., 2000). Otra matriz utilizada para el diagnóstico por qPCR es la leche, tanto para el diagnóstico individual como a nivel de rebaño mediante muestras de leche de tanque para la identificación de animales altamente infecciosos o en explotaciones con prevalencia elevada (Stabel et al., 2014).

El cuanto al proceso de extracción de ácidos nucleicos supone una fase clave para el éxito de la qPCR, por un lado, se debe obtener una muestra lo más pura posible y por otro debemos asegurar un proceso de extracción eficaz, así evitaremos resultados falsos negativos. Para abordar estos problemas, se han diseñado método de purificación de ADN basados en perlas magnéticas, que permiten recuperar físicamente las moléculas de ácido nucleico del lisado de muestra, eliminando así posibles contaminantes. Además, los métodos de extracción para MAP suelen combinar un proceso de extracción físico y

enzimático para asegurar la rotura de la pared celular (Acharya et al., 2017; Fock-Chow-Tho et al., 2017)

En el caso de los cebadores utilizados, se han identificado diferentes secuencias para reconocer de forma específica a MAP. El cebador más comúnmente utilizado es la frecuencia de inserción IS900, una secuencia de 1451 pb presente en 14-18 copias en el genoma de MAP, lo que facilita su detección frente a genes de una sola copia (Li et al., 2005). Sin embargo, se han registrado resultados positivos con este cebador en otras micobacterias distintas a MAP y en bacterias del género *Lactococcus* spp., lo que indica la existencia de secuencias genéticas similares a IS900 en microorganismos relacionados que pueden generar falsos positivos (Fawzy et al., 2015). Como alternativa, se han identificado otras secuencias, como ISMAP02, ISMAV2, hspX o F57. Esta última, consiste en una secuencia de 620 pb presente en una única copia en todo el genoma de MAP, se considera altamente específica para su detección (Möbius et al., 2008).

Además de las técnicas directas, para el diagnóstico se utilizan pruebas indirectas basadas en la respuesta inmune generada por el animal infectado con el microorganismo; en concreto las técnicas serológicas permiten detectar anticuerpos generados frente a MAP en muestras de suero o leche. Estas pruebas incluyen la prueba de fijación de complemento (FC), inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y ELISA. De entre ellas la más empleada es el ELISA, que destaca por su bajo coste, rapidez, simplicidad, reproducibilidad y capacidad de analizar grandes cantidades de muestras simultáneamente (Blanco Vázquez et al., 2020), siendo la técnica de diagnóstico más utilizada en los programas de control de la enfermedad (R. Whittington et al., 2019).

EL Los antígenos más utilizados en los tests ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina son el PPA-3 o el LAM, aunque se siguen probando otros antígenos candidatos y biomarcadores relacionados con la fase inicial de la infección (Blanco Vázquez et al., 2020). La sensibilidad del ELISA varía según la fase clínica de los animales. En general, se considera que la respuesta humoral detectable mediante ELISA se desarrolla una vez que los animales empiezan a excretar MAP en las heces, lo que explica la falta de sensibilidad en las fases iniciales de la enfermedad. La sensibilidad del ELISA también se ha evaluado en muestras de leche individual y de tanque, siendo menor que en muestras de suero sanguíneo (Lavers et al., 2014). En cuanto a su especificidad, se ve limitada ante reacciones cruzadas por la infección con otras micobacterias, para lo cual se ha incorporado un paso de preadsorción de los sueros con antígenos de *Mycobacterium phlei* que reduce dichas interferencias (Bech-Nielsen et al., 1992).

Para la detección de la inmunidad celular se ha utilizado la prueba de intradermotuberculinización (SIT) y la prueba de liberación de interferón gama (IFN- γ), pero la interpretación es difícil en ambos casos (WOAH, 2022). La técnica SIT se basa en una respuesta de hipersensibilidad retardada de tipo IV que desarrolla el animal tras la inoculación de 0,1 o 0,2 ml de derivado proteico purificado (PPD) de johnhina (PPD de MAP) o la PPD aviar (PPD de *M. avium*), preferentemente en las tablas del cuello. Esta

reacción se valora midiendo el pliegue dérmico en el momento de la inoculación y a las 72 horas de haber efectuado la misma, la mayor respuesta a esta técnica se encuentra en animales en sus fases iniciales o latentes de la enfermedad, disminuyendo la respuesta en las fases clínicas. Por otro lado, la prueba del gamma-interferón mide los niveles del IFN- γ liberados por las células sanguíneas tras su estimulación con la PPD johnina o PPD aviar, que serían más elevados si el animal está sensibilizado frente a MAP (Stevenson & Kapur, 2020).

Tabla 2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la paratuberculosis y su propósito. Fuente: WOA, 2022

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
Histopatología*	+	-	+	+++	-	-
Tinción fecal por ZN	-	-	-	+	-	-
Cultivo	-	+	+	+++	+	-
PCR	+++	+++	+	++	+	-
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID**	++	+	+	++	+++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++

Los programas de control de la paratuberculosis bovina existen desde principios del siglo XX, aunque su aplicación ha sido heterogénea. Los principales países productores de leche, como Alemania, Países Bajos o Italia, entre otros, cuentan con programas de control establecidos (R. Whittington et al., 2019). Sin embargo, en España, solo existe un programa de control voluntario en la Comunidad Foral de Navarra (Munárriz et al., 2018). El control de la paratuberculosis presenta desafíos significativos, factores como la resistencia de MAP en el medio ambiente, el largo periodo de incubación de la enfermedad, la falta de precisión en el diagnóstico de casos subclínicos, la brecha en el conocimiento epidemiológico y patogénico, y la falta de un código zosanitario internacional dificultan su control en la actualidad (McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019).

En los programas de control de la paratuberculosis bovina, se emplean medidas habituales con el propósito de reducir la prevalencia de MAP en los rebaños y, en algunos casos, lograr la erradicación completa de la enfermedad (R. Whittington et al., 2019). Entre las medidas más comunes se encuentran el sacrificio de los animales que diseminan la bacteria y la implementación de medidas higiénico-sanitarias (M. T. Collins et al., 2010; S. S. Nielsen & Toft, 2011). La combinación de ambas medidas se ha demostrado como la estrategia más efectiva para el control de la paratuberculosis bovina (Kirkeby et al., 2017)

La estrategia de identificación y eliminación de animales clínicamente enfermos o subclínicamente infectados, conocida como "*test-and-cull*", implica realizar pruebas de diagnóstico para detectar la presencia de la enfermedad y sacrificar a los animales infectados. Esta estrategia es efectiva para reducir la propagación de MAP y disminuir la prevalencia de la paratuberculosis, sin embargo, es una estrategia costosa cuando la prevalencia es elevada y por sí sola no garantiza la erradicación a largo plazo, por lo que se requieren acciones adicionales (Bates et al., 2019; Jubb & Galvin, 2000).

También pueden plantearse medidas de manejo y bioseguridad para evitar la contaminación fecal del alimento, agua y ambiente (Beaver et al., 2017; Doré et al., 2012; McAloon et al., 2019b). Entre ellas, las mejoras en las prácticas de manejo e higiene en el área de parto y en la zona de recría, son puntos críticos. Esto incluye mantener un área de parto aislada de los animales en producción y asistencia durante el parto para evitar que los animales mamen directamente, segregación de animales positivos, ordeño higiénico, pasteurización del calostro, y limpieza y desinfección de instalaciones, entre otras medidas (Wolf et al., 2016).

Además, en los programas de control de la paratuberculosis bovina, se pueden considerar otras medidas complementarias que contribuyen a fortalecer los esfuerzos de control. Una de ellas es el sacrificio de la progenie de vacas infectadas, ya que existe riesgo de transmisión uterina o infección durante el parto (Eisenberg et al., 2015). Otra medida importante, especialmente en la ganadería extensiva, es el control de los pastos para reducir la exposición al patógeno. Esto implica evitar el contacto con fauna silvestre, regular el abonado con purines de vacuno y prevenir la confluencia de diferentes especies (Bates et al., 2019; Doré et al., 2012). Por otra parte, la adquisición de ganado procedente de explotaciones certificadas como libres de paratuberculosis disminuiría significativamente el riesgo de introducir el patógeno en el rebaño (Kirkeby et al., 2017; Rangel et al., 2015).

Por otro parte, una de las principales herramientas para el control de la enfermedad es la vacunación, en la actualidad, existen vacunas disponibles para combatir esta

enfermedad en el ganado (Juste et al., 2021a). Aunque se ha demostrado que es una estrategia efectiva en estudios controlados, es importante tener en cuenta que no garantiza la erradicación de la enfermedad y su eficacia puede verse afectada por factores como la variabilidad de las cepas de MAP y las condiciones locales (Bastida & Juste, 2011; Reddacliff et al., 2006). Hay evidencia suficiente que respalda los beneficios epidemiológicos y económicos de la vacunación con vacunas inactivadas en todas las especies de rumiantes (Cho et al., 2012; Juste et al., 2021a). Sin embargo, su uso en el ganado bovino sigue siendo restringido e incluso está prohibido en la mayoría de países debido al riesgo de interferencia con las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis que se basan en pruebas intradérmicas (Serrano et al., 2017; R. Whittington et al., 2019).

A pesar de las recomendaciones de organismos internacionales como, la Organización Mundial del Comercio (OMC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en relación con el control y vigilancia de la paratuberculosis en el comercio de animales vivos y alimentos, la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH) no proporciona información específica sobre la paratuberculosis. En este trabajo se han evaluado técnicas de diagnóstico rápidas y eficaces que permitan la detección de animales infectados en una zona endémica de tuberculosis, así como propuestas de control de la enfermedad en la ganadería de vacuno de leche en Andalucía, con un enfoque práctico que garantice la aplicabilidad de los resultados obtenidos.

Capítulo II. Objetivos

Esta tesis doctoral se enmarca en el proyecto autonómico “*InnoTuber: nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía*”, donde se han evaluado pruebas de diagnóstico rápidas para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis en ganado bovino, así como medidas de control en Andalucía. Los objetivos específicos propuestos son los siguientes:

- 1. Evaluar técnicas de diagnóstico rápidas para detectar la presencia de paratuberculosis en el ganado bovino.***

- 2. Proponer medidas de control de la paratuberculosis bovina en explotaciones de vacuno lechero en una zona endémica de tuberculosis.***

Capítulo III. Estudios

Estudio I.

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA QPCR MULTIPLEX IS900/F57 SOBRE MUESTRAS FECALES Y TEJIDO INTESTINAL PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN GANADO BOVINO.

Francisco Jurado-Martos, Fernando Cardoso-Toset, Carmen Tarradas, Ángela Galán-Relaño, José María Sánchez-Carvajal, Inés Ruedas-Torres, Eduardo Vera, Fernanda Larenas-Muñoz, Lidia Gómez-Gascón, Irene Magdalena Rodríguez-Gómez, Librado Carrasco, Jaime Gómez-Laguna, Belén Huerta-Lorenzo, Inmaculada Luque.

Publicado en *Research in Veterinary Science* (2023) doi: 10.1016/j.rvsc.2023.06.007

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA QPCR MULTIPLEX IS900/F57 SOBRE MUESTRAS FECALES Y TEJIDO INTESTINAL PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* EN GANADO BOVINO.

Francisco Jurado-Martos^{a,*}, Fernando Cardoso-Toset^a, Carmen Tarradas^{b,d}, Ángela Galán-Relaño^{b,d}, José María Sánchez-Carvajal^{c,d}, Inés Ruedas-Torres^{c,d}, Eduardo Vera^b, Fernanda Larenas-Muñoz^c, Lidia Gómez-Gascón^{b,d}, Irene Magdalena Rodríguez-Gómez^{c,d}, Librado Carrasco^{c,d}, Jaime Gómez-Laguna^{c,d}, Belén Huerta-Lorenzo^{b,d,‡}, Inmaculada Luque^{b,d,‡}.

^a *CICAP-Centro Tecnológico Agroalimentario, Pozoblanco, Córdoba, España.*

^b *Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, España.*

^c *Departamento de Anatomía y Patología Comparada y Toxicología, Grupo de Patología*

^e *Inmunología (UCO-PIG), Universidad de Córdoba, España.*

^d *UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario 'ceiA3', Universidad de Córdoba, España.*

[‡] *Estos autores han contribuido a partes iguales a este trabajo y comparten la dirección principal del trabajo.*

Palabras clave: qPCR, IS900, F57, paratuberculosis, diagnóstico.

Resumen

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (MAP) es responsable de la paratuberculosis bovina (PTBb), enfermedad que causa elevadas pérdidas productivas en el ganado vacuno. En este trabajo se realizó un estudio transversal en 228 bovinos para evaluar la validez y utilidad diagnóstica de una PCR multiplex en tiempo real (qPCR) en muestras fecales e intestinales [válvula ileocecal (VIC) y nódulos linfáticos ileocecales (NLIC)], utilizando el cultivo de tejido intestinal como prueba de referencia.

Basándose en la sensibilidad, especificidad y razones de verosimilitud (RV) obtenidos, el valor diagnóstico de la qPCR fecal para confirmar la infección por MAP fue moderado (sensibilidad 50,3%, especificidad 93,5%, RV positivo 7,8), y bajo para descartarla (RV negativo 0,5). En las zonas con una prevalencia superior al 23%, la credibilidad de los resultados positivos fue superior al 70%. En los resultados negativos, la credibilidad fue superior al 90% en rebaños con una tasa de infección inferior al 19%, por lo que la qPCR fecal sería muy útil en estas zonas para certificar la ausencia de infección. Para el diagnóstico *post-mortem*, la qPCR en muestras de VIC mostró una buena precisión diagnóstica para confirmar la enfermedad (sensibilidad 71,7%,

especificidad 93,3%, RV positivo 10,8), con una credibilidad superior al 70% en animales procedentes de zonas o rebaños con una prevalencia de infección mayor o igual al 18%. La mejor estrategia para descartar la enfermedad fue la combinación en paralelo de ambos tejidos (VIC+NLIC) (sensibilidad 81,3%, especificidad 89,5%, RV negativo 0,2), con una credibilidad de los resultados negativos superior al 95% en animales procedentes de zonas con una prevalencia de infección del 0-20%. En este trabajo se muestra como las técnicas de qPCR fecal y tisular pueden ser utilizadas para monitorizar el diagnóstico de la PTBb, interpretando los resultados obtenidos en base a la situación epidemiológica del rebaño o el área de estudio.

Introducción

La paratuberculosis bovina (PTBb), también conocida como enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (MAP), que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes provocando una enteritis granulomatosa crónica progresiva. Los terneros se infectan por vía fecal-oral a una edad temprana, pero solo el 10-15% de ellos muestran signos clínicos (Barkema et al., 2018; McAloon et al., 2019a). La enfermedad está muy extendida en todo el mundo (S. S. Nielsen & Toft, 2009), con tasas de prevalencia de rebaños superiores al 40 por ciento en muchos países desarrollados (R. Whittington et al., 2019). Las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad (Kirkeby et al., 2017), y su posible relación con la enfermedad de Crohn en humanos (Eslami et al., 2019; Kuenstner et al., 2017), han centrado la atención en esta enfermedad y su control en animales.

La vacunación se considera la medida más eficaz para controlar la PTBb, ya que reduce los casos clínicos y la excreción bacteriana. Sin embargo, no previene la infección y puede interferir con la técnica de intradermotuberculinización bovina, por lo que está prohibida en muchos países (Juste et al., 2021a). Por lo tanto, la estrategia estándar de control de la PTBb implica la aplicación de programas basados en diagnóstico y sacrificio (R. Whittington et al., 2019), con dos enfoques diagnósticos principales: el diagnóstico indirecto, que estudia la respuesta inmunitaria humoral, y el diagnóstico directo, que utiliza técnicas como el cultivo microbiológico o la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real [denominada PCR cuantitativa (qPCR)] en muestras fecales. Sin embargo, estos enfoques de diagnóstico tienen limitaciones, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad (Barkema et al., 2018), lo que pone de relieve la necesidad de utilizar métodos alternativos. El análisis de muestras de tejido intestinal en el sacrificio mediante qPCR puede proporcionar una mayor sensibilidad diagnóstica (SE) y especificidad (ES), permitiendo la confirmación de la PTBb en animales sacrificados sin signos clínicos o lesiones compatibles con la enfermedad. En este sentido, el diagnóstico *post-mortem* de animales subclínicos con sistemas de vigilancia epidemiológica en el matadero puede ser

una estrategia eficaz para facilitar el control de la PTBb, ayudando a identificar rebaños positivos o a validar la eficacia de medidas de control previamente implementadas.

El cultivo bacteriano se considera el método de referencia para el diagnóstico de la PTBb, aunque presenta diferentes limitaciones relacionadas con el procesamiento de las muestras y el tiempo de respuesta (Dane et al., 2023). En este sentido, la qPCR ha demostrado ser una herramienta eficaz para la detección rápida y precisa de MAP en muestras fecales o de tejido intestinal (Beinhauerova et al., 2021; Gilardoni et al., 2012). La secuencia de inserción 900 (IS900) es la diana de qPCR más utilizada para la detección de MAP, ya que está presente en 14-20 copias del genoma de MAP y confiere una elevada SE al ensayo de qPCR (Möbius et al., 2008). Sin embargo, la ES de la qPCR se ve influida por la presencia de secuencias similares en otras micobacterias. Para abordar este problema, se han desarrollado ensayos de qPCR multiplex dirigidos tanto a IS900 como al fragmento F57, que es una diana muy específica para la detección de MAP, si bien, solo está presente en una copia en el genoma de MAP (Keller et al., 2014; Slana et al., 2008).

En el enfoque clásico, la idoneidad de las pruebas de diagnóstico para confirmar o descartar una enfermedad se ha basado en su capacidad para diferenciar entre animales sanos y enfermos, estimada por su SE y ES (Gardner et al., 2021). Sin embargo, dado que ninguna prueba tiene SE y ES perfectas, se recomienda la evaluación de su eficacia mediante las razones de verosimilitud (RV), que permiten comparar la probabilidad de éxito y fracaso de la técnica en un único parámetro (Bandos et al., 2010). Sin embargo, la elección de la técnica depende en última instancia del coste y la credibilidad de los resultados obtenidos (R. Whittington et al., 2019), que viene determinada por los valores predictivos (VP), que a su vez están influidos por la prevalencia de la infección en la población de estudio (Gardner et al., 2021). Por lo tanto, la interpretación precisa de los resultados requiere una consideración adecuada de los VP (WOAH, 2019). Además, el valor predictivo positivo (VPP) es especialmente útil en la gestión de los programas de control, ya que su inversa puede ayudar a estimar el coste asociado al sacrificio de animales verdaderos y falsos positivos por cada animal verdaderamente infectado detectado. Por ello, es crucial monitorizar este parámetro de forma continua a lo largo de un programa de control para evaluar la eficacia de las técnicas aplicadas y como criterio de modificación (WOAH, 2019).

El objetivo de este estudio fue estimar la validez, en relación con el cultivo microbiológico de tejido intestinal, y la utilidad, en función de la prevalencia de PTBb, de una qPCR multiplex [IS900/F57/control endógeno (CE)] para el diagnóstico *ante-mortem* de la PTBb a partir de muestras fecales, incluido el coste asociado a su aplicación en un programa de vigilancia, y para el diagnóstico *post-mortem* a partir de la válvula

ileocecal (VIC) y los nódulos linfáticos ileocecales (NLIC), incluido un protocolo para la combinación paralela de los resultados de ambos tejidos.

Material y métodos

Para realizar este trabajo se diseñó un estudio transversal utilizando como técnica de referencia la detección de MAP mediante cultivo microbiológico en muestras de tejido intestinal. El estudio se realizó de acuerdo con las directrices de las normas para la notificación de la exactitud diagnóstica (STARD 2015, del inglés, *Standards for Reporting Diagnostic Accuracy*), las cuales permiten mejorar la calidad de los informes de los estudios de precisión diagnóstica (Bossuyt, 2015).

Población objeto de estudio y recogida de muestras

La población diana del estudio fue el ganado sacrificado de rebaños ubicados en el suroeste de España en el periodo 2018-2019. El tamaño de la muestra se calculó con el programa informático Winepi 2.0 (Universidad de Zaragoza, España) para una prevalencia esperada del 15% (R. Whittington et al., 2019), un nivel de confianza del 95% y un error aceptado del 5%. En total se seleccionaron al azar 228 bovinos (10 animales/día). Tras el sacrificio, se solicitaron datos relacionados con el origen de los animales, la edad y la aptitud productiva.

Durante los exámenes veterinarios *post-mortem* rutinarios, de acuerdo con la normativa nacional y europea, se recogieron muestras de VIC, NLIC y heces de animales sacrificados. Las muestras de tejido (VIC y NLIC) se cultivaron inmediatamente después de la recogida, mientras que las muestras fecales se mantuvieron congeladas hasta la extracción de ADN.

Cultivo microbiológico de tejidos VIC e NLIC

El cultivo bacteriano para MAP se realizó en el Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba (LPSACo, Junta de Andalucía). Las muestras de cada tejido fueron procesadas de forma independiente. Brevemente, se introdujeron 4-7 g de cada muestra de tejido en un tubo de 15 ml (Falcon™, Fisher Scientific, Madrid, España) con el mismo volumen (p/v: 1/1) de NaCl estéril al 0,85% y se homogeneizaron hasta obtener una mezcla uniforme utilizando un homogeneizador de tejidos (Fisherbrand™, Fisher Scientific, Madrid, España) con sondas desechables para evitar la contaminación entre muestras (Fisherbrand™ Plastic Disposable Generator Probe, Fisher Scientific, Madrid, España). El homogeneizado se descontaminó con un volumen igual (p/v: 1/1) de solución de cloruro de hexadecilpiridinio al 0,75% (Corner' & Trajstman, 1988) en agitación durante 30 minutos (min) y posterior centrifugación durante 30 min a 1.500 g. El precipitado se cultivó en medios líquidos (MGIT™ 960) utilizando un sistema automatic

BD Bactec™ MGIT™, y en medios sólidos [Agar Yema de Huevo de Herrold con micobactina J y anfotericina B, ácido nalidíxico y vancomicina (ANV) y sin micobactina J y con ANV] (Becton Dickinson, Madrid, España). Tras la incubación, el crecimiento bacteriano compatible con MAP se confirmó mediante qPCR (Timms et al., 2015).

Pruebas qPCR MAP en tejidos y muestras fecales

Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de un homogeneizado tisular y de las muestras fecales utilizando el kit DNA Extract-VK (Vacunek S.L., Bizkaia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las muestras de tejido, se mezclaron 300 mg de homogeneizado con 250 µl de agua destilada estéril, 250 µl de tampón de lisis de muestras VK-SB y 300 mg de microesferas de vidrio de 0,5 mm. La mezcla se disgregó en un disruptor de tejidos (Scientific Industries SI™ Disruptor Genie™, Fisher Scientific, Madrid, España) (30 Hz durante 10 min) y luego se centrifugó a 7.000 g durante 5 min. Posteriormente, se tomó una muestra de 200 µl del sobrenadante resultante y se añadió a un tubo de lisis de PCR conteniendo 25 µl de proteinasa K. A continuación, se realizó una incubación a 56 °C durante 15 min. Después, se agregaron 200 µl de buffer de lisis VL-LB3 y se volvió a incubar a 70 °C durante 10 min. Para precipitar el ADN, se añadieron 210 µl de etanol a la mezcla, que luego se cargó en una columna de purificación de ácidos nucleicos con membrana de sílice. La columna se centrifugó a 11,000 g durante 1 min y se desechó el colector, colocando uno nuevo. Se procedió a centrifugar la columna a 11,000 g durante 1 min dos veces consecutivas, utilizando 500 µl de solución de lavado buffers VK-WB1 y VK-WB2, respectivamente. Finalmente, se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga y se añadieron 90 µl de buffer de elución precalentado a 70 °C en el centro de la membrana de sílice. La muestra se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 11,000 g durante 3 min para obtener el ADN purificado.

En cuanto a las muestras fecales, se realizó la homogeneización de 1 g de muestra utilizando un depresor lingual y 5 ml de agua destilada estéril en un tubo Falcon de 15 ml. La mezcla se homogeneizó mediante vórtex (Scientific Industries Vórtex Genie 2 Mixer, Fisher Scientific, Madrid, España) durante 3 min, se dejó reposar la dilución durante 15 min a temperatura ambiente y luego se pipetearon 500 µl del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Este tubo se centrifugó a 11,000g durante 5 min. Después de desechar el sobrenadante, el sedimento obtenido se suspendió en 250 µl de agua destilada estéril con tampón de lisis de muestras VK-SB y microesferas de vidrio de 0,5 mm, y se siguió el mismo procedimiento descrito para las muestras de tejido.

qPCR

El rendimiento diagnóstico de la qPCR tisular y fecal se realizó con EXOone Paratuberculosis (multiplex) oneMIX (EXOPOL Diagnostic, Zaragoza, España). Este kit contiene una sonda marcada con FAM para la detección del F57, una sonda marcada con Cy5 para la detección del IS900, y una sonda marcada con HEX para la detección del control endógeno (CE) para evitar resultados falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la reacción. Las amplificaciones se realizaron en Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C durante 5 min seguido de 42 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Según los criterios del fabricante, una muestra se consideró MAP-positiva si el ciclo de cuantificación (Cq) IS900 era <33 y F57 Cq <33; MAP no confirmada si IS900 era Cq <33 y F57 Cq >33; y MAP-negativa si IS900 era Cq >33 y F57 Cq >33. Nunca se obtuvo la condición IS900 Cq >33 y F57 Cq <33. Las muestras que no mostraron amplificación del CE se volvieron a analizar haciendo una dilución 1/5 del producto de extracción.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para determinar la validez y utilidad de la qPCR para confirmar y descartar MAP, utilizando diferentes muestras diana (VIC, NLIC y heces). Para determinar el estado de infección de los animales (SE 70% y ES 99%) se empleó el cultivo microbiológico de tejidos intestinales como técnica de referencia (Gilardoni et al., 2012; Timms et al., 2015). Teniendo en cuenta que las dos muestras de tejido se analizaron de forma independiente, se consideró que un animal era positivo a MAP cuando se aisló MAP en al menos una de las muestras de tejido. La prevalencia real de PTBb y el intervalo de confianza del 95% (IC_{95%}) se determinaron mediante el software WinEpi 2.0.

La SE y la ES ajustadas, con un IC_{95%}, se estimaron mediante el programa informático EPIDAT 3.1 (SERGAS, España), siguiendo la fórmula:

$$SE = \frac{(a + b)\beta - b}{(a + c) - (1 - \beta)N} \quad ES = \frac{(c + d)\alpha - c}{N\alpha - (a + c)}$$

Siendo: a = verdadero positivo; b = falso positivo; c = falso negativo; d = verdadero negativo; α = SE de la prueba de referencia; β = ES de la prueba de referencia.

La validez para confirmar la presencia de infección por MAP se estimó a partir de la razón de verosimilitud positiva (RVP) [$RVP = SeD / (1 - EsD)$], mientras que su capacidad para descartarla se estimó con la razón de verosimilitud negativa (RVN) [$RVN = (1 - SeD) / EsD$] según lo establecido por Sackett et al. (2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios para la interpretación de la razón de verosimilitud positiva (RVP) y la razón de verosimilitud negativa (RVN).

RVP	RVN	Interpretación RV
>10	<0.1	La técnica permitirá normalmente discriminar entre animales sanos y enfermos, permitiendo así confirmar y descartar la enfermedad en casi todos los casos.
5-10	0.1-0.2	La capacidad de la técnica para confirmar o descartar la enfermedad sería moderada y su utilidad dependerá de la prevalencia.
2-5	0.2-0.5	La técnica tiene un valor diagnóstico bajo y su utilidad estará muy condicionada por la prevalencia.
1.0-2.0	>0.5	La técnica tiene dificultades para discriminar entre animales sanos y enfermos, por lo que tendría escaso valor diagnóstico.

A partir de los RV, se estimaron el VPP y el VPN (probabilidad posterior a la prueba) para un intervalo de prevalencia de la infección del 0% al 100% (probabilidad previa a la prueba) como sigue (Sackett et al., 2001):

$$VPP = Odds\ post\ "enfermo" / (1 + Odds\ post\ "enfermo")$$

$$VPN = Odds\ post\ "no\ enfermo" / (1 + Odds\ post\ "no\ enfermo")$$

$$Odds\ post = RV * Odds\ pre$$

$$Odds\ pre = Pre\ test\ probabilidad / (1 - Pre\ test\ probabilidad)$$

En el caso de la qPCR en muestras fecales, también se determinó la inversa del VPP frente a la prevalencia para evaluar el coste del sacrificio de verdaderos y falsos positivos por animal verdaderamente enfermo detectado (WOAH, 2019). Los resultados se representaron gráficamente mediante el software GraphPad Prism 9 (California, EEUU), generando una herramienta que permite determinar la utilidad diagnóstica de la prueba en función de la prevalencia de PTBb en la zona (probabilidad pre-test).

Tras establecer la validez y utilidad de la qPCR para cada tejido independiente, se evaluó un protocolo paralelo considerando el resultado de ambos tejidos (VIC+NLIC).

Por último, la concordancia entre las pruebas diagnósticas y la prueba de referencia se evaluó mediante el estadístico Kappa de Cohen (κ) y se interpretó de la siguiente manera: $\kappa = 0,00 - 0,20$, deficiente; $\kappa = 0,21 - 0,40$, débil; $\kappa = 0,41 - 0,60$, moderada; $\kappa = 0,61 - 0,80$, buena; y $\kappa = 0,81 - 1,00$, excelente (McHugh, 2012) Software WinEpi 2.0.

Resultados

Se analizaron heces y tejidos de un total de 228 animales, todos mayores de 6 meses de edad, procedentes de 94 explotaciones del suroeste de España; 127 (55,7%) de vacuno de carne y 101 (44,3%) de vacuno de leche (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución del número de animales positivos a la paratuberculosis bovina según la edad y la técnica de diagnóstico.

Técnica de diagnóstico	Edad (meses)			Animales positivos
	≤12 (n=10)	>12;≤30 (n=12)	>30 (n=206)	
Cultivo tisular (Test de referencia)	0	3	50	53
qPCR VIC*	2	5	56	63
qPCR NLIC	2	4	54	60
qPCR protocolo paralelo tejidos	2	5	69	76
qPCR fecal	0	4	43	47

*VIC, válvula ileocecal; ICLN, nódulo linfático ileocecal

Cultivo microbiológico de tejidos VIC e NLIC

La presencia de MAP se confirmó en 41 (18%) de las 228 muestras de VIC y en 32 (14%) de las 228 muestras de NLIC mediante cultivo microbiológico. Para el estudio, se consideró que un animal era positivo a MAP cuando se detectaba la presencia de la micobacteria en al menos una muestra de tejido, VIC y/o NLIC. Así, 53 de 228 animales se consideraron MAP positivos y 175 MAP negativos. En 20 de los 53 animales positivos (37,7%), se confirmó la presencia de MAP en ambas muestras de tejido, mientras que en 21 (39,6%) y en 12 (22,6%) sólo se detectó MAP en la VIC o el NLIC, respectivamente. La prevalencia real de la infección fue del 32,2% (IC_{95%}: 26,2-38,3%).

Tres de los 53 animales positivos (5,7%) tenían entre 12 y 30 meses y 50 (94,3%) más de 30 meses. En ningún animal menor de 12 meses se detectó la presencia de MAP por cultivo microbiológico (Tabla 2).

Rendimiento diagnóstico de la qPCR multiplex dirigida a IS900/F57 en muestras fecales

La qPCR multiplex en muestras fecales identificó MAP en 47 muestras de los 228 animales (20,6%), todos ellos mayores de 12 meses de edad (Tabla 2). La presencia de MAP no pudo ser confirmada en 10 animales IS900-positivos debido a la ausencia de

amplificación de F57 (Cq >33). Estos animales se consideraron MAP-negativos para los cálculos de validación de la técnica.

Tabla 3. Estimación de las medidas de precisión diagnóstica de la qPCR tisular y fecal

	qPCR	Cultivo microbiológico		Total	Medidas de precisión diagnóstica (IC _{95%})				
		+ ^a	-		%SeD	%EsD	RVP	RVN	κ
VIC	+	37	26	63	71.7	93.3	10.8	0.3	0.516
	-	16	149	165	(58.2-84.1)	(86.5-100.0)	(0.0-69.3)	(0.2-0.5)	Moderada
	<i>Total</i>	53	175	228					
NLIC	+	31	29	60	59.9	89.7	5.8	0.5	0.401
	-	22	146	168	(46.3-74.0)	(82.9-96.6)	(3.1-18.7)	(0.3-0.6)	Moderada
	<i>Total</i>	53	175	228					
Protocolo paralelo tejidos ^b	+	42	34	76	81.3	89.5	7.7	0.2	0.520
	-	11	141	152	(69.5-92.7)	(82.1-97.4)	(4.1-26.8)	(0.1-0.4)	Moderada
	<i>Total</i>	53	175	228					
Fecal	+	26	21	47	50.3	93.5	7.8	0.5	0.386
	-	27	154	181	(36.4-64.6)	(87.5-99.9)	(2.5-48.1)	(0.4-0.7)	Débil
	<i>Total</i>	53	175	228					

+: positivo; -: negativo; qPCR: PCR en tiempo real; SeD: sensibilidad diagnóstica; EsD: especificidad diagnóstica; RVP: razón de verosimilitud positiva; RVN: razón de verosimilitud negativa; κ: concordancia; IC_{95%}: intervalo de confianza del 95%; ICV: válvula ileocecal; ICLN: nódulo linfático ileocecal. ^aUn animal se considera positivo si presenta crecimiento microbiológico de MAP confirmado por qPCR en al menos uno de los dos tejidos analizados. ^bUn animal se considera positivo si se detecta ADN de MAP en al menos uno de los dos tejidos analizados.

En comparación con la prueba de referencia, la qPCR fecal clasificó correctamente 26 de 53 animales positivos a MAP (SE ajustada 50,3% IC_{95%}: 36,4-64,6%) y 154 de 175 animales negativos a MAP (ES ajustada 93,5% IC_{95%}: 87,5-99,9%). Según estos datos, el valor diagnóstico de la prueba en muestras fecales sería moderado para confirmar la enfermedad (RVP 7,8) y bajo para descartar la infección por MAP (RVN 0,5) (Tabla 3). La credibilidad de los resultados positivos de la qPCR en muestras fecales será inferior al 30% en áreas con una prevalencia individual de PTBb de 0 a 5%; del 46-58% en áreas con una prevalencia individual del 10 al 15% y mayor al 60% en áreas con una prevalencia mayor al 15% (Figura 1). Por otro lado, los resultados negativos tendrán una credibilidad mayor o igual al 92% en áreas con una prevalencia individual

entre el 0% y el 15% (Figura 2). Finalmente, se observó una concordancia débil entre la prueba de referencia y el ensayo de qPCR fecal ($\kappa = 0,386$) (Tabla 3).

En cuanto al coste asociado al sacrificio de animales positivos, estimado a partir de la inversa del VPP, observamos que en zonas de baja prevalencia (<5%) se sacrificarían entre 3 y 13 animales positivos por cada animal realmente infectado detectado. Por el contrario, en zonas con una prevalencia superior al 20% la credibilidad de este resultado sería superior al 70 % y se sacrificarían como máximo 1,5 animales por cada animal verdaderamente infectado.

Rendimiento diagnóstico de la qPCR multiplex dirigida a IS900/F57 con diferentes muestras de tejido

Se detectó ADN de MAP mediante qPCR en 63 (27,6%) de 228 muestras de VIC y 60 (26,31%) de 228 muestras de NLIC, incluidos 2 animales menores de 12 meses (Tabla 2). Por otro lado, en 8 muestras de tejido (5 VIC y 3 NLIC) de 7 animales, no se pudo confirmar la presencia de MAP (IS900 Cq <33 y F57 Cq >33).

Se calcularon los valores SE y ES ajustados de la qPCR multiplex (Tabla 3). La prueba mostró la mayor precisión diagnóstica cuando se analizaron muestras de VIC (SE ajustada 71,7% y ES 93,3%). Basándonos en los valores obtenidos para el RVP (≥ 10), la detección de ADN de MAP en VIC tendría un alto valor diagnóstico para confirmar la enfermedad. La credibilidad de un resultado positivo (VPP) en la muestra de VIC será <36% en áreas con una prevalencia individual entre el 0 y el 5% y >65% si la prevalencia es >15% (Figura 1). En el caso de resultados negativos, las RVNs obtenidas para ambas muestras (VIC 0,3; NLIC 0,5) implican una baja capacidad para descartar la enfermedad, por lo que la utilidad del diagnóstico por qPCR dependerá en gran medida de la prevalencia de la zona (Figura 2).

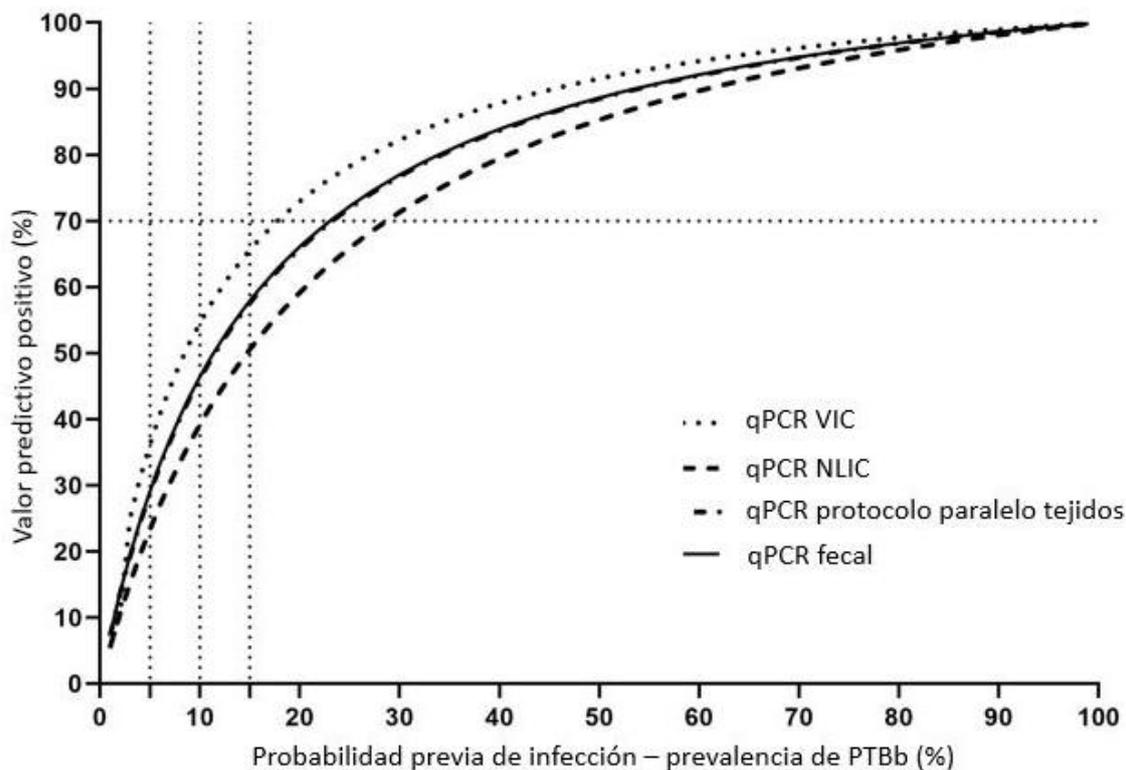


Figura 1. Representación gráfica del valor predictivo positivo estimado en función de la validez de las pruebas y de la prevalencia de la paratuberculosis bovina.

Una vez validada la qPCR para cada una de las muestras tisulares, se evaluó el rendimiento diagnóstico de un protocolo en paralelo que combinaba ambos resultados con el objetivo de aumentar la SE. Según este protocolo de qPCR, 76 (33,3%) de 228 animales se consideraron positivos para MAP, mientras que 152 se clasificaron como negativos (66,7%). Un total de 42 animales se consideraron verdaderos positivos cuando se utilizó el protocolo en paralelo de qPCR, obteniéndose una SE ajustada del 81,3% (CI_{95%}: 69,5-92,7%). Por otra parte, un total de 34 animales se clasificaron como falsos positivos, obteniendo una ES ajustada del 89,5% (IC 95%: 82,1-97,4%) para el protocolo en paralelo. La RVN disminuyó de 0,3 a 0,2 (Tabla 3), y un resultado negativo en el protocolo paralelo permitiría descartar PTBb con una certeza >96% en prevalencias ≤15% (Figura 2). La RVP obtenida para este protocolo fue moderada (7,7) (Tabla 3), y no se observó ninguna ventaja en la utilidad de los resultados positivos con respecto al análisis individual de la VIC (Figura 1).

La concordancia entre el cultivo microbiológico (prueba de referencia) y la qPCR multiplex fue moderada tanto en la prueba de tejido individual como en el protocolo paralelo ($\kappa = 0,40-0,52$) (Tabla 3).

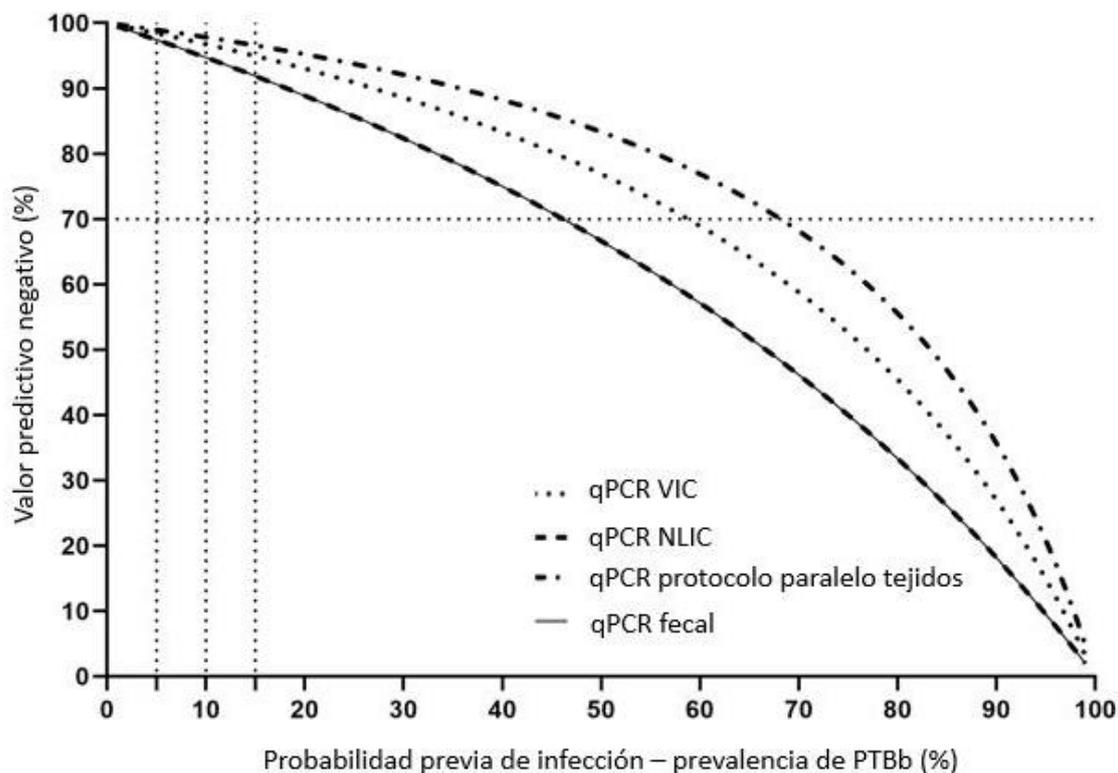


Figura 2. Representación gráfica del valor predictivo negativo estimado en función de la validez de las pruebas y de la prevalencia de la paratuberculosis bovina.

Discusión

El diagnóstico de animales subclínicos en el control de la PTBb representa un reto debido a la limitada SE de las técnicas de diagnóstico *ante-mortem*. El diagnóstico *post-mortem*, basado en el análisis del tejido intestinal, muestra una SE más alta y podría ser una buena estrategia para la clasificación de los rebaños y mejorar el control de la PTBb (McAloon et al., 2019b). La qPCR se ha posicionado como una técnica de diagnóstico más ventajosa que el cultivo microbiológico. Presenta una elevada precisión diagnóstica y puede utilizarse tanto para muestras fecales como tisulares, entre otras muestras (Barkema et al., 2018; Prendergast et al., 2018). Sin embargo, la excreción tardía e intermitente de MAP y su distribución aleatoria y dispersa a lo largo del intestino son factores que afectan la precisión diagnóstica de esta técnica y, en consecuencia, la eficacia de su aplicación como estrategia de control de la enfermedad (Ayele et al., 2004; Barkema et al., 2018).

Las heces son la matriz más utilizada, ya que permiten un muestreo no invasivo (Gilardoni et al., 2012; R. Whittington et al., 2019). La detección de MAP en muestras fecales mediante cultivo microbiológico es el método habitual para confirmar el diagnóstico de PTBb. Sin embargo, esta técnica solo detecta animales en fases avanzadas

de la enfermedad (McAloon et al., 2019b), por lo que su SE puede oscilar entre el 23% y el 74% (S. S. Nielsen & Toft, 2008). Ensayos previos para validar esta prueba compararon la qPCR con el cultivo fecal, reflejando una SE en muestras individuales del 73,5% al 96% (Prendergast et al., 2018). Estos resultados difieren notablemente de los obtenidos en este estudio, utilizando el cultivo de tejido intestinal como prueba de referencia (SE 50,3%) (McKenna et al., 2005). En base a la ES (93,5%) y a las RVs estimadas (RVP 7,8 y RVN 0,5), la capacidad de la qPCR para confirmar y descartar la infección por MAP en muestras fecales sería moderada y baja, respectivamente. La credibilidad de sus resultados estaría condicionada por la prevalencia de PTBb en la zona o rebaño. Así, en zonas con una prevalencia individual de PTBb superior al 23%, los resultados positivos de qPCR en muestras fecales tendrían una credibilidad superior al 70% y se sacrificaría un máximo de 1,5 animales por cada animal realmente infectado, lo que la convertiría en una herramienta útil para el control y erradicación de la enfermedad. Por el contrario, en zonas de baja prevalencia (<5%), la credibilidad de este resultado sería inferior al 29% y se sacrificarían entre 3 y 13 animales positivos por cada animal realmente infectado detectado, lo que requeriría un protocolo con mayor ES (WOAH, 2019). En caso de resultados negativos, la qPCR permitiría descartar la PTBb con más del 90% de confianza en rebaños con tasas de infección entre el 0 y el 19 por ciento y sería muy útil para certificar la ausencia de infección. Sin embargo, en rebaños con una alta prevalencia de infección (>46%), la credibilidad de un resultado negativo sería menor o igual al 70%, por lo que la probabilidad de mantener un animal infectado en la explotación sería considerable.

Por otra parte, el análisis del tejido intestinal permite detectar animales infectados de forma subclínica. Aunque el cultivo microbiológico es la prueba estándar para identificar MAP a partir de tejido intestinal (Dane et al., 2023) la qPCR es hoy en día la mejor opción para el diagnóstico *post-mortem*, detectando la presencia de MAP en animales jóvenes, menores de 12 meses de edad. Sin embargo, al tratarse de un método de muestreo invasivo, su aplicación se limita a la confirmación del diagnóstico en animales después del sacrificio y en el contexto de la vigilancia pasiva en mataderos (Karuppusamy et al., 2021). No obstante, puede ser una herramienta útil para confirmar el estatus negativo de los rebaños mediante el análisis a lo largo del tiempo de los animales sacrificados por el rebaño en cuestión. Conocer el estatus de PTBb del rebaño es esencial para prevenir la transmisión de la enfermedad entre rebaños a través de la introducción de animales portadores y para certificar el estatus de paratuberculosis con fines de seguridad alimentaria y exportación, lo que se traduce en una mayor confianza en los productos comercializados (R. Whittington et al., 2019).

La validez y utilidad de la qPCR tisular varió en función del tejido utilizado. La SE y la ES fueron mayores con VIC (71,7% y 93,3%) que con NLIC (59,9% y 89,7%),

aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$). Esta variación en la precisión de la técnica en función de la muestra también fue descrita por Hasonova et al. (2009) para el cultivo microbiológico, detectándose un 1,5% más de animales infectados en las muestras de VIC que en las de NLIC. En el caso de VIC, la validez obtenida en nuestro trabajo fue similar a la descrita previamente para cultivo microbiológico (SE 70% y ES 99%) (Gilardoni et al., 2012; Timms et al., 2015). La ES de la qPCR tisular se mantuvo por debajo del 95%, como consecuencia de un elevado número de muestras con cultivo negativo que dieron positivo por qPCR multiplex. Con el protocolo en paralelo, la SE de la qPCR aumentó al 81,3% (IC_{95%}: 69,5-92,7%), pero la ES disminuyó al 89,5% (IC_{95%}: 82,1-97,4%). En cuanto a la idoneidad de la técnica para detectar animales infectados (SE) con el menor número posible de falsos positivos (1-ES), el protocolo más adecuado sería la qPCR en muestras de VIC (RVP 10,8). Un resultado positivo de VIC mediante qPCR permitiría confirmar la infección por MAP con una credibilidad mayor o igual al 70% en áreas con una prevalencia de infección mayor o igual al 18%, independientemente de que el animal muestre signos clínicos o lesiones compatibles. Sin embargo, con las tasas de infección habituales (5-15%), la credibilidad del resultado positivo en animales subclínicos oscilaría entre el 36% y el 65%. En el caso de un animal que muestre signos clínicos o lesiones compatibles con PTBb, un resultado positivo derivado del análisis de una muestra de VIC mediante qPCR confirmaría la enfermedad con una alta credibilidad.

La comparación de los resultados obtenidos en muestras de tejido intestinal mediante qPCR y cultivo microbiológico mostró una mayor capacidad de la qPCR para detectar animales positivos (Butot et al., 2019; Prendergast et al., 2018). Aunque para la validación de la técnica estos animales se consideraron falsos positivos, se obtuvieron más resultados positivos por qPCR fecal, siendo una limitación de este estudio la falta de confirmación por secuenciación genómica. Asimismo, también se observó que el hecho de utilizar qPCR múltiple limitaba la SE de la técnica, ya que la mayoría de las muestras de tejido y heces que mostraron amplificación de la diana IS900 y ausencia de amplificación de la diana F57 fueron confirmadas por cultivo. Según las recomendaciones del fabricante, estos resultados no permitirían confirmar la presencia de MAP, sin embargo, son característicos de muestras con baja carga bacteriana y no se asocian a una falta de ES de la diana IS900 (Möbius et al., 2008; Sidoti et al., 2011).

La PTBb en la explotación de origen puede limitar el comercio internacional de productos animales. En la actualidad, no existen recomendaciones oficiales para llevar a cabo la certificación del estatus sanitario del rebaño, y es el veterinario de la explotación quien debe certificar la ausencia de la enfermedad basándose en la ausencia de signos clínicos y pruebas diagnósticas negativas (R. Whittington et al., 2019). Basándose en los valores de RVP, se podría implementar un sistema de vigilancia en los mataderos para

descartar la enfermedad en los animales sacrificados. Los mejores resultados se obtendrían aplicando la qPCR en paralelo sobre muestras de VIC e NLIC (RVN 0,2). La validez de la prueba para este fin es alta, permitiendo descartar la enfermedad con una confianza >95% en animales procedentes de zonas con una prevalencia de infección del 0-25%. Al conocer la situación del rebaño, se pueden aplicar medidas de control adecuadas para minimizar cualquier riesgo potencial de transmisión y garantizar la seguridad de los consumidores, además de contribuir a mantener la reputación de la industria láctea (Hosseiniporgham et al., 2020).

Conclusiones

Se ha demostrado la idoneidad de la qPCR fecal para la identificación de la infección por MAP en animales vivos. Además, cabe destacar la idoneidad de la qPCR para el diagnóstico *post-mortem* en muestras de VIC para confirmar la infección por MAP y el protocolo paralelo con VIC e NLIC para descartarla. Los resultados obtenidos aportan información sobre el valor diagnóstico y la utilidad de la qPCR en muestras fecales y tisulares, en función de la prevalencia de la enfermedad en la zona o el rebaño.

Estudio II.

EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA SEROLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS EN RELACIÓN CON SU ESTADO FRENTE A LA TUBERCULOSIS.

Francisco Jurado-Martos, Fernando Cardoso-Toset, Carmen Tarradas, Ángela Galán-Relaño, José María Sánchez-Carvajal, Inés Ruedas-Torres, Eduardo Vera-Salmoral, Fernanda Larenas-Muñoz, Librado Carrasco, Jaime Gómez-Laguna, Belén Huerta Lorenzo, Inmaculada Luque.

Aceptado para publicación en *Veterinary Record* (2023)

EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA SEROLÓGICA PARA LA DETECCIÓN DE LA PARATUBERCULOSIS EN BOVINOS EN RELACIÓN CON SU ESTADO FRENTE A LA TUBERCULOSIS.

Francisco Jurado-Martos^{1,2*}, Fernando Cardoso-Toset¹, Carmen Tarradas^{2,4}, Ángela Galán-Relaño², José María Sánchez-Carvajal³, Inés Ruedas-Torres³, Eduardo Vera-Salmoral², Fernanda Larenas-Muñoz³, Librado Carrasco^{3,4}, Jaime Gómez-Laguna^{3,4}, Belén Huerta Lorenzo^{2,4‡}, Inmaculada Luque^{2,4‡}.

¹*CICAP-Centro Tecnológico Agroalimentario, Pozoblanco, Córdoba, España.*

²*Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, España.*

³*Departamento de Anatomía y Patología Comparada y Toxicología, Grupo de Patología e Inmunología (UCO-PIG), Universidad de Córdoba, España.*

⁴*UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario 'ceiA3', Universidad de Córdoba, Córdoba, España*

[‡] *Estos autores han contribuido a partes iguales a este trabajo y comparten la dirección principal del trabajo.*

Palabras clave: ELISA, paratuberculosis, tuberculosis, interferencia diagnóstica, utilidad diagnóstica, valor diagnóstico.

Resumen

Antecedentes. La prueba ELISA es la herramienta de diagnóstico más utilizada en la lucha contra la paratuberculosis bovina (PTBb), aunque su precisión diagnóstica puede verse comprometida por la tuberculosis bovina (TBb).

Métodos. Se determinó el estado de infección frente a PTBb y TBb de 228 bovinos utilizando el cultivo microbiológico de tejidos como técnica de referencia. Se evaluó el rendimiento diagnóstico (sensibilidad, especificidad, cocientes de probabilidad y valores predictivos) de la prueba ELISA-PTBb en muestras de suero sanguíneo, teniendo en cuenta la prevalencia de la PTBb en los animales de la zona y la situación de los animales respecto a la TBb.

Resultados. Para el ELISA-PTBb se obtuvo una sensibilidad del 40,7% (IC 95%: 27,5-53,9%) y una especificidad del 94,7% (IC 95%: 91,4-98,0%) en el total de animales. Un animal positivo al ELISA-PTBb tendría una probabilidad $\geq 70\%$ de estar infectado en zonas con una prevalencia de PTBb $\geq 23\%$. Un resultado negativo al ELISA-PTBb, en zonas con una prevalencia de PTBb $\leq 41\%$, descartaría la enfermedad con más del 70% de certeza. En animales positivos a PTBb, la sensibilidad aumentó [94,4% (IC 95%: 81,4-

100%) frente a 25,1% (IC 95%: 11,8-38,4%)] y la especificidad disminuyó [82,6% (IC 95%: 71,8-93,4%) frente a 99,4% (IC 95%: 98,0-100%)]. La prueba ELISA-PTBb es una buena herramienta para descartar la coinfección por PTBb en animales positivos a TBb, mientras que en animales negativos a TBb permite confirmar la enfermedad con una probabilidad >70% si la prevalencia de la enfermedad es $\geq 6\%$.

Limitaciones. Las diferencias observadas podrían verse aumentadas por el efecto de la aplicación frecuente de la intradermotuberculinización (SIT), desconocida en los animales estudiados.

Conclusiones. Estos resultados proporcionan una orientación útil para la aplicación e interpretación del ELISA como herramienta para el control de la PTBb.

Introducción

La paratuberculosis bovina (PTBb), también llamada enfermedad de Johne, es una enfermedad de los rumiantes domésticos y salvajes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que provoca una enteritis granulomatosa crónica, caracterizada por diarrea intermitente, pérdida grave de peso y muerte. Causa importantes pérdidas económicas a los ganaderos, repercute en el bienestar de los animales y suscita preocupación en la salud pública, ya que puede estar implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes humanas, como la enfermedad de Crohn, siendo los productos lácteos y la carne las principales fuentes de infección para el ser humano (Barkema et al., 2018; Kuenstner et al., 2017; R. Whittington et al., 2019). Existe una alta prevalencia mundial de PTBb, que puede ser superior al 50% a nivel de rebaño en muchos países europeos. En consecuencia, cada vez más países están aplicando programas de control frente a esta enfermedad (Jain et al., 2022; S. S. Nielsen & Toft, 2009; R. Whittington et al., 2019).

Aunque se han desarrollado vacunas que ayudarían a controlar la infección por MAP, su uso está restringido o prohibido en la mayoría de los países, debido a la posible interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis bovina (TBb), causada por las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (Juste et al., 2021a; McAloon et al., 2019b). Actualmente, el control de la PTBb se basa en estrategias de diagnóstico y sacrificio de los animales infectados que excretan MAP, y en la aplicación de medidas higiénicas para prevenir la infección de los terneros (McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019).

La complejidad para detectar MAP, ya sea mediante cultivo o PCR en tiempo real [también llamada PCR cuantitativa (qPCR)], así como la dificultad de aplicar estas herramientas de forma rutinaria, ha llevado al uso generalizado de pruebas de diagnóstico serológico. El ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA) es una herramienta

diagnóstica rápida y rentable para el seguimiento de la PTBb, que permite el análisis de un gran número de muestras (Blanco Vázquez et al., 2020; Gilardoni et al., 2012; Jain et al., 2022; McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019). Sin embargo, la precisión diagnóstica de la técnica se ve afectada por varios factores, que pueden dificultar la interpretación de los resultados (Barden et al., 2020; Blanco Vázquez et al., 2020; McKenna et al., 2005). Los valores de sensibilidad (SE) obtenidos en estudios previos para la técnica ELISA frente a la PTBb oscilan entre el 7-94%, diferencias que han sido relacionadas con el estadio de la infección (5,8,12). Por otra parte, los valores de especificidad (ES) publicados oscilan entre el 40-100%, diferencias relacionadas principalmente con la exposición a micobacterias no tuberculosas (MNT), la coinfección con micobacterias del CMT o la realización previa de la prueba SIT (Barden et al., 2020; Kennedy et al., 2014; W. Lilenbaum et al., 2009; Walter Lilenbaum et al., 2007; S. S. Nielsen & Toft, 2008; C. Picasso-Risso et al., 2019; Vargas et al., 2009).

Estudios previos han demostrado que MNT, donde se incluye *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, y los miembros del CMT, incluido *Mycobacterium bovis*, comparten proteínas estructurales y factores de virulencia (Abdallah et al., 2007; Vargas et al., 2009). Lejos de ser una ventaja para el control de ambas enfermedades, la homología de estructuras que representan sus dianas diagnósticas genera interferencias cruzadas que comprometen la precisión diagnóstica de las pruebas (McAloon et al., 2019b; S. S. Nielsen & Toft, 2008). En este sentido, se ha descrito que la infección por MAP o la exposición a MNT ambientales afectan a la precisión diagnóstica de las pruebas de cribado de la TBb (Julio Álvarez et al., 2009; Raffo et al., 2017). Sin embargo, pocos estudios han determinado la interferencia de la infección por micobacterias del CMT con el diagnóstico serológico de MAP en condiciones de campo. Así, se ha sugerido que el kit comercial IDEXX ELISA-PTBb no puede distinguir entre animales infectados por TBb y PTBb (Olsen et al., 2001) a pesar de incluir un paso de preincubación con *Mycobacterium phlei* para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada y mejorar la ES de la prueba (Bech-Nielsen et al., 1992). Otros autores describen que los animales sometidos a inoculaciones frecuentes y repetidas de proteínas derivadas de *M. bovis* (PPD bovina), como parte de la prueba SIT, tienen una alta probabilidad de positividad en el ELISA frente a PTBb (Julio Álvarez et al., 2009; W. Lilenbaum et al., 2009; C. Picasso-Risso et al., 2019). Esto dificulta la interpretación de los resultados de esta técnica en zonas donde coexisten ambas enfermedades.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la precisión diagnóstica y la utilidad de un ELISA para el diagnóstico de PTBb considerando una posible interferencia de la infección por micobacterias del CMT (TBb), con el fin de mejorar la relevancia y la interpretación de los resultados de la prueba ELISA.

Material y métodos

Población del estudio y muestreo

Para realizar este estudio, se incluyeron un total de 228 bovinos sacrificados durante los años 2018-2019 en el marco del programa nacional español de erradicación de la TBb en Andalucía, región del sur de España (*Real Decreto 2611/1996, de 20 de Diciembre, Por El Que Se Regulan Los Programas Nacionales de Erradicación de Enfermedades de Los Animales.*, 1996). Ningún animal fue sacrificado para este estudio, por lo que no se requirió aprobación ética ni consentimiento del ganadero.

Según el resultado de la prueba SIT, se seleccionaron aleatoriamente un total de 137 animales SIT positivos y 91 SIT negativos. Se registraron datos sobre el origen de los animales, su edad y su aptitud (cárnica o lechera). Los 228 animales incluidos en el estudio procedían de 94 explotaciones situadas en el suroeste de España, correspondiendo 127/228 animales a vacuno de carne y 101/228 a vacuno de leche. Todos ellos eran mayores de 6 meses (≤ 12 meses $n = 10$; $> 12 \leq 30$ meses $n = 12$; > 30 meses $n = 206$).

De cada animal se recogieron asépticamente muestras de nódulos linfáticos retrofaríngeos, traqueobronquiales, mesentéricos e ileocecales, así como de la válvula ileocecal. Las muestras de tejido se recogieron independientemente en recipientes estériles y se procesaron para cultivo el mismo día de la recogida de muestras. Además, para el diagnóstico serológico de PTBb, se tomaron muestras de sangre durante el sangrado de los animales en tubos Vacutainer® estériles sin anticoagulante (Vacuette, Kremsmunster, Austria). El suero se separó tras la coagulación por centrifugación [2.500 g durante 20 minutos (min)] (Blanco Vázquez et al., 2020) y se conservó a 20°C hasta su análisis.

Cultivo bacteriológico de tejidos

El estado de infección por MAP se determinó mediante cultivo microbiológico de los nódulos linfáticos ileocecales y de la válvula ileocecal, y el estado de infección por micobacterias del CMT se determinó mediante cultivo microbiológico de nódulos linfáticos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mesentéricos de forma individual. De los 228 bovinos, se cultivaron 456 (dos muestras/animal) y 684 (tres muestras/animal) muestras de tejido para el diagnóstico de PTBb y TBb, respectivamente. El cultivo bacteriano selectivo para MAP y CMT se realizó en el Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba (LPSACo, Junta de Andalucía).

Brevemente, se colocaron 4-7 g de cada tejido en un tubo de 15 ml (Falcon™) con el mismo volumen (p/v: 1/1) de NaCl estéril al 0,85% y se trituró hasta obtener una mezcla homogénea utilizando un homogeneizador de tejidos (Fisherbrand, Fisher Scientific,

Madrid, España) con sondas desechables para evitar la contaminación entre muestras (Fisherbrand™ Plastic Disposable Generator Probe, Fisher Scientific). El homogeneizado se descontaminó con un volumen igual de solución de cloruro de hexadecilpiridinio al 0,75 (p/v: 1/1) en agitación durante 30 min. (Corner' & Trajstman, 1988). Las muestras se centrifugaron durante 30 min a 1.500 g. Los pellets se recogieron con torundas y se cultivaron en medio sólido [Agar Yema de Huevo de Herrold con micobactina J y Anfotericina B, Ácido Nalidíxico y Vancomicina (ANV) y sin micobactina J y con ANV] (Becton Dickinson, Madrid, España) para el aislamiento de MAP y en medio líquido (MGIT™ 960) utilizando un sistema automatizado BD Bacter™ MGIT™ System para el aislamiento de MTC. Los cultivos se consideraron positivos para PTBb o TBb cuando los aislados se identificaron como MAP o MTC mediante qPCR respectivamente (Thierry et al., 1990; Wilton & Cousins, 1992).

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos de MAP

Todas las muestras de suero se analizaron en los laboratorios de CICAP, sin conocer el resultado de las pruebas de referencia y utilizando el kit comercial *Mycobacterium paratuberculosis* Antibody ELISA Test (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante, incluida una fase inicial de preabsorción de plasma con *Mycobacterium phlei* para eliminar los anticuerpos de reacción cruzada (Bech-Nielsen et al., 1992). La densidad óptica (DO) en cada pocillo se midió a 450 nm utilizando un lector de absorbancia de microplacas iMARK™ ELISA (Bio-Rad, California, EE. UU). Los resultados se expresaron calculando la relación muestra/positivo (S/P) según la fórmula siguiente $S/P = 100 \times [(OD \text{ muestra} - OD \text{ control negativo}) / (OD \text{ control positivo} - OD \text{ control negativo})]$. Aquellos con valores de $S/P \geq 55\%$ se clasificaron como positivos, aquellos con valores $55\% < S/P < 45\%$ se clasificaron como dudosos y aquellos con valores de $S/P \leq 45\%$ se clasificaron como negativos. Los resultados dudosos se consideraron negativos en aquellos animales procedentes de explotaciones sin antecedentes de PTBb clínica en los últimos 5 años y sin lesiones macroscópicas de PTBb.

Análisis estadístico

La precisión diagnóstica del ELISA-PTBb [SE y ES ajustados con un intervalo de confianza (IC) del 95%], se calculó utilizando el cultivo microbiológico de tejidos (nódulos linfáticos ileocecales y válvula ileocecal) como técnica de referencia imperfecta (SE 70% y ES 99%) (8,10,24).

Se utilizó el programa informático EPIDAT 3.1 (Servicio Gallego de Salud, España) para realizar los cálculos mediante la siguiente fórmula:

$$SE = \frac{(a + b)\beta - b}{(a + c) - (1 - \beta)N} \quad ES = \frac{(c + d)\alpha - c}{N\alpha - (a + c)}$$

Siendo: a = verdadero positivo; b = falso positivo; c = falso negativo; d = verdadero negativo; α = SE de la prueba de referencia; β = ES de la prueba de referencia.

Para evaluar el efecto de la TBb en la precisión de la prueba ELISA para PTBb, se compararon el SE y el ES en animales con y sin cultivo positivo para TBb según su IC del 95%. Además, se estimaron e interpretaron los cocientes de probabilidad para los resultados positivos (LRP) y negativos (LRN) siguiendo los criterios previamente publicados (Sackett et al., 2001): $PRL \geq 10$ o $LRN \leq 0,1$, técnica de alto valor diagnóstico que normalmente permitirá discriminar entre animales sanos y enfermos; $5 \leq PRL < 10$ o $0,1 < LRN \leq 0,2$, técnica que implica cambios moderados en la probabilidad y cuya utilidad diagnóstica dependerá de la prevalencia a nivel animal; $2 \leq PRL < 5$ o $0,2 < LRN \leq 0,5$, técnica que implica pequeños cambios en la probabilidad y cuya utilidad diagnóstica dependerá de la probabilidad previa; $1 \leq LRP < 2$ o $LRN > 0,5$, cambios raramente discernibles. A partir de los LR, se estimaron posteriormente los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) para diferentes niveles de prevalencia de PTBb en animales utilizando metodología bayesiana (EPIDAT 3.1). Los resultados se representaron gráficamente mediante el programa GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Prism software 9.0, California, EE.UU.).

Por último, el área bajo la curva (AUC) y el valor de corte óptimo de la prueba PTBb-ELISA, para animales positivos y negativos a TBb, se determinó mediante el análisis de la curva ROC (Blanco Vázquez et al., 2020). Los valores de corte óptimos para SE y ES se basaron en el índice de Youden máximo (J). Se consideraron: Valores de $AUC \geq 0,9$, la prueba tiene un excelente poder discriminatorio; $0,8 \leq AUC < 0,9$ buen poder discriminatorio; $0,7 \leq AUC < 0,8$ poder discriminatorio justo; y $AUC < 0,7$ mala discriminación. Los cálculos se realizaron mediante el programa informático SPSS (Park et al., 2017).

Resultados

El cultivo microbiológico de los nódulos linfáticos ileocecales y de la válvula ileocecal detectó MAP en 53 (23,3%) animales, siendo 17 (32,1%) positivos a la SIT. Por otra parte, se detectó CMT mediante cultivo microbiológico de nódulos linfáticos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mesentéricos en 59 (25,9%) animales, de ellos 51 (86,4%) eran positivos a la SIT.

Se detectó coinfección de ambas enfermedades en 12 de los 228 animales (5,3%), 41 fueron positivos sólo a PTBb y 47 a TBb, mientras que 128 animales fueron negativos a ambas enfermedades.

Rendimiento diagnóstico del ELISA frente a PTBb

De las 228 muestras de suero sanguíneo analizadas, el ELISA-PTBb detectó la presencia de anticuerpos frente a MAP en 38 animales (16,7%); 3 animales resultaron dudosos (1,3%) y se consideraron negativos. Considerando el aislamiento microbiológico de MAP como técnica de referencia, el ELISA clasificó correctamente 21 de los 53 animales positivos al cultivo de MAP [SE ajustada 40,7% (IC 95%: 27,5-53,9%)] y 158 de los 175 animales negativos al mismo [SE ajustada 94,7% (IC 95%: 91,4-98,0%)] (Tabla 1).

Tabla 1. Estimación de las medidas de precisión diagnóstica de bPTB-ELISA.

Estatus TBb	ELISA	Cultivo MAP		Total	Valores precisión diagnóstica (Intervalo de confianza del 95%)			
		+ [†]	-		SE	SP	LRP	LRN
Total animales (n=228)	+	21	17	38	40.7% (27.5-53.9)	94.7% (91.4-98.0)	7.7 (3.2-26.9)	0.6 (0.5-0.8)
	-	32	158	190				
	Total	53	175	228				
Animales TBb + [‡] (n=59)	+	11	12	23	94.4% (81.4-100.0)	82.6% (71.8-93.4)	5.4 (2.9-15.1)	0.1 (0-0.26)
	-	1	35	36				
	Total	12	47	59				
Animales TBb - (n=169)	+	10	5	15	25.1% (11.8-38.4)	99.4% (98.0-100.0)	38.7 (5.9-∞)	0.8 (0.61-0.9)
	-	31	123	154				
	Total	41	128	169				

MAP, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; bTB, tuberculosis bovina; +, positivo; -, negativo; SE, sensibilidad; SP, especificidad; LRP, cocientes de probabilidad positivos; LRN, cocientes de probabilidad negativos. [†]Un animal se considera positivo si se obtuvo crecimiento microbiológico de PAM en al menos uno de los dos tejidos analizados. [‡] Un animal se considera positivo si se obtuvo crecimiento microbiológico de *Mycobacterium bovis* en al menos uno de los tres tejidos analizados.

Basándonos en la RVP [7,7 (IC 95%: 3,2-26,9)], el valor diagnóstico del ELISA-PTBb se considera moderado, y la probabilidad del resultado depende de la prevalencia. Así, en zonas con una prevalencia individual de PTBb igual o superior al 23%, un animal positivo a ELISA-PTBb tendría una probabilidad *post-prueba* de estar infectado por MAP muy alta ($\geq 70\%$) (Figura 1). En el caso de un resultado PTBb-ELISA-negativo raramente implicará cambios perceptibles en la probabilidad de infección previa a la prueba [LRN = 0,6 (IC 95%: 0,5-0,8)]. Así, con una prevalencia de PTBb a nivel animal $\leq 41\%$, la enfermedad podría descartarse con una seguridad superior al 70% (Figura 2).

También se determinó el rendimiento diagnóstico de la prueba ELISA para PTBb en función del estado de los animales respecto a la TBb. La capacidad de ELISA para detectar animales seropositivos a la PTBb fue significativamente mayor en los animales seropositivos a la TBb [SE ajustada: 94,4% (IC 95%: 81,4-100,0%)] que en los animales seronegativos a la TBb [SE ajustada: 25,1% (IC 95%: 11,8-38,4%)]. En cambio, la ES fue significativamente mayor en los animales TBb- [99,4% (IC 95%: 98,0-100,0%)] que en los TBb+ [82,6% (IC 95%: 71,8-93,5%)] (Tabla 1).

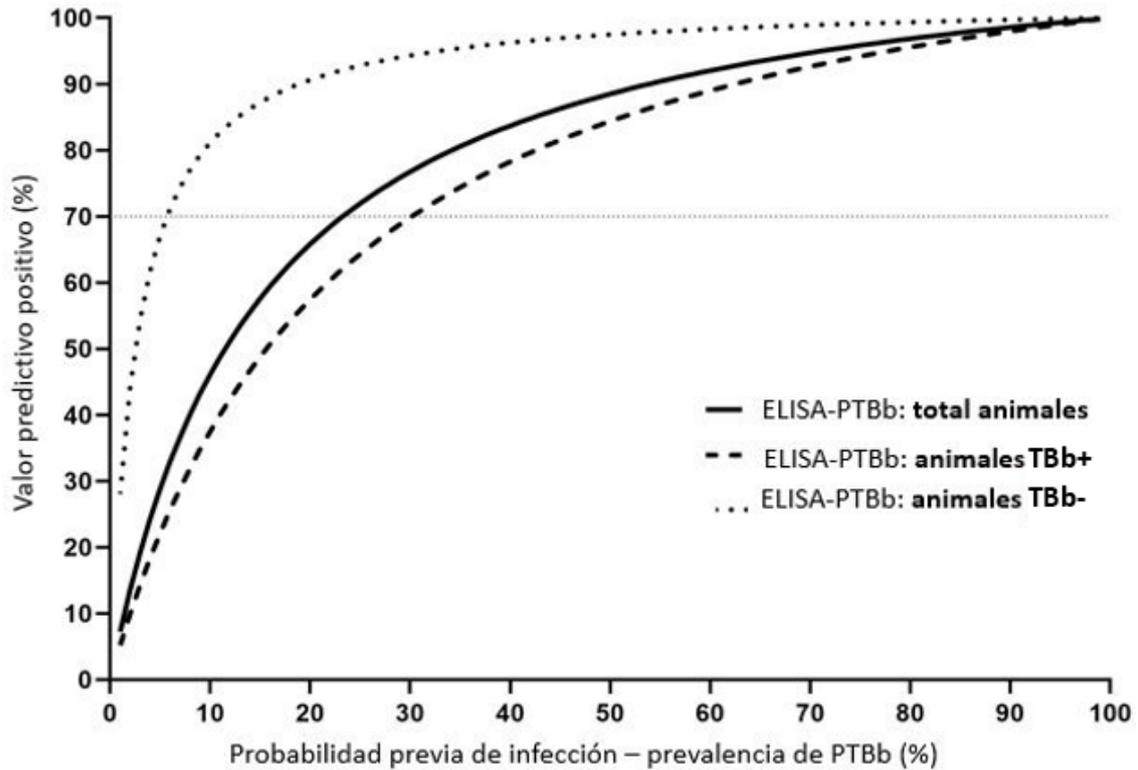


Figura 1. Representación gráfica del valor predictivo positivo estimado en función de la validez de las pruebas y de la prevalencia de la paratuberculosis bovina.

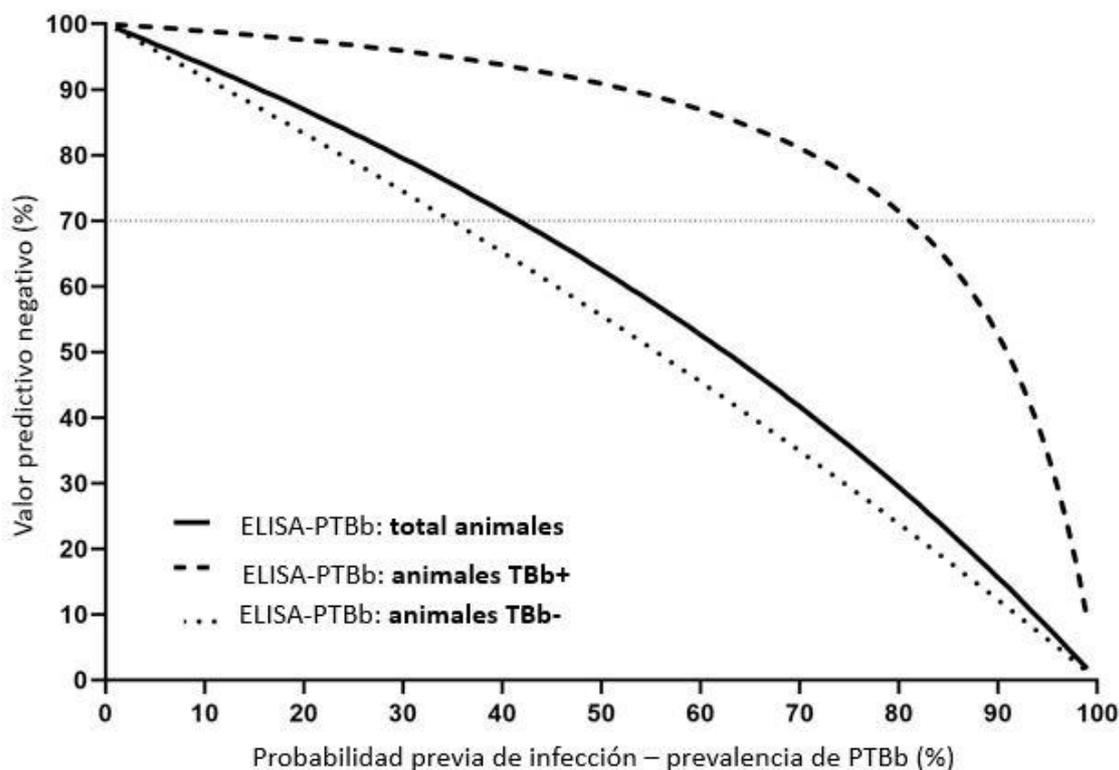


Figura 2. Representación gráfica del valor predictivo negativo estimado en función de la validez de las pruebas y de la prevalencia de la paratuberculosis bovina.

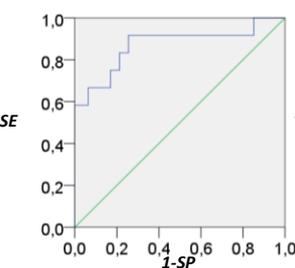
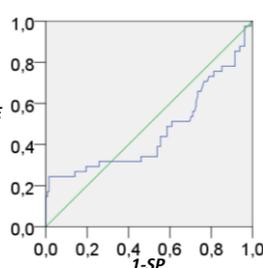
En animales infectados por PTBb, la probabilidad de resultados positivos empleando el ELISA-PTBb [NRL = 5,4 (IC 95%: 2,9-15,1)] dependerá en gran medida de la prevalencia de PTBb (VPP \geq 70% con prevalencia individual \geq 30%) (Figura 1). Sin embargo, un resultado negativo al ELISA-PTBb descartará la infección con la misma certeza en zonas con una prevalencia de PTBb individual \leq 81% [NRL = 0,1 (IC del 95%: 2,9-15,1)] (Figura 2).

En animales no infectados por PTBb, el ELISA-PTBb mostró un alto valor diagnóstico para confirmar la PTBb [NRL = 38,7 (IC 95%: 5,9- ∞)]; La probabilidad de resultados positivos fue superior al 70% para una prevalencia de PTBb individual \geq 6%. Por el contrario, los resultados negativos tienen escaso valor diagnóstico y raramente mejorarán nuestra certeza inicial para descartar la enfermedad [NRL = 0,8 (IC 95%: 0,6-0,9)].

A partir de las diferencias observadas en la SE y ES del ELISA-PTBb en animales positivos y negativos a TBb, se estudió el punto de corte óptimo de esta técnica en cada grupo, así como su validez y precisión (Tabla 2). En los animales infectados por CMT, el punto de corte estimado para el ELISA-PTBb coincidió con el recomendado por el fabricante, mostrando un buen poder discriminatorio entre animales seropositivos y seronegativos a PTBb (AUC > 0,7). En los animales negativos a TBb, el punto de corte óptimo estimado (64,7) fue superior, pero no estadísticamente diferente del recomendado

por el fabricante (55). El poder discriminatorio del ELISA-PTBb fue escaso para los animales negativos al aislamiento microbiológico de CMT (AUC < 0,5) (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la curva ROC del ELISA-PTBb en animales TBb+ y TBb-.

	TBb + [†] (n = 59)	TBb - (n = 169)
Curva ROC de ELISA-PTBb		
	AUC (IC 95%)	0.87 (0.73 - 1.0)
Corte (%)	55.0	64.7
SE (%)	91.7	24.4
SP (%)	74.5	98.4
J	0.66	0.23

ROC: receiver operator characteristic; AUC: área bajo la curva; SE: sensibilidad; SP: especificidad; J: índice de Youden. [†]Un animal se considera positivo si se obtuvo crecimiento microbiológico de *Mycobacterium bovis* en al menos uno de los tres tejidos analizados.

Discusión

La PTBb es responsable de pérdidas económicas directas e indirectas para la producción de rumiantes, debido a la reducción de la producción de leche y de la fertilidad, al aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades, impacto sobre el comercio internacional y la salud pública (R. Whittington et al., 2019). El control de esta enfermedad infecciosa se ha visto obstaculizado por los programas de erradicación de la TBb. Las costosas estrategias basadas en la realización de pruebas y el sacrificio de los animales infectados han primado sobre las estrategias de control de la PTBb. Además, se ha considerado que la aplicación de programas de control basados en estrategias de vacunación contra la TBb no es viable debido a la posible interferencia con la SIT para el diagnóstico de la TBb (Joseba M. Garrido et al., 2013; Juste et al., 2021a; McAloon et al., 2019b).

Existen varios métodos de diagnóstico para la detección de la infección por MAP en el ganado bovino, y cada uno de ellos tiene sus aplicaciones relativas según la estrategia de control que se vaya a llevar a cabo (Barkema et al., 2018; S. S. Nielsen & Toft, 2008). El SE y el ES son parámetros de validez que ayudan a seleccionar la técnica más adecuada, en función de su capacidad para discriminar correctamente entre animales infectados y sanos (Catalina Picasso-Risso et al., 2019). Sin embargo, la certeza del diagnóstico viene determinada por los PV, que también dependen de la probabilidad inicial de la enfermedad, condicionada por la prevalencia de la infección en un área determinada y las condiciones clínicas de los animales (Barden et al., 2020; Sackett et al.,

2001). La precisión diagnóstica es una cuestión clave en los programas de diagnóstico y sacrificio (Julio Álvarez et al., 2009). El conocimiento de estos parámetros facilita la interpretación de los resultados de las pruebas de diagnóstico y la toma de decisiones, evitando el fracaso de los programas de control (Barden et al., 2020; R. Whittington et al., 2019). En este estudio se ha evaluado la precisión diagnóstica del ELISA frente a la PTBb, teniendo en cuenta el estatus de TBb de los animales y su utilidad mediante el cálculo de los PVs y LR_s, estos últimos de gran valor por ser valores inherentes a la prueba diagnóstica e independientes de la prevalencia de la enfermedad (Florkowski, 2008).

La monitorización de la respuesta inmunitaria humoral mediante ELISA-PTBb proporciona resultados más rápidos y es una alternativa más barata que otras herramientas de diagnóstico para detectar animales infectados (Barden et al., 2020; Blanco Vázquez et al., 2020). Sin embargo, diferentes estudios han cuestionado la utilidad de la técnica debido a su limitada precisión (Barden et al., 2020; Bridges & van Winden, 2021; Didkowska et al., 2021; W. Lilenbaum et al., 2009; S. S. Nielsen & Toft, 2008) que debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un programa de control de la PTBb (McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019). Diferentes estudios han demostrado que los valores de sensibilidad y especificidad del ELISA para PTBb oscilan entre el 7-94% y el 40-100%, respectivamente (Blanco Vázquez et al., 2020; S. S. Nielsen & Toft, 2008) dependiendo de la prueba, la muestra utilizada en la prueba de referencia (heces o tejidos intestinales), la edad o el estadio clínico de la infección (Blanco Vázquez et al., 2020; McKenna et al., 2005) la interferencia con otras micobacterias (W. Lilenbaum et al., 2009; Walter Lilenbaum et al., 2007; C. Picasso-Risso et al., 2019) o el tiempo transcurrido entre la prueba y la prueba SIT (Bridges & van Winden, 2021; Didkowska et al., 2021; Kennedy et al., 2014; Varges et al., 2009). En el presente estudio, se utilizó el cultivo microbiológico de tejido intestinal (nódulos linfáticos ileocecales y válvula ileocecal, respectivamente) como prueba de referencia, a diferencia de la mayoría de los estudios que utilizan muestras fecales. Sin embargo, el cultivo de tejidos es más sensible que el cultivo de heces, permite detectar animales en las primeras fases de la infección, es una técnica *postmortem* para confirmar el diagnóstico de los animales positivos (McKenna et al., 2005) y también se utiliza para validar las pruebas de diagnóstico rápido (Jain et al., 2022; S. S. Nielsen & Toft, 2008).

El ELISA utilizado mostró una SE ajustada del 40,7% (IC 95%: 27,5-53,9%), superior a otras obtenidas (McKenna et al., 2005) en condiciones similares [SE 8,8% (IC 95%: 4,4-13,1%)]; los valores de ES obtenidos fueron similares, siendo superiores al 90% en ambos estudios. Las diferencias observadas podrían explicarse por dos hipótesis no excluyentes. En primer lugar, en este estudio, el SE y la ES se han ajustado estadísticamente teniendo en cuenta que la técnica de referencia es imperfecta. En

segundo lugar, diferentes estudios han sugerido que la validez del ELISA para el diagnóstico de esta enfermedad podría verse afectada por la coinfección con CMT (Julio Álvarez et al., 2009; Kennedy et al., 2014). En este sentido, estos estudios (McKenna et al., 2005) se llevaron a cabo en un país libre de TBb, mientras que en este estudio el 25,9% de los animales estaban infectados con micobacterias del CMT, lo que puede haber influido en la reactividad del ELISA frente a PTBb (C. Picasso-Risso et al., 2019). En consonancia con esta observación, se observó un aumento de la SE de la prueba ELISA en el grupo de animales infectados por CMT [94,4% (IC 95%: 81,4-100%) en animales positivos para TBb, frente a 25,1% (IC 95%: 11,8-38,4%) en animales negativos para TBb], así como una disminución significativa de la ES [82,6% (IC 95%: 71,8-93,4%), frente a 99,4% (IC 95%: 98,0-100%), respectivamente].

Los miembros de la familia *Mycobacteriaceae* comparten muchos factores de virulencia y proteínas que se utilizan como dianas de diagnóstico (Kennedy et al., 2014; W. Lilenbaum et al., 2009; Catalina Picasso-Risso et al., 2019; Raffo et al., 2017). Se han notificado interferencias en el diagnóstico de la TBb en bovinos infectados por MAP. En general, se ha observado una disminución de la ES de la prueba del interferón-gamma y del análisis serológico (Julio Álvarez et al., 2009; C. Picasso-Risso et al., 2019; Raffo et al., 2020; Roupie et al., 2018). Sin embargo, la relación inversa (interferencia de CMT con el diagnóstico de la MAP) sigue siendo en gran medida desconocida (C. Picasso-Risso et al., 2019; Catalina Picasso-Risso et al., 2019). Otros autores (Julio Álvarez et al., 2009) observaron una menor SE de ELISA frente a PTBb en animales coinfectados. Estos resultados difieren de los observados en otros estudios (Kennedy et al., 2014, 2017), que detectaron una mayor SE de las pruebas serológicas como consecuencia del aumento de los niveles de anticuerpos. Por otra parte, se ha observado un mayor número de reactores en la prueba ELISA para PTBb en rebaños positivos a TBb en comparación con rebaños libres de TBb (Catalina Picasso-Risso et al., 2019). Esto podría deberse a la reactividad cruzada entre MAP y CMT (Julio Álvarez et al., 2009; Vargas et al., 2009). Estudios experimentales mostraron un aumento de anticuerpos específicos anti-MAP durante 50-100 días tras la inoculación con *M. bovis* (Eda et al., 2006). Por otra parte, la inoculación intradérmica de PPD bovina también podría modular la respuesta inmunitaria frente a MAP, mejorando la SE del ELISA y disminuyendo su ES con un aumento del número de animales falsos positivos (Catalina Picasso-Risso et al., 2019; Vargas et al., 2009). Este estudio tiene algunas limitaciones, ya que no se pudo evaluar el efecto de la inoculación de PPD bovina sobre la precisión de la técnica diagnóstica porque se desconocía la frecuencia y el momento de la inoculación de PPD bovina en los animales del estudio.

Pocos estudios se han centrado en la utilidad (LRs y PVs) del ELISA para el diagnóstico de PTBb dependiendo de la prevalencia de la enfermedad (Barden et al., 2020). Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que la detección de

anticuerpos específicos frente a MAP en un animal confirmaría el diagnóstico de PTBb con una certeza $\geq 70\%$ en áreas con una prevalencia individual de PTBb $\geq 23\%$ (Figura 1). Por otra parte, los resultados negativos permitirán descartar la enfermedad con la misma certeza ($\geq 70\%$) en zonas con una prevalencia individual de PTBb $\leq 41\%$ (Figura 2).

Al analizar la utilidad de la prueba ELISA-PTBb según el estatus frente a la TBb, esta técnica sería una buena herramienta diagnóstica para detectar la enfermedad (PRL 38,7) en animales negativos a TBb, ya que un resultado positivo confirmaría la PTBb con una certeza $\geq 70\%$ en zonas con una prevalencia individual de PTBb $\geq 6\%$ (frente al 23% de prevalencia necesario si se desconoce el estatus frente a la TBb). Así, en zonas de bajo riesgo de TBb, siempre que no se sospeche que el animal está infectado por CMT, no sería necesario confirmar el diagnóstico serológico de PTBb con pruebas adicionales, como recomiendan la mayoría de los programas de control (Barden et al., 2020; R. Whittington et al., 2019). Por otro lado, en animales positivos a TBb, se observó una notable mejora en la utilidad de los resultados negativos al ELISA (70% de certeza con una prevalencia individual de PTBb $\leq 81\%$, frente al 41% si se desconoce el estatus de TBb); aunque los programas de control de TBb exigen el sacrificio inmediato de los animales infectados, esta herramienta permitiría descartar la coinfección con una alta fiabilidad antes del sacrificio de los animales positivos a TBb. A pesar de las diferencias observadas en la precisión y utilidad diagnóstica entre animales positivos y negativos a la TBb, la estimación de los puntos de corte óptimos del ELISA-PTBb no mostró cambios significativos respecto a los valores recomendados por el fabricante, mostrando un buen poder discriminatorio en animales positivos a la TBb y un pobre poder discriminatorio en animales negativos a la TBb.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la infección por micobacterias del CMT interfiere en la precisión y utilidad del diagnóstico serológico de la PTBb. Por lo tanto, el estatus de TBb debe tenerse en cuenta para la interpretación de los resultados del ELISA frente a PTBb. El cálculo de los valores predictivos en función de la prevalencia de la PTBb y del estado de la TBb facilitará la toma de decisiones y mejorará la eficacia de los programas de control. Estos resultados proporcionan orientaciones útiles para la aplicación e interpretación del ELISA-PTBb como herramienta de control de la enfermedad.

Estudio III.

DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA COMO APOYO AL DIAGNÓSTICO E IMPLEMENTACIÓN DE MEDIDAS DE CONTROL DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS DE VACUNO LECHERO EN LA COMARCA DE LOS PEDROCHES

Francisco Jurado-Martos, Fernando Cardoso-Toset, Carmen Tarradas Iglesias, Inmaculada Luque Moreno, Belén Huerta Lorenzo

DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA COMO APOYO AL DIAGNÓSTICO E IMPLEMENTACIÓN DE MEDIDAS DE CONTROL DE PARATUBERCULOSIS BOVINA EN GANADERÍAS DE VACUNO LECHERO EN LA COMARCA DE LOS PEDROCHES

Francisco Jurado-Martos^{1,2*}, Fernando Cardoso-Toset¹, Carmen Tarradas Iglesias^{2,3}, Inmaculada Luque Moreno^{2,3}, Belén Huerta Lorenzo^{2,3},

¹ *CICAP-Centro de Investigación Agroalimentario, Pozoblanco, Córdoba, España.*

² *Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, España.*

³ *UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes ENZOEM, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario 'ceiA3', Universidad de Córdoba, Córdoba, España*

Resumen

La falta de directrices internacionales ha limitado la adopción de programas de control de la paratuberculosis bovina (PTBb) en algunos países. Con el objetivo de abordar esta problemática, se llevó a cabo un estudio epidemiológico en la comarca de Los Pedroches (Córdoba) para determinar la seroprevalencia de la infección y desarrollar una encuesta epidemiológica que permitiera evaluar el riesgo de infección por MAP en las explotaciones en base a las características y factores de riesgo de la PTBb. En el estudio participaron 41 ganaderías, y se recogieron 832 muestras de suero sanguíneo. Se diseñó un cuestionario con 31 *ítems* que permitieron clasificar a las ganaderías en tres niveles de riesgo (riesgo bajo, moderado o elevado) en función de factores agrupados en tres bloques principales: i) características, bioseguridad e instalaciones de la ganadería; ii) estatus productivo y sanitario; iii) manejo durante la recría, el parto y la reposición. Además, se estableció una clasificación general teniendo en cuenta todos los *ítems* incluidos.

Se obtuvo una seroprevalencia del 20,1% (IC_{95%}: 17,4-22,8%) a nivel individual y una dispersión del 68,3%. La clasificación general de las ganaderías reveló que el 51,2% tenían un riesgo bajo, el 26,8% un riesgo moderado y el 22,0% un riesgo elevado de infección por MAP. Se encontró una asociación significativa entre la clasificación general y la seropositividad del rebaño. En conclusión, el cuestionario diseñado se considera una herramienta útil para identificar factores de riesgo y aplicar estrategias eficaces para el control de la enfermedad.

Introducción

La paratuberculosis bovina (PTBb) es una enfermedad de distribución mundial, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que afecta principalmente a rumiantes (Nielsen y Toft, 2009). En muchos países desarrollados, se estima que su prevalencia a nivel de rebaño supera el 40% (R. Whittington et al., 2019). Además, se le atribuyen importantes pérdidas productivas en la industria ganadera (Kirkeby et al., 2017) y se ha planteado una posible relación con la enfermedad de Crohn en humanos (Eslami et al., 2019; Kuenstner et al., 2017).

Muchos países han adoptado estrategias de control frente a esta enfermedad a lo largo de los años (Geraghty et al., 2014; Robert H. Whitlock, 2010), la mayoría se centran en el diagnóstico y sacrificio de animales infectados, así como en la implementación de medidas para reducir la transmisión fecal-oral, especialmente en el área de recría (M. T. Collins et al., 2010; S. S. Nielsen & Toft, 2011). No obstante, su implementación puede originar costes significativos, especialmente en zonas de alta prevalencia (Bates et al., 2019; Jubb & Galvin, 2000).

La identificación de los factores de riesgo asociados a la infección por MAP es esencial para abordar el control de la enfermedad de forma efectiva (R. Whittington et al., 2019). Para lograrlo, se pueden desarrollar modelos de predicción basados en el análisis estadístico de una gran cantidad de datos, como los modelos de regresión logística (Woolhouse, 2011). En este contexto, un cuestionario epidemiológico de evaluación de riesgo puede representar una herramienta costo-efectiva para el control de la enfermedad en áreas con recursos limitados (USDA, 2005).

Andalucía ocupa el quinto lugar como productor de leche de vaca a nivel nacional y alberga aproximadamente el ocho por ciento del censo de vacuno lechero del país y en particular, la comarca de Los Pedroches concentra alrededor del 60% de dicho censo (SGPGyC & DGPYMA, 2022a). Aunque hasta la fecha no se han publicado estudios que evalúen el impacto de la enfermedad en la región, existen factores como son la elevada prevalencia de tuberculosis bovina (DGSPA, 2022), la coexistencia de ganado con otras especies en producción, el manejo de la recría y las características generales de las explotaciones (tamaño, entorno, infraestructuras, etc.) (SGAGyDR, 2007) que podrían estar influyendo en una situación epidemiológica particular en relación con la transmisión de la paratuberculosis en esta zona.

En este estudio se ha diseñado una encuesta epidemiológica para identificar los principales factores de riesgo descritos para esta infección y determinar la dispersión de la paratuberculosis en las explotaciones lecheras de la comarca de Los Pedroches. El objetivo principal es conocer la situación epidemiológica de la paratuberculosis y

proporcionar información relevante para el diseño de estrategias eficaces de control en las ganaderías de la región.

Material y métodos

Diseño del estudio y plan de muestreo

Durante los meses de febrero a junio de 2022, se llevó a cabo un estudio epidemiológico transversal descriptivo en las ganaderías de vacuno de leche de la comarca de Los Pedroches. La selección de las ganaderías se realizó en colaboración con los veterinarios responsables y se inscribieron de forma voluntaria 41 ganaderías.

La situación sanitaria frente a PTBb se determinó mediante un análisis serológico de los animales con mayor riesgo de infección, vacas en producción que tuviesen al menos un parto. Considerando que el número total de animales de las explotaciones estudiadas osciló entre 32 y 635, para un nivel de confianza del 95% y una prevalencia mínima esperada del 15% (R. Whittington et al., 2019), se consideró que había que analizar 20 animales para detectar al menos un individuo infectado (Winepi 2.0 Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España). Los animales de cada ganadería fueron seleccionados mediante un muestreo aleatorio simple, salvo en una ganadería que se muestrearon todos los animales.

La obtención de las muestras de sangre se realizó mediante punción de la vena coxígea utilizando tubos estériles sin anticoagulante (Vacutainer®, Vacuette, Austria). Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración, donde se dejaron coagular y luego se centrifugaron a 2.500 g durante 20 minutos para la obtención del suero (Blanco Vázquez et al., 2020). Los sueros obtenidos fueron almacenados en congelación a -20 °C hasta su análisis.

Se han obtenido un total de 832 muestras de suero sanguíneo bovino. Considerando un censo de 50000 cabezas de vacuno de leche en la comarca de Los Pedroches y una prevalencia esperada del 15% (R. Whittington et al., 2019), esta muestra permitió estimar la seroprevalencia de paratuberculosis en el ganado bovino de la región con un nivel de confianza del 95% y una precisión del 97,5% (error del 2,5%).

Diseño y validación del cuestionario

Para diseñar el cuestionario se realizó una revisión bibliográfica para identificar los factores de riesgo asociados a la paratuberculosis en vacuno lechero utilizando tres bases de datos en línea: *PubMed*, *Scopus* y *WOS*. El cuestionario incluye 31 factores con respuesta cerrada agrupados en tres bloques. El primer bloque, denominado "Características, bioseguridad e instalaciones de la ganadería", incluye un conjunto de

diez factores relacionados con infraestructuras y manejo para el control de enfermedades transmisibles. El segundo bloque, titulado "Estatus productivo y sanitario", abarca siete factores relacionados con la PTBb. Por último, el tercer bloque, denominado "Manejo del parto, la cría y la reposición", engloba 14 factores directamente relacionados con la transmisión de la enfermedad.

Para la validación del cuestionario, se solicitó la participación de veterinarios especializados en el campo del vacuno lechero. Estos profesionales evaluaron la fiabilidad y validez de las preguntas planteadas. Como resultado de este proceso de validación, algunas preguntas que resultaron confusas fueron reformuladas, mientras que otras fueron eliminadas debido a la falta de validez en las respuestas que podrían generar. De esta manera, se buscó garantizar la calidad y la precisión del cuestionario final utilizado en el estudio y se consideró que el cuestionario era válido.

Criterios para asignar puntuaciones de riesgo y clasificación de las ganaderías

Siguiendo el método descrito por Lesmanawati et al. (2020), asignamos valores del uno al tres a las respuestas de cada variable para indicar el nivel de riesgo asociado a las mismas. Un valor de "1" correspondió con "riesgo bajo", "2" con "riesgo moderado" y "3" con "riesgo alto". Para las variables dicotómicas, se diferenciaron únicamente dos niveles de riesgo, asignando un valor de "1" para la ausencia de riesgo y un valor de "3" para la presencia de riesgo.

Los criterios para asignar las puntuaciones se basaron en los resultados previamente publicados por otros autores. Cuando no había datos disponibles para un parámetro se siguieron criterios epidemiológicos y sanitarios (*Tabla 1*).

Tabla 1. Criterios para la puntuación del riesgo de los factores incluidos en el cuestionario.

	Puntuación de riesgo			Justificación	
	1	2	3		
Bloque I	Tamaño de la explotación (animales)	<100	100-300	>300	Un mayor número de animales está relacionado con una mayor presión de infección y riesgo para los terneros. Un incremento de 100 vacas aumenta 2,8 veces la probabilidad de positividad del rebaño (Wolf et al., 2016).
	Presencia de otras especies de producción en el mismo perímetro (ovejas, cabras y cerdos)	No	-	Si	Otros animales domésticos pueden ser reservorios de la enfermedad (Cardoso-Toset, Luque, et al., 2015; Verdugo et al., 2014).
	Vallado perimetral	Vallado cinegético bien conservado	Vallado cinegético con áreas en mal estado	Sin vallado o vallado que permite contacto con la fauna silvestre	La ausencia de vallado perimetral aumenta en 2,2 veces la probabilidad de rebaño positivo para MAP (Jiménez-Martín et al., 2022).

Bloque II	Presencia de fauna cinegética	No	-	Si	MAP ha sido detectado en fauna silvestre como jabalíes, gamos, conejos y cabras montesas (J. Álvarez et al., 2005; Astorga Márquez et al., 2014; Carta et al., 2013; Maio et al., 2011)
	Foso de purines	Balsa cementada y cubierta	Balsa cementada, sin aislar	Balsa no cementada	La falta de higiene en los animales, los bebederos y comederos, así como el uso compartido de material agrícola para la dispersión de purines en los pastos, han sido identificados como factores de riesgo para la transmisión de MAP (Wolf et al., 2016).
	Material agrícola compartido	No	-	Si	
	Bebederos de fácil limpieza	Si	-	No	
	Pasillo de alimentación de material no poroso	Si	-	No	
	Retirada de cadáveres	En una zona sin escorrentías y cerca de la puerta de recogida	-	En zona de escorrentías o en el interior de la explotación	Una gestión deficiente en la retirada de cadáveres, aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades (Gwyther et al., 2011).
	Presencia de lazareto	Aislado del resto de áreas de la explotación	Al lado o comunicado con las vacas en producción o reposición	Al lado o comunicado con la cría o el corral de partos	La exposición de los terneros a animales infectados es una práctica de riesgo para la transmisión de MAP y otras enfermedades (McAloon et al., 2019b).
	Media de producción (Kg leche/vaca/año)	>10.000	10.000-9.000	<9.000	Las vacas infectadas pueden tener una disminución en la producción de leche de hasta 2 kg/día (Beaudeau et al., 2007).
	Intervalo entre partos (IEP)	≤450	-	>450	La infección por MAP se asocia con un aumento de 30 días el IEP (Ansari-Lari et al., 2012)
	Estatus sanitario de tuberculosis bovina	Tuberculosis negativa (T3)	-	Tuberculosis positiva (TS, TR, T2)	La tuberculosis induce un estado de inmunosupresión que podría favorecer la infección por MAP (Julio Álvarez et al., 2009).
Histórico de paratuberculosis	No	-	Si	Se ha demostrado que tener un historial de casos sospechosos está asociado con una probabilidad 6,7 veces mayor de tener la enfermedad (Ansari-Lari et al., 2009).	

	Presencia de otras enfermedades infecciosas	No	-	Si	La infección por otros microorganismos puede verse favorecida por el estado de inmunosupresión causado por MAP (Byrne et al., 2017).
	Incidencia anual de mastitis	<5%	5-10%	>10%	La paratuberculosis puede causar un aumento de las mastitis y de mortalidad en terneros (Juste et al., 2021b; Rossi et al., 2017b).
	Incidencia anual mortalidad predestete	<5%	5-10%	>10%	
Bloque III	Corral de partos	Aislado del resto de áreas de la explotación	Al lado o comunicado con vacas producción o reposición	Al lado o comunicado con la recría o el lazareto	Una correcta gestión del corral de partos evita la contaminación de los terneros recién nacidos con materia fecal y tiene un impacto significativo en el éxito del control de la paratuberculosis (Karsten Donat et al., 2016).
	Coinciden varios animales en el corral de partos				
	Otros usos del corral de partos	Nunca o poco frecuente (<10%)	Ocurre entre el 10-40% de las veces	Siempre (>50%)	
	Frecuencia de nacimientos fuera del corral de partos				
	Frecuencia animales que maman	Nunca o poco frecuente (<10%)	Ocurre entre el 10-40% de las veces	Siempre (>50%)	El calostro y la leche son los principales vehículos de contagio debido a su contaminación fecal (McAloon et al., 2019b). La lactancia natural y prácticas deficientes de higiene durante el ordeño aumentan el riesgo de infección (Karsten Donat et al., 2016; Künzler et al., 2014; Wolf et al., 2016). Además, se ha documentado la presencia de MAP viable en el calostro y la leche de madres infectadas (S. S. Nielsen et al., 2008)(Fechner et al., 2019; Godden et al., 2005).
	Encalostramiento dirigido	Si	-	No	
	Origen del calostro	Madre	Congelado una vaca	Mezcla de varias vacas	
	Pasteuriza el calostro	Si	-	No	
	Origen leche terneras	Lactoreemplazante	-	Leche de tanque/leche de desecho	
	Alojamiento de las terneras	Individual	Hermandas	Grupo	

Área de recría próxima a núcleos de vacas en producción	>30 m de las vacas en producción y sala de ordeño	-	≤30 m de las vacas en producción y sala de ordeño	La distancia menor a 30 metros entre el área de recría y la zona de ordeño y/o vacas en producción favorece la transmisión de MAP (Verdugo et al., 2020). Las novillas que se mantienen junto a los animales adultos tienen más probabilidad de infectarse por MAP (McAloon et al., 2019b).
Novillas y vacas adultas comparten instalaciones	No	-	Si	
Alimentación a base de forrajes fertilizados con estiércol	No	-	Si	El uso de purines como fertilizante es un factor de riesgo cuando los animales se alimentan de cultivos o pastan en áreas tratadas con estos purines (Salgado et al., 2011).
Reposición	Propia	-	Externa	La introducción de animales de otras explotaciones se ha identificado como el principal factor de riesgo para la introducción de la enfermedad (Rangel et al., 2015).

En relación con la clasificación de riesgo, se obtuvo una agrupación por niveles para cada uno de los tres bloques estudiados, además de una clasificación general que tuvo en cuenta todos los factores evaluados en el cuestionario.

Para determinar el nivel de riesgo en cada bloque, se calculó el promedio de puntos de los factores correspondientes. Teniendo en cuenta que la puntuación promedio mínima para cada bloque era de un punto (todas las preguntas un punto) y la máxima de tres puntos (todas las preguntas tres puntos), se calculó una desviación de ± 10 por ciento sobre el promedio de la puntuación mínima y máxima. De esta manera, se definieron tres niveles para cada bloque: "nivel I", asociado a riesgo bajo, para las ganaderías con una puntuación inferior a 1,8; "nivel II", asociado a riesgo moderado, para aquellas ganaderías con una puntuación entre $\geq 1,8$ y $\leq 2,2$; y "nivel III", asociado a riesgo elevado, para aquellas ganaderías con una puntuación mayor a 2,2

Para establecer la clasificación general, se calculó la siguiente fórmula:

$$\text{Clasificación general } \bar{x} = \frac{BI\bar{x} + BII\bar{x} + (2 \times BIII\bar{x})}{3}$$

Donde $B\bar{I}\bar{X}$ corresponde a la puntuación promedio del bloque I; $B\bar{I}\bar{I}\bar{X}$ corresponde a la puntuación promedio del bloque II; y $B\bar{I}\bar{I}\bar{I}\bar{X}$ corresponde a la puntuación promedio del bloque III. La puntuación promedio del bloque III se puntuó doble debido a la importancia directa de estos factores con la transmisión de MAP.

Al igual que en los distintos bloques, los límites de los niveles de la clasificación general se calcularon mediante el promedio entre la puntuación máxima y mínima, con un margen de $\pm 10\%$ sobre esta puntuación. En consecuencia, se asignó el "nivel I" a las ganaderías con una puntuación promedio inferior a 2,4; "nivel II" a las ganaderías con una puntuación entre $\geq 2,4$ y $\leq 2,9$; y "nivel III" a las ganaderías con una puntuación superior a 2,9.

Realización del cuestionario

Para cumplimentar el cuestionario se programaron visitas a las explotaciones, durante las cuales, el ganadero y el veterinario responsable respondieron activamente a las preguntas, siendo preciso en ocasiones consultar los registros productivos y sanitarios del rebaño.

El cuestionario fue realizado siempre por la misma persona para asegurar la homogeneidad en la recopilación de los datos. En explotaciones donde coexistían áreas expuestas y no expuestas a un determinado factor de riesgo, se consideró que el colectivo estaba expuesto y se puntuó en consecuencia. Los datos recopilados se introdujeron en el programa SPSS (versión 15.0, SPSS Inc., Chicago, USA) para realizar el análisis estadístico correspondiente.

Análisis ELISA de las muestras de suero

Todas las muestras de suero se analizaron en el laboratorio de CICAP utilizando el kit comercial *Mycobacterium paratuberculosis* Antibody ELISA Test (IDEXX Laboratories, EE. UU.). Siguiendo las instrucciones del fabricante y previamente descrito en el material y métodos del Estudio 2 de esta Tesis Doctoral.

Análisis estadístico

Se estimó la dispersión real de la paratuberculosis en las explotaciones de vacuno lechero de la comarca de los Pedroches y la seroprevalencia real de la infección en el ganado vacuno de leche, con sus correspondientes intervalos de confianza ($IC_{95\%}$), para una sensibilidad y especificidad del test ELISA en muestras de suero del 25,1% y el 99,4%, respectivamente (Sackett, D.L.; Straus, S.E.; Richardson, W.S.; Rosenberg, W.; Haynes, 2001). Para realizar los cálculos, se utilizó el programa estadístico Winepi 2.0,

Se llevó a cabo un análisis estadístico, mediante la prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* para valorar diferencias significativas en el estado de infección por MAP

de los rebaños (positivo/negativo a MAP) en función del nivel de riesgo asignado, para una probabilidad de error tipo I del 5% ($P < 0,05$). En caso de asociación, se realizaron comparaciones múltiples 2x2 mediante la prueba *U de Mann-Whitney*, acompañada de la corrección de *Bonferroni*, para determinar qué niveles de riesgo presentaban entre sí diferencias significativas en su estado de infección.

Finalmente, se estimó la fuerza y el sentido de esta asociación mediante el cálculo de la *Odds Ratio* y su correspondiente IC_{95%}. Todos los cálculos y análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico SPSS.

Resultados y discusión

Seroprevalencia

De las 832 muestras de suero sanguíneo analizadas, se diagnosticaron 46 animales seropositivos (5,5%), lo que supone una seroprevalencia real de la infección por MAP del 20,1% (IC_{95%}: 17,4-22,8%). Este estudio proporciona el primer dato de seroprevalencia de paratuberculosis bovina en vacuno lechero de Andalucía y los resultados son similares a la estimación realizada por Whittington et al. (2019), quienes reportaron una seroprevalencia del 15% para el vacuno de leche en nuestro país.

En 28 de los 41 rebaños analizados (68,3%), se encontró al menos un animal seropositivo, lo que se consideró como criterio para clasificar al rebaño positivo a la paratuberculosis (prevalencia mínima en la explotación 15%). Este porcentaje es superior a las estimaciones de prevalencia a nivel de rebaño que han sido notificadas para nuestro país, que se sitúan alrededor del 40% (R. Whittington et al., 2019). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados podrían estar influenciados por el proceso de selección de las ganaderías participantes, ya que su incorporación en el estudio fue voluntaria.

Clasificación de las ganaderías

Bloque I: factores relacionados con las características, la bioseguridad y las instalaciones de la ganadería.

Según este criterio de clasificación, se obtuvo que el 34,1% de las ganaderías presentaban un riesgo bajo, mientras que el 48,7% tenían un riesgo moderado y el 17,1% mostraban un riesgo elevado para la infección por MAP. En este bloque, el mayor porcentaje de ganaderías fueron clasificadas con riesgo moderado-alto para la infección por MAP, con un 65,8% de las ganaderías analizadas.

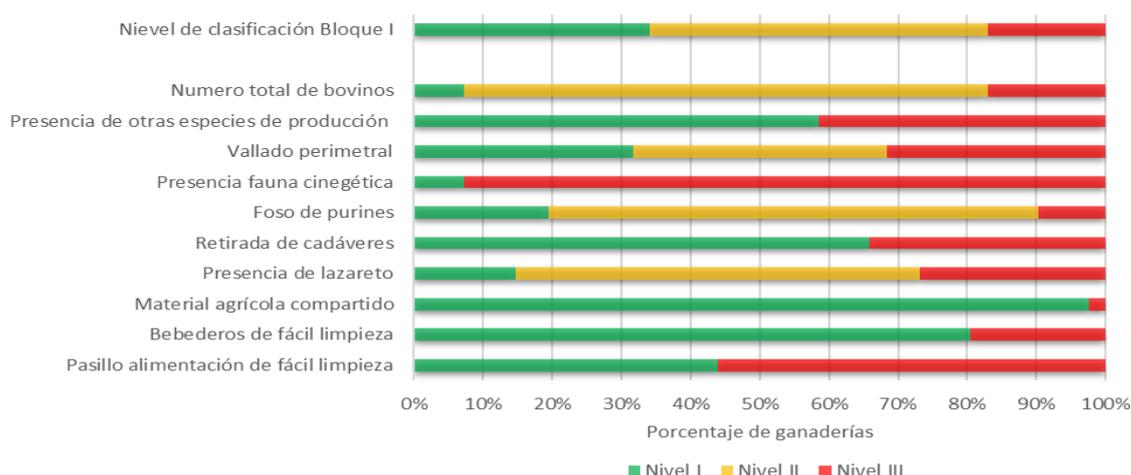


Figura 1. Nivel de clasificación bloque I y factores de riesgo

Entre los factores identificados que podrían estar asociados con la seroprevalencia de MAP, destaca el gran tamaño de las explotaciones en la comarca. El 92,7% de las explotaciones encuestadas tenían más de 100 cabezas (Figura 1), observándose un tamaño promedio cercano a 130 vacas en producción, lo que supone un tamaño tres veces más grande que la media nacional (SGPGyC & DGPyMA, 2022b). Esto implica que la prevalencia de la enfermedad podría ser mayor en la población de estudio, ya que un elevado número de animales por explotación puede favorecer el hacinamiento y, por consiguiente, la exposición de los terneros a material fecal (Bolton et al., 2011; Wolf et al., 2016).

Por otro lado, se detectó la presencia de otras especies en producción en un 41,5% de las ganaderías (Figura 1), especialmente ovejas y cerdos en sistemas de producción extensivos. Es importante mencionar que todas las explotaciones de vacuno de leche de Andalucía se consideran sistemas de producción intensiva (García de Tena et al., 2018). Sin embargo, es frecuente que en muchas ganaderías los animales que no están en producción, como vacas secas y novillas, pasten en cercas colindantes en contacto con otras especies productivas. Verdugo et al. (2014) describieron que la transmisión de la paratuberculosis puede ocurrir entre diferentes especies de rumiantes cuando hay una convivencia estrecha. En el caso de las ovejas, un estudio realizado en Andalucía determinó una seropositividad en el 66,3% (IC_{95%}: 56,1-76,4%) de los rebaños (Jiménez-Martín et al., 2022). Este resultado sugiere que las ovejas pueden actuar como fuente de infección de MAP para el ganado vacuno.

La presencia de fauna silvestre en las explotaciones ganaderas también fue un hallazgo común en el 92,7% de las explotaciones (Figura 1), especialmente conejos, jabalíes y zorros. Aunque no se ha investigado exhaustivamente el papel que desempeña

la fauna silvestre en la transmisión de MAP a las especies ganaderas (McAloon et al., 2019b), se ha documentado la infección por MAP en diversos animales de vida silvestre, como conejos, cabras montesas, ciervos o jabalíes (J. Álvarez et al., 2005; Astorga Márquez et al., 2014; Maio et al., 2011). En relación a los conejos, varios autores los han identificado como posibles reservorios de la enfermedad, ya que se ha comprobado que pueden excretar altas concentraciones de MAP en sus heces (Carta et al., 2013; Daniels et al., 2003; Maio et al., 2011). El riesgo de transmisión a través de la fauna silvestre se ve potenciado por la falta de un vallado perimetral óptimo. Todas las ganaderías encuestadas contaban con un vallado perimetral (*Figura 1*), si bien, en el 68,3% de las explotaciones, la conservación, altura o el material utilizado para su construcción no eran apropiados para evitar el contacto con la fauna silvestre (Jiménez-Martín et al., 2022).

Al igual que ocurrió con el vallado, se observó que el 90,2% de las explotaciones contaban con un foso de purines. Sin embargo, en el 80,5% de las mismas, este foso no estaba aislado de los animales (*Figura 1*), lo cual representa un riesgo de escorrentías en caso de lluvias o desbordamientos (Wolf et al., 2016).

Además, se encontró que el 85,4% de las ganaderías no realizaban un uso adecuado del lazareto (*Figura 1*). Concretamente, el 26,8% de las ganaderías no contaban con un corral definido para este propósito, se compartía con el corral de partos o estaba conectado con la zona de recría. Esta falta de aislamiento y el contacto con otros animales pueden aumentar el riesgo de transmisión de la enfermedad y comprometer la efectividad del control de la paratuberculosis en la explotación. Por último, la frecuente contaminación fecal del agua o los alimentos puede representar un riesgo de infección incluso en animales adultos (Wolf et al., 2016). En este sentido, se encontró que en un 56,0% de las ganaderías, el pasillo de alimentación de las vacas propiciaba la acumulación de suciedad debido a su superficie porosa o de difícil limpieza (*Figura 1*).

El 80,5% de las explotaciones contaban con bebederos de acero inoxidable de fácil limpieza (*Figura 1*), lo cual evitaba la acumulación de estiércol. Además, se observó que no era común compartir material agrícola para la manipulación de purines entre las ganaderías (*Figura 1*), lo que descarta que esta práctica pueda estar implicada en la transmisión de MAP en el área de estudio (McAloon et al., 2017; Obasanjo et al., 1997).

Bloque II: factores relacionados con los parámetros productivos y sanitarios

En base a los parámetros productivos y sanitarios evaluados, los resultados de la encuesta revelaron que el 56,1% de las ganaderías analizadas fueron clasificadas como nivel I, mientras que 34,1% se clasificaron como nivel II y el 9,8% como nivel III (*Figura 1*). En general, los índices productivos y sanitarios se encontraron en niveles óptimos a pesar del alto número de granjas seropositivas detectadas. Esto podría estar asociado con la ausencia de animales en etapas avanzadas de la enfermedad, ya que en su mayoría, las

pérdidas productivas ocurren a medida que la enfermedad progresa (Machado et al., 2018; Martins et al., 2018; Ozsvari et al., 2020; Pritchard et al., 2017; Wiszniewska-Łaszczych et al., 2020).

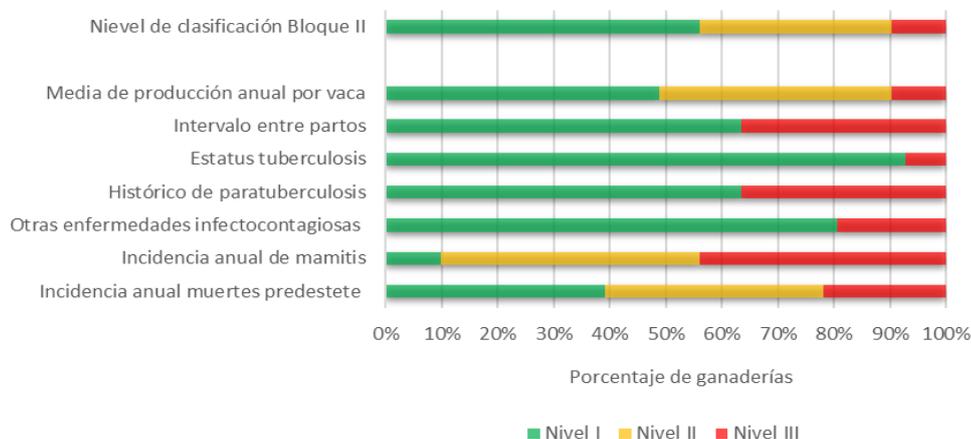


Figura 2. Nivel de clasificación bloque II y factores de riesgo

A nivel productivo, se observó que el 48,8% de los ganaderos informaron rendimientos superiores a 10.000 kg de leche por vaca al año (Figura 2), lo cual supera el rendimiento medio nacional (9.286 kg de leche por vaca al año) (SGPGyC & DGPYMA, 2022b). La producción media de leche se ha utilizado como un indicador para predecir el estado de paratuberculosis de los animales (Machado et al., 2018), ya que se han observado reducciones significativas en la producción, incluso en animales subclínicos (Martins et al., 2018). En este sentido, todas las ganaderías de este estudio que obtuvieron una puntuación de "3" para este factor (menos de 9.000 kg de leche por vaca al año) tenían al menos un animal seropositivo.

Por otro lado, también se evaluó la capacidad reproductiva en función del intervalo entre partos. Se ha observado que las vacas infectadas por MAP presentan un aumento de 30 días en dicho intervalo (Ansari-Lari et al., 2012) y una disminución general en la fertilidad (García-Ispuerto & López-Gatius, 2016; Ozsvari et al., 2020). Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que el 63,4% de las ganaderías presentaron un intervalo entre partos inferior a 450 días. (Figura 2).

En cuanto a los parámetros sanitarios evaluados, se identificaron tres ganaderías (7,3%) con un estatus positivo de tuberculosis bovina (Figura 2), de las cuales dos tenían al menos un animal seropositivo a la paratuberculosis. Sin embargo, es importante destacar que la ganadería positiva a tuberculosis que no presentó animales seropositivos a la paratuberculosis podría deberse a que recientemente había sacrificado a gran parte de su rebaño como parte del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina. Esta ganadería presentaba factores de riesgo importantes y un historial de animales con síntomas de paratuberculosis. La coinfección de ambas enfermedades es frecuente en las

explotaciones positivas a tuberculosis y debe ser considerada al diseñar medidas de control (Julio Álvarez et al., 2009; Raffo et al., 2017).

Por otro lado, el 36,6 por ciento de los responsables de explotaciones afirmaban tener sospecha de casos de paratuberculosis en los cinco años anteriores (Figura X), si bien desconocían aspectos clave de la epidemiología de la enfermedad. En cuanto al estatus sanitario general, se incluyó una pregunta sobre la presencia de enfermedades infectocontagiosas, como la diarrea vírica bovina, la fiebre Q o la rinotraqueítis infecciosa bovina, asociadas a un estatus sanitario deficiente (Byrne et al., 2017). Solo en ocho ganaderías se habían diagnosticado otras patologías, lo que indicaría un buen estatus sanitario, pero puede ser que en el resto no se hicieran pruebas de rutina para valorar la presencia de otras enfermedades, pudiendo comportarse como una variable confundente en el cuestionario.

A nivel sanitario, destacó que un 90,2% y un 61,0% de las ganaderías registraban un porcentaje superior al 5 por ciento respecto a la incidencia anual de mamitis y de muertes antes del destete, respectivamente (Figura 2). Varios estudios han reportado que ambos factores aumentan en presencia PTB (Juste et al., 2021b; Rossi et al., 2017b). Si bien, la inclusión de estos factores en la encuesta tuvo como objetivo evaluar de forma indirecta la higiene en las explotaciones. Tanto la mamitis como la mortalidad predestete, podrían indicar la existencia de prácticas inadecuadas en el manejo, la limpieza y la desinfección, lo cual favorecería la transmisión del MAP (Wolf et al., 2016).

Bloque III: factores relacionados con el manejo durante el parto, la recria y la reposición.

Bajo este criterio de clasificación, se obtuvo que el 43,9 por ciento de las ganaderías se ubicaban en el nivel I, el 34,1% ganaderías en el nivel II y el 22,0% de las ganaderías en el nivel III, siendo el bloque que más ganaderías clasifico en nivel III.

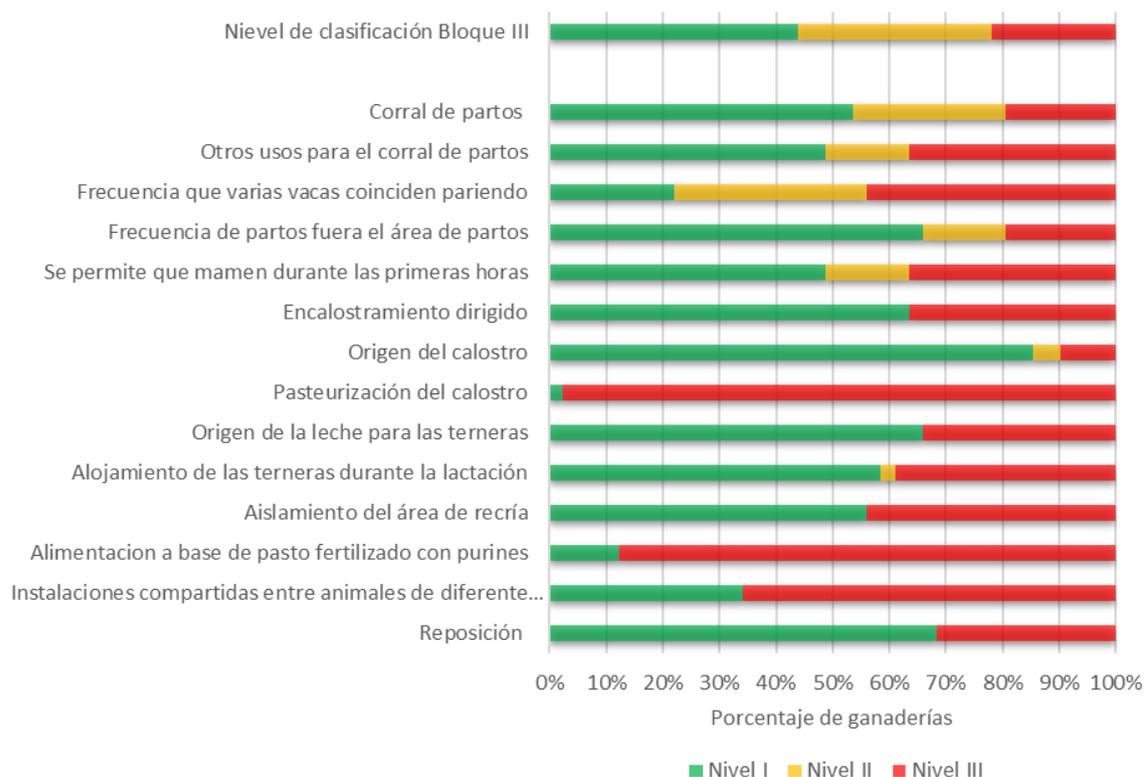


Figura 3. Nivel de clasificación bloque III y factores de riesgo

El manejo durante el periparto y la recría ha sido reconocido como un factor de riesgo importante para la transmisión de la enfermedad (Barkema et al., 2018; McAloon et al., 2017, 2019b). En este trabajo, se detectaron deficiencias en el manejo del corral de partos, a pesar de que la mayoría de las explotaciones contaba con dicha área. En el 46,3 por ciento de las explotaciones, el corral de partos tenía una ubicación inadecuada, en el 51,2% se utilizaba para otros fines y en el 43,9% era común que varias vacas coincidieran pariendo en el mismo corral. Además, en el 19,5% de las ganaderías era frecuente que las vacas parieran fuera del área designada (Figura 3). En general, se observó una falta de conocimiento sobre el manejo adecuado del corral de partos y su importancia en la transmisión de la enfermedad. Por lo tanto, consideramos que es necesario formar a los ganaderos sobre el manejo adecuado del corral de partos y su importancia en la prevención de la enfermedad (Karsten Donat et al., 2016).

En relación con el manejo del ternero lactante, se observó una gran heterogeneidad en cuanto a su control. Por lo general, los ganaderos contaban con un protocolo definido, aunque no siempre se cumplía, y basaban sus decisiones en factores como la carga de trabajo, el día o la hora del parto. Se observó que el 63,4 por ciento de las ganaderías practicaba el encalostramiento dirigido, mientras que el 36,6 por ciento permitía que los terneros mamaran directamente de la madre durante las primeras horas de vida (Figura 3). En la mayoría de las explotaciones (85,4%), se suministraba calostro de la misma

madre, pero solo una de las ganaderías aplicaba la pasteurización del calostro como medida para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades. En cuanto a la alimentación posterior a la separación de la madre, el 34,1% de las ganaderías suministraba leche de tanque o leche de desecho en lugar de un lactoreemplazante artificial (*Figura 3*).

Considerando estos resultados y los riesgos descritos previamente, es necesario tomar medidas adicionales. En las ganaderías donde se permite a los terneros mamar de la madre, es importante asegurar la limpieza de los pezones de las vacas si no es posible realizar una separación inmediata (Puerto-Parada et al., 2018). Asimismo, si los terneros no son separados inmediatamente después del nacimiento y permanecen en el corral de partos, es fundamental contar con un corral aislado y establecer un protocolo de limpieza y desinfección adecuado (Karsten Donat et al., 2016). En relación al uso de leche de tanque, leche de desecho o mezcla de calostro de varias madres, es importante destacar el importante papel que pueden tener en la transmisión (S. S. Nielsen et al., 2008). La pasteurización ha sido descrita en la literatura como un método eficaz para reducir la transmisión de MAP (Fechner et al., 2019; Godden et al., 2005), por tanto se recomienda su aplicación para controlar la enfermedad.

Todas las explotaciones contaban con un área de recría definida, y en más del 56,1 por ciento de las ganaderías se encontraba a una distancia de más de 30 metros de las vacas en producción o la sala de ordeño (*Figura 3*), lo cual se considera una medida positiva para evitar la transmisión de MAP (Verdugo et al., 2020). Además, el 58,5% de las explotaciones alojaba a las terneras en cubículos individuales (*Figura 3*), que previene la transmisión entre terneros (Corbett et al., 2017). En cuanto al manejo de las novillas, se observó que solo el 34,1 por ciento de las ganaderías disponía de instalaciones específicas para ellas (*Figura 3*). En el resto de las explotaciones, era común que las novillas compartieran instalaciones con otros animales de diferentes edades, lo que aumenta el riesgo de transmisión (McAloon et al., 2019b).

En relación con la alimentación, se encontró que en el 87,8 por ciento de las ganaderías se utilizaban pastos y forrajes fertilizados con purines (*Figura 3*). Esta práctica es habitual, ya que los purines se utilizan como fertilizante en los terrenos colindantes destinados al cultivo de alimentos para las vacas, y podría ser un factor de riesgo importante, debido a la elevada resistencia ambiental de MAP. Por lo tanto, se recomienda evitar el pastoreo o el consumo de estos forrajes por parte de las vacas durante un periodo de al menos 12 meses para reducir el riesgo de transmisión (Salgado et al., 2011).

Por otra parte, se ha descrito que el principal factor de riesgo para la introducción de MAP en un rebaño negativo es la adquisición de animales infectados (Rangel et al., 2015). En el caso de las ganaderías incluidas en el estudio, la mayoría (68,3%) practican

la reposición propia (*Figura 3*). Sin embargo, aquellas con alta tasa de reposición externa, no eran conscientes de este riesgo y no aplicaban medidas adicionales para evitar la introducción de animales infectados.

Clasificación general y nivel de significación entre niveles

La clasificación general de las ganaderías en diferentes niveles de riesgo, reveló que el 51,2 por ciento se encontraban en un nivel bajo de riesgo de paratuberculosis (nivel I), el 26,8 por ciento presentaba un riesgo medio (nivel II) y el 22, por ciento tenían prácticas o características asociadas a un riesgo elevado de paratuberculosis (nivel III).

Se encontró una asociación significativa entre la clasificación general de la encuesta y la seropositividad del rebaño ($p < 0,05$). De las 21 ganaderías clasificadas en nivel I, se observó que el 42,9% de ellas presentaron al menos un animal seropositivo en el rebaño. En el caso de las 11 ganaderías clasificadas en nivel II, se encontró que el 90,9% de ellas fueron seropositivas. Por otra parte, las nueve ganaderías clasificadas en nivel III resultaron ser seropositivas.

Mediante la prueba de U de Mann-Whitney se determinó una asociación significativa entre las ganaderías del nivel I y el nivel III ($p < 0,02$). Sin embargo, debido al reducido número de ganaderías clasificadas en nivel III, no fue posible estimar la relación de probabilidad (*odds ratio*) de las explotaciones de los niveles III y I en relación con la infección por MAP. No obstante, la tendencia observada confirma la utilidad del cuestionario para estimar el riesgo de infección por MAP. Este hallazgo, representa un primer paso en el abordaje del control de la enfermedad, ya que proporciona información para identificar factores de riesgo y dirigir los esfuerzos para su control (Roy D. Berghaus et al., 2005).

Capítulo IV. Discusión General

La paratuberculosis es una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente a los rumiantes domésticos, con un impacto económico y sanitario importante en países desarrollados, debido a las pérdidas de producción y los gastos derivados de su control (Dufour et al., 2004; McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019), sin olvidar su posible vinculación con la enfermedad de Crohn en el hombre (Waddell et al., 2016). Asimismo, la presencia de esta enfermedad puede afectar al mercado internacional, pues hay países de economía emergente, que exigen certificaciones de salud animal para importar productos de origen animal, incluyendo carne y productos lácteos (R. Whittington et al., 2019).

La prevalencia de esta enfermedad puede superar el 30 por ciento en países desarrollados, pero se estima que la importancia real estaría subestimada porque muchos casos no son bien diagnosticados (R. Whittington et al., 2019). El largo periodo de incubación, los signos clínicos inespecíficos hasta las fases finales, y la ausencia de pruebas de diagnóstico rápidas y fiables, condicionan la aplicación de adecuadas medidas de control, que además están condicionadas por el estatus sanitario frente a tuberculosis (Mallikarjunappa et al., 2021; Stevenson & Kapur, 2020). En este trabajo nos propusimos evaluar técnicas de diagnóstico rápidas, como qPCR y ELISA indirecto, para detectar animales infectados *in vivo* en heces o suero, respectivamente, utilizando también una qPCR para confirmar la enfermedad en animales *post mortem*, en muestras obtenidas de tejido intestinal (VIC y NLIC), en una zona endémica de tuberculosis, como es Andalucía (DGSPA, 2022)

Para validar ambas técnicas hemos utilizado el cultivo microbiológico de tejido intestinal como técnica de referencia. En este sentido, algunos autores afirman que el uso del cultivo fecal se consideraría la técnica de referencia para el diagnóstico de la PTB en animales vivos (Dane et al., 2023). No obstante, el cultivo fecal no identifica animales en estadios tempranos de la infección, y es menos sensible que la muestra a partir de tejidos, siendo esta última la recomendada para confirmar el diagnóstico de animales en el matadero (McKenna et al., 2005; S. S. Nielsen & Toft, 2008; WOA, 2022).

Se ha evaluado la utilidad de una qPCR múltiple basada en la detección de la diana IS900 y el fragmento F57 (Keller et al., 2014; Slana et al., 2008). Para ello, se obtuvieron muestras fecales (qPCR-fecal) y muestras de tejido intestinal (qPCR-tejido intestinal), calculando los valores de Sensibilidad (SE), Especificidad (ES), y las razones de verosimilitud (RV). La qPCR-fecal ha mostrado unos valores de SE del 50,3% (IC_{95%}: 36,4-64,6) y ES del 93,5% (IC_{95%}: 87,5-99,9), para la detección de animales infectados. Hemos comprobado que su utilidad diagnóstica depende de la prevalencia de la enfermedad en la zona de estudio. En zonas con prevalencia inferior al 19 por ciento, la

qPCR-fecal podría demostrar la ausencia de infección en animales, con una credibilidad superior al 90 por ciento. Además, esta técnica podría detectar animales positivos en zonas con una prevalencia superior al 23 por ciento, con una credibilidad mayor al 70 por ciento.

Por otra parte, la qPCR-tejido intestinal se realizó utilizando dos muestras diferentes, válvula ileocecal (VIC) y nódulo linfático ileocecal (NLIC), consideradas las muestras de elección para el diagnóstico de la PTB (Sackett et al., 2001; González et al., 2005), debido a que son los tejidos diana de la bacteria y también por su fácil identificación durante la inspección del paquete visceral tras el sacrificio. Si comparamos los resultados obtenidos en función de la muestra, comprobamos que la qPCR-tejido intestinal con muestras de VIC mostró una mayor precisión diagnóstica [SE 71,7% (IC_{95%}: 58,2-84,1%) y ES 93,3% (IC_{95%}: 86,5-100,0)] en comparación con la obtenida con muestras de NLIC [SE 59,9% (IC_{95%}: 46,3-74,0%) y ES 89,7% (IC_{95%}: 82,9-96,6)]. En consecuencia, se ha considerado que el análisis de la VIC es la mejor opción para confirmar la infección por MAP (RVP 10,8), con una credibilidad superior al 70 por ciento en animales procedentes de zonas o rebaños con una prevalencia de infección mayor o igual al 18 por ciento. Sin embargo, cuando el objetivo es demostrar la ausencia de la enfermedad, es recomendable realizar la qPCR-tejido intestinal utilizando muestras de VIC y NLIC en paralelo (VIL+NICL) (SE: 81,3%, ES: 89,5%, RVN:0,2), que nos permitirá descartar la enfermedad en zonas con prevalencias que oscilan entre el 0 y el 20 por ciento, con una credibilidad del 95 por ciento.

Según nuestros resultados, la qPCR-tejido intestinal es una técnica de diagnóstico útil para confirmar o descartar la enfermedad con alta credibilidad en animales muertos o sacrificados, siendo una herramienta adecuada para aplicar sistemas de vigilancia en mataderos, que han resultado útiles para el control de otras enfermedades crónicas, de largo periodo de incubación, como la tuberculosis bovina (Gilardoni et al., 2012; S. S. Nielsen & Toft, 2008).

Por otro lado, esta Tesis aborda la validación de la técnica ELISA-PTBb (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) en muestras de suero sanguíneo obtenidas de ganado vacuno. Esta técnica puede detectar anticuerpos frente a la PTB en animales vivos, siendo muy utilizada por su facilidad de realización, rapidez y su bajo coste (Whittington et al., 2019; Blanco Vázquez et al., 2020). Sin embargo, es importante destacar que su precisión diagnóstica se afecta por la edad de los animales, el estadio de la infección o la coinfección con otras micobacterias (Blanco Vázquez et al., 2020; Gilardoni et al., 2012; S. S. Nielsen & Toft, 2008). Estos factores comprometen la utilidad diagnóstica de la prueba y dificultan la toma de decisiones ante un resultado positivo o negativo. En este

trabajo, se obtuvieron unos valores de SE del 40,7 por ciento (IC_{95%}: 27,5-53,9%) y una ES del 94,7 por ciento (IC_{95%}: 91,4-98,0%). Atendiendo a la prevalencia de la paratuberculosis bovina en la zona, un animal positivo tendría una probabilidad ≥ 70 por ciento de estar infectado en zonas con prevalencias ≥ 23 por ciento, mientras que un animal negativo a la prueba se descartaría la enfermedad con una certeza superior al 70 por ciento en zonas de prevalencias ≤ 41 por ciento.

Además, al comparar la precisión diagnóstica del ELISA-PTBb teniendo en cuenta el estatus sanitario de los animales frente a tuberculosis (TB+ o TB-), se observaron diferencias significativas en los valores de SE y ES. En animales TB+, se obtuvieron valores de SE del ELISA-PTBb del 94,4 por ciento (IC_{95%}: 81,4-100,0) y ES del 82,6% (IC_{95%}: 71,8-93,4) mientras que para los animales TB-, se obtuvieron valores de SE del 25,1 por ciento (IC_{95%}: 11,8-38,4) y ES del 99,4 por ciento (IC_{95%}: 98,0-100). Según estos resultados, la técnica ELISA-PTBb es adecuada para descartar la coinfección por paratuberculosis en animales TB+, mientras que en animales TB- permite confirmar la enfermedad con una probabilidad ≥ 70 por ciento si la prevalencia de la enfermedad es ≥ 6 por ciento.

Hasta la fecha, el número de trabajos donde se haya evaluado la precisión diagnóstica del ELISA-PTBb en animales coinfectados por MAP y CMT ha sido muy limitado (C. Picasso-Risso et al., 2019). Algunos estudios han sugerido que en animales coinfectados, la SE de las técnicas basadas en la respuesta inmune humoral serían mayores (Julio Álvarez et al., 2009; Raffo et al., 2017, 2020), mientras que otros habían destacado las limitaciones del ELISA-PTBb para poder diferenciar entre animales positivos a tuberculosis y paratuberculosis (Olsen et al., 2001). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de tuberculosis interfiere en la precisión diagnóstica del ELISA-PTBb, y deben ser tenidos en cuenta para la interpretación de los resultados en zonas endémicas de tuberculosis (Julio Álvarez et al., 2009), por lo que se recomienda confirmar el diagnóstico utilizando otras técnicas, como la qPCR-tejido intestinal sobre muestras de VIC.

Una vez conocidas la precisión y utilidad diagnóstica de las pruebas disponibles, el segundo objetivo de este estudio se centró en proponer medidas de control de la paratuberculosis en vacuno lechero, donde la enfermedad tiene un mayor impacto (McAloon et al., 2019b; R. Whittington et al., 2019), en una zona endémica de tuberculosis. El primer paso para diseñar un programa de control es conocer las características epidemiológicas de la enfermedad en el área geográfica de estudio (McAloon et al., 2019b). Para ello, realizamos un estudio epidemiológico para determinar la seroprevalencia de la infección en el ganado vacuno lechero de la comarca de los

Pedroches y diseñar un cuestionario que permitiera clasificar a las ganaderías en base al riesgo de infección por MAP en tres niveles (nivel I, riesgo bajo; nivel II, riesgo moderado; y nivel III, riesgo elevado). Para la clasificación se tuvo en cuenta un conjunto de factores de riesgo agrupados en tres bloques (características, bioseguridad, instalaciones de las ganaderías; estatus productivo y sanitario; y manejo en el parto, recría y reposición), que habían sido previamente definidos (Beaver et al., 2017; Corbett et al., 2017; Karsten Donat et al., 2016; Kirkeby et al., 2017; Künzler et al., 2014; McAloon et al., 2019b; Rangel et al., 2015; Wolf et al., 2016).

El cuestionario diseñado se utilizó en 41 ganaderías de la comarca de Los Pedroches en colaboración con los veterinarios responsables de las explotaciones. En términos generales se observó que el 51,2 por ciento de las ganaderías presentaron un nivel de riesgo bajo, el 26,8 por ciento un riesgo moderado, y el 22 por ciento un riesgo elevado. La clasificación obtenida proporciona una visión general de las características de las explotaciones en la zona y nos proporciona una base para la implementación de estrategias de control y prevención específicas, dirigidas a corregir los factores de riesgo identificados en cada bloque.

En base a estos resultados, se propone un programa de vigilancia y control de la paratuberculosis bovina para las ganaderías de vacuno lechero del sur de España, con el objetivo de reducir la prevalencia en explotaciones afectadas y certificar la ausencia de la enfermedad en explotaciones libres. Los programas de control implementados en otros países se basan en la combinación de estrategias de diagnóstico y sacrificio, así como en la implementación de medidas higiénico-sanitarias en el manejo, con el objetivo de reducir el riesgo de exposición de la recría a MAP. El veterinario responsable de cada ganadería podrá decidir, según la situación y los recursos disponibles, la aplicación de las medidas más adecuadas.

De acuerdo con nuestros resultados, proponemos la combinación de técnicas de diagnóstico de la enfermedad en animales vivos (qPCR-fecal y ELISA-PTB) para la detección de animales infectados y seguimiento en matadero para confirmar la enfermedad y animales muertos o sacrificados (qPCR-tejido intestinal con muestras de VIC y NLIC), además de la aplicación de medidas de manejo para reducir el riesgo de mantenimiento y transmisión de MAP dentro y entre granjas de ganado vacuno lechero. Estas medidas se han dividido en cuatro grupos:

Caracterizar el riesgo de infección por MAP a nivel de rebaño: se utilizará la encuesta diseñada y validada que permitirá categorizar el riesgo de infección por MAP en cada ganadería y detectar posibles deficiencias en las prácticas de manejo. En base a los resultados de la encuesta, el veterinario responsable de la explotación evaluará las

prácticas de manejo llevadas a cabo durante el parto, la lactación, la adquisición de animales vivos y las medidas de bioseguridad y mantenimiento de instalaciones.

Identificar animales infectados en las explotaciones: esta medida se fundamenta en la detección de los animales excretores de MAP, que constituyen la principal fuente de contagio y mantenimiento de la enfermedad en el rebaño. Una vez conocido el estatus sanitario de los animales, se podrán aplicar medidas de control, que pueden variar desde evitar que tengan contacto con animales sensibles hasta la eliminación del rebaño, dependiendo de la situación epidemiológica.

Para identificar los animales excretores, se pueden utilizar dos técnicas: ELISA-PTB y qPCR-fecal. Según los resultados obtenidos en la validación de estas pruebas, recomendamos utilizar ELISA en explotaciones con presencia de animales que muestren signos clínicos, en granjas con sospecha de alta prevalencia de paratuberculosis o positivas a tuberculosis bovina. Por otro lado, recomendamos el uso de la técnica qPCR-fecal en explotaciones con bajo riesgo de paratuberculosis. Los animales que den positivo en cualquiera de estas técnicas no deberán estar en contacto con animales jóvenes o bien serán eliminados del rebaño.

Establecer un sistema de vigilancia de PTB en matadero: los animales sacrificados en matadero (desvieje, campañas de saneamiento, otras causas) serán sometidos a vigilancia utilizando la técnica qPCR-tejido intestinal para confirmar el diagnóstico en explotaciones afectadas o descartar la presencia de MAP en explotaciones aparentemente libres (utilizando muestras de VIC y NLIC). Este sistema de vigilancia aportará datos valiosos para conocer la evolución de la enfermedad en la zona y validar la eficacia de las medidas de control implementadas, además de certificar la ausencia de la enfermedad.

Adoptar una guía de buenas prácticas de manejo en las distintas fases de producción

1. Durante el parto:

- ✓ Disponer de un corral de partos ubicado en una zona físicamente aislada de las vacas en producción y de la recría.
- ✓ Evitar que varias vacas compartan el mismo corral de partos al mismo tiempo.
- ✓ Diseñar e implantar un protocolo de limpieza, desinfección y mantenimiento del corral de partos.
- ✓ Las vacas con resultados positivos y no se sacrificuen deben ser identificadas y separadas en otro corral durante el momento del parto. Además, se debe descartar su descendencia como futura recría y desechar el calostro de estas vacas para alimentar a los terneros.

- ✓ Mantener una adecuada higiene de las vacas, especialmente de las ubres y los pezones.
- ✓ Separar a los terneros de sus madres tan pronto como sea posible.
- ✓ Obtener el calostro siguiendo buenas prácticas de higiene y limpieza durante el proceso de ordeño.
- ✓ En explotaciones con una alta prevalencia de paratuberculosis, se recomienda pasteurizar el calostro o reemplazarlo por calostro comercial.
- ✓ Se debe evitar la mezcla de calostros de diferentes vacas. En caso necesario, se debe intentar mezclar únicamente calostro de vacas menores de 4 años, con el fin de reducir el riesgo de eliminación MAP en el calostro.

2. Durante la lactación:

- ✓ Ubicar el área de recría en una zona aislada de las vacas en producción, el corral de partos, el lazareto y la sala de ordeño, evitando también la presencia de escorrentías de estiércol.
- ✓ En caso de una alta prevalencia de la enfermedad, es preferible alojar a los terneros en cubículos individuales.
- ✓ Aplicar buenas prácticas de higiene y limpieza en los cubículos donde se alojan los terneros, así como en los utensilios utilizados para su alimentación, los cuales deben desinfectarse entre cada toma.
- ✓ Utilizar un lactoreemplazante artificial. Descartar la leche de vacas enfermas o con residuos de antibióticos y leche de tanque no pasteurizada.

3. Durante la cría de novillas y la adquisición de animales vivos:

- ✓ Evitar el contacto de las novillas con vacas adultas y minimizar su exposición al estiércol dentro de la explotación.
- ✓ En caso de pastoreo, se recomienda evitar la mezcla con vacas adultas u otras especies en producción. También se debe evitar pastar en áreas previamente utilizadas por rumiantes o donde se hayan aplicado purines de vaca en un período de al menos 12 meses.
- ✓ Limitar el acceso a agua estancada y suministrar agua de calidad.
- ✓ Control en la adquisición de animales vivos (diagnóstico y procedencia de granjas controladas).
- ✓ Disponer y utilizar salas de cuarentena para la introducción de animales, hasta confirmar la ausencia de excreción fecal de MAP mediante qPCR-fecal, si proceden de explotaciones no controladas.

En esta guía de *buenas prácticas* no pueden faltar un conjunto de medidas de Bioseguridad en las instalaciones que completan las actuaciones anteriormente llevadas a cabo, entre ellas destacamos:

- ✓ Establecer en cada explotación un circuito para la entrada y salida de vehículos, animales y personas.
- ✓ Disponer de un vallado cinético que impida el contacto con la fauna silvestre.
- ✓ Utilizar correctamente y mantener en buen estado el vado sanitario.
- ✓ Aplicar protocolos de limpieza y desinfección adecuados.

- ✓ Separar los animales muertos y evitar que el servicio de recogida acceda a la explotación para la retirada de los cadáveres.
- ✓ Revisar periódicamente las instalaciones para evitar la posible entrada de vectores (roedores, pájaros, etc.), controlar de puntos de agua y alimento.
- ✓ Establecer un protocolo para la gestión de purines
- ✓ Retirar periódicamente el material de las camas y contar con infraestructuras que permitan realizar el secado de estiércol en una zona alejada de la cría.

Todos los resultados presentados en esta tesis doctoral suponen un avance para el control de la paratuberculosis bovina en una zona endémica de tuberculosis. Ante la falta de directrices oficiales para abordar el control de la paratuberculosis, se debe adoptar un enfoque holístico que integre diferentes estrategias y fomente la colaboración entre ganaderos, servicios veterinarios y administraciones públicas. Se recomienda la implementación de un sistema de vigilancia en mataderos utilizando la técnica de qPCR en muestras de tejido intestinal para determinar la prevalencia de la enfermedad y su impacto, lo que servirá de base para el diseño de un programa de control que involucre a todos los ganaderos y promueva su aplicación. Por otro lado, es fundamental que la comunidad científica continúe investigando en estas áreas. Se necesita un mayor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, así como la mejora y el desarrollo de técnicas de diagnóstico más precisas. También se deben explorar otras posibilidades de control, como la vacunación y la resistencia genética a la enfermedad.

En el binomio conocido como Universidad-Empresa la transferencia del conocimiento alcanza su mayor compromiso en la formación de doctores en empresas, estos doctorados permiten establecer vínculos estables, fortalecen los departamentos I+D+i y acercan los conocimientos a la sociedad. La incorporación de doctores en las empresas confiere una visión más científica de los procesos gestionados, además posiciona al tejido productivo a la vanguardia del conocimiento

Capítulo V. Conclusiones

1. Los resultados obtenidos proporcionan información sobre la precisión diagnóstica y la aplicabilidad de la qPCR múltiple IS900/f57 en muestras fecales y de tejidos intestinales para la detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*. Es importante destacar la idoneidad de la qPCR para el diagnóstico post-mortem utilizando muestras de válvula ileocecal y nódulo linfático ileocecal. para confirmar o descartar la infección. Además, según los resultados obtenidos, la qPCR tisular podría considerarse una herramienta adecuada para aplicar sistemas de vigilancia en mataderos para el diagnóstico de la paratuberculosis.

2. Se obtuvieron unos valores de sensibilidad para el ELISA-PTB del 40,7 por ciento (IC95%: 27,5-53,9%) y una especificidad del 94,7 por ciento (IC95%: 91,4-98,0%). En animales positivos a tuberculosis, la SE fue más elevada [ES 94,4% (IC95%: 81,4-100,0)], y en animales negativos a tuberculosis, la SE fue inferior [SE 25,1% (IC95%: 11,8-38,4)]. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la presencia de tuberculosis interfiere en la precisión diagnóstica del ELISA-PTBb, y deben ser tenidos en cuenta atendiendo a las características epidemiológicas de la zona.

3. En este trabajo se ha diseñado y validado un cuestionario que ha permitido clasificar las ganaderías de la zona atendiendo al nivel de riesgo de la paratuberculosis (riesgo bajo, moderado, elevado). La mitad de las ganaderías presentaron un riesgo moderado (26,8%) o elevado (22%), datos que proporcionan una visión general de las explotaciones de la zona. El cuestionario elaborado puede ser una herramienta útil para implementar medidas de control que disminuyan la prevalencia de la paratuberculosis bovina.

4. Se propone un programa de vigilancia y control de la paratuberculosis bovina para las ganaderías de vacuno lechero del sur de España, con el objetivo de reducir la prevalencia en explotaciones afectadas y certificar la ausencia de la enfermedad en explotaciones libres, basado en cuatro pilares: *i) caracterizar el riesgo de infección por MAP a nivel de rebaño; ii) identificar animales infectados en las explotaciones; iii) establecer un sistema de vigilancia de PTB en matadero; iv) adoptar una guía de buenas prácticas de manejo en las distintas fases de producción.*

Capítulo VI. Bibliografía

- Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., DiGiuseppe Champion, P. A., Cox, J., Luirink, J., Vandebroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmelk, B. J. & Bitter, W. (2007). Type VII secretion - Mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 883–891. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1773>
- Acharya, K. R., Dhand, N. K., Whittington, R. J. & Plain, K. M. (2017). PCR inhibition of a quantitative PCR for detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis DNA in feces: Diagnostic implications and potential solutions. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00115>
- Álvarez, J., De Juan, L., Briones, V., Romero, B., Aranaz, A., Fernández-Garayzábal, J. F. & Mateos, A. (2005). Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in fallow deer and wild boar in Spain. *The Veterinary Record*, 156(7), 212–213. <https://doi.org/10.1136/VR.156.7.212>
- Álvarez, Julio, de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J. L., Marqués, S., Domínguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Domínguez, L. & Aranaz, A. (2009). Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology*, 135(3–4), 389–393. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.060>
- Ansari-Lari, M., Haghkhah, M., Bahramy, A. & Novin Baheran, A. M. (2009). Risk factors for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4), 553–557. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9221-7>
- Ansari-Lari, M., Haghkhah, M. & Mahmoodi, F. (2012). Association of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection with milk production and calving interval in Iranian Holsteins. *Tropical Animal Health and Production*, 44(5), 1111–1116. <https://doi.org/10.1007/S11250-011-0047-3/TABLES/5>
- Arsenault, R. J., Maattanen, P., Daigle, J., Potter, A., Griebel, P. & Napper, S. (2014). From mouth to macrophage: mechanisms of innate immune subversion by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Veterinary Research*, 45(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>
- Astorga Márquez, R. J., Carvajal, A., Maldonado, A., Gordon, S. V., Salas, R., Gómez-Guillamón, F., Sánchez-Baro, A., López-Sebastián, A. & Santiago-Moreno, J. (2014). Influence of cohabitation between domestic goat (Capra aegagrus hircus) and Iberian ibex (Capra pyrenaica hispanica) on seroprevalence of infectious diseases. *European Journal of Wildlife Research*, 60(2), 387–390. <https://doi.org/10.1007/S10344-013-0785-9/METRICS>
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P. & Pavlik, I. (2004). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.07.011>
- Bandos, A. I., Rockette, H. E. & Gur, D. (2010). Use of likelihood ratios for comparisons of binary diagnostic tests: Underlying ROC curves. *Medical Physics*, 37(11), 5821–5830. <https://doi.org/10.1118/1.3503849>
- Barden, M., Smith, R. F. & Higgins, H. M. (2020). The interpretation of serial Johne's disease milk antibody results is affected by test characteristics, pattern of test results and parallel bovine tuberculosis testing. *Preventive Veterinary Medicine*, 183(August), 105134. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105134>
- Barkema, H. W., Orsel, K., Nielsen, S. S., Koets, A. P., M G Rutten, V. P., Bannantine, J. P., Keefe, G. P., Kelton, D. F., Ritter, C., Roche, S., Corbett, C. S., Wolf, R., Griebel, P. J.,

- Kastelic, J. P., De Buck, J. & W Barkema, C. H. (2018). Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *Transbound Emerg Dis*, *65*, 125–148. <https://doi.org/10.1111/tbed.12723>
- Barrero-Domínguez, B., Luque, I., Huerta, B., Gomez-Laguna, J., Galán-Relaño, Á., Gómez-Gascón, L., Sánchez, M. & Astorga, R. J. (2019). Paratuberculosis in dairy goat flocks from southern Spain: risk factors associated with seroprevalence. *The Veterinary Record*, *185*(19), 600. <https://doi.org/10.1136/VR.105465>
- Bastida, F. & Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: A review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8/FIGURES/2>
- Bates, A., O'Brien, R., Liggett, S. & Griffin, F. (2019). Control of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection on a New Zealand pastoral dairy farm. *BMC Veterinary Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2014-6>
- Beaudeau, F., Belliard, M., Joly, A. & Seegers, H. (2007). Reduction in milk yield associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map) infection in dairy cows. *Veterinary Research*, *38*(4), 625–634. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2007021>
- Beaver, A., Sweeney, R. W., Hovingh, E., Wolfgang, D. R., Gröhn, Y. T. & Schukken, Y. H. (2017). Longitudinal relationship between fecal culture, fecal quantitative PCR, and milk ELISA in *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis-infected cows from low-prevalence dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *100*(9), 7507–7521. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12928>
- Bech-Nielsen, S., Jorgensen, J. B., Ahrens, P. & Feld, N. C. (1992). Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*(3), 613–618. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.3.613-618.1992>
- Beinhauerova, M., Beinhauerova, M., McCallum, S., Sellal, E., Ricchi, M., O'Brien, R., Blanchard, B., Slana, I., Babak, V. & Kralik, P. (2021). Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by quantitative PCR. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90789-0>
- Berghaus, R. D., Farver, T. B., Anderson, R. J., Jaravata, C. C. & Gardner, I. A. (2006). Environmental sampling for detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis on large California dairies. *Journal of Dairy Science*, *89*(3), 963–970. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72161-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72161-0)
- Berghaus, Roy D., Lombard, J. E., Gardner, I. A. & Farver, T. B. (2005). Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, *72*(3–4), 291–309. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2005.07.011>
- Bermudez, L. E., Petrofsky, M., Sommer, S. & Barletta, R. G. (2010). Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infection and Immunity*, *78*(8), 3570–3577. <https://doi.org/10.1128/IAI.01411-09>
- Blanco Vázquez, C., Alonso-Hearn, M., Juste, R. A., Canive, M., Iglesias, T., Iglesias, N., Amado, J., Vicente, F., Balseiro, A. & Casais, R. (2020). Detection of latent forms of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis diagnostic sensitivity. *PLoS ONE*, *15*(9 September 2020), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236336>
- Bolton, M. W., Pillars, R. B., Kaneene, J. B., Mauer, W. A. & Grooms, D. L. (2011). Detection

- of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in naturally exposed dairy heifers and associated risk factors. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4669–4675. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4158>
- Bossuyt, P. M., Reitsma, J. B., Bruns, D. E., Gatsonis, C. A., Glasziou, P. P., Irwig, L., Lijmer, J. G., Moher, D., Rennie, D., De Vet, H. C. W., Kressel, H. Y., Rifai, N., Golub, R. M., Altman, D. G., Hooft, L., Korevaar, D. A., Cohen, J. F., Alonzo, T., Azuara-Blanco, A., ... Ziegler, A. (2015). STARD 2015: An Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies. *Clinical Chemistry*, 61(12), 1446–1452. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2015.246280>
- Botsaris, G., Swift, B. M. C., Slana, I., Liapi, M., Christodoulou, M., Hatzitofi, M., Christodoulou, V. & Rees, C. E. D. (2016). Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 91–94. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.09.011>
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1–3), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)
- Bridges, N. & van Winden, S. (2021). The occurrence of *mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis positive milk antibody elisa results in dairy cattle under varying time periods after skin testing for bovine tuberculosis. *Animals*, 11(5), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ani11051224>
- Bryant, J. M., Thibault, V. C., Smith, D. G. E., McLuckie, J., Heron, I., Sevilla, I. A., Biet, F., Harris, S. R., Maskell, D. J., Bentley, S. D., Parkhill, J. & Stevenson, K. (2016). Phylogenomic exploration of the relationships between strains of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *BMC Genomics*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-2234-5/FIGURES/4>
- Bull, T. J., Munshi, T., Mikkelsen, H., Hartmann, S. B., Sørensen, M. R., Garcia, J. S., Lopez-Perez, P. M., Hofmann, S., Hilpert, K. & Jungersen, G. (2017). Improved culture medium (TiKa) for *Mycobacterium avium* Subspecies Paratuberculosis (MAP) Matches qPCR Sensitivity and Reveals Significant Proportions of Non-viable MAP in Lymphoid Tissue of Vaccinated MAP Challenged Animals. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02112>
- Butot, S., Ricchi, M., Sevilla, I. A., Michot, L., Molina, E., Tello, M., Russo, S., Arrigoni, N., Garrido, J. M. & Tomas, D. (2019). Estimation of performance characteristics of analytical methods for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis detection in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00509>
- Byrne, A. W., Guelbenzu-Gonzalo, M., Strain, S. A. J., McBride, S., Graham, J., Lahuerta-Marin, A., Harwood, R., Graham, D. A. & McDowell, S. (2017). Assessment of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and *Mycobacterium bovis*: A herd-level risk factor analysis from Northern Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 141, 38–47. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2017.04.007>
- Cardoso-Toset, F., Gómez-Laguna, J., Amarilla, S. P., Vela, A. I., Carrasco, L., Fernández-Garayzábal, J. F., Astorga, R. J. & Luque, I. (2015). Multi-Etiological Nature of Tuberculosis-Like Lesions in Condemned Pigs at the Slaughterhouse. *PLOS ONE*, 10(9), e0139130. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139130>
- Cardoso-Toset, F., Luque, I., Amarilla, S. P., Gómez-Gascón, L., Fernández, L., Huerta, B., Carrasco, L., Ruiz, P. & Gómez-Laguna, J. (2015). Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 204(2), 232–234. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2015.01.022>

- Carta, T., Álvarez, J., Pérez de la Lastra, J. M. & Gortázar, C. (2013). Wildlife and paratuberculosis: A review. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2012.11.002>
- Castejon, M., Menéndez, M. C., Comas, I., Vicente, A. & Garcia, M. J. (2018). Whole-genome sequence analysis of the Mycobacterium avium complex and proposal of the transfer of Mycobacterium yongonense to Mycobacterium intracellulare subsp. yongonense subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(6), 1998–2005. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002767>
- Cho, J., Tauer, L. W., Schukken, Y. H., Gómez, M. I., Smith, R. L., Lu, Z. & Grohn, Y. T. (2012). Economic analysis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis vaccines in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1855–1872. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4787>
- Collins, D. M., Gabric, D. M. & De Lisle, G. W. (1990). Identification of two groups of Mycobacterium paratuberculosis strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1591. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.7.1591-1596.1990>
- Collins, M. T., Eggleston, V. & Manning, E. J. B. (2010). Successful control of Johne's disease in nine dairy herds: Results of a six-year field trial. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1638–1643. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2664>
- Corbett, C. S., De Buck, J., Orsel, K. & Barkema, H. W. (2017). Fecal shedding and tissue infections demonstrate transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in group-housed dairy calves. *Veterinary Research*, 48(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13567-017-0431-8/TABLES/2>
- Corner, A. & Trajstman, A. C. (1988). Mycobacterium boris from Bovine Lesions. *Veterinary Microbiology*, 18, 34.
- Corner, L. A. L., Pfeiffer, D. U. & Abbott, K. A. (2004). The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(3), 170–173. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2004.TB12652.X>
- Dane, H., Stewart, L. D. & Grant, I. R. (2023). Culture of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: challenges, limitations and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jambio/txac017>
- Daniels, M. J., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J. M. & Hutchings, M. R. (2003). The potential role of wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* in the epidemiology of paratuberculosis in domestic ruminants. *Epidemiology and Infection*, 130(3), 553. <https://doi.org/10.1017/s0950268803008471>
- De Juan Ferré, L. (2005). *Paratuberculosis Caprina: aportaciones a su diagnóstico , epidemiología molecular y control*. Universidad Complutense de Madrid.
- Delgado, L., Marín, J. F. G., Muñoz, M., Benavides, J., Juste, R. A., García-Pariente, C., Fuertes, M., González, J., Ferreras, M. C. & Pérez, V. (2013). Pathological findings in young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, 50(5), 857–866. <https://doi.org/10.1177/0300985813476066>
- DGSPA, D. G. de S. de la P. A. (2022). *Anexo II Informe final técnico -financiero. Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina 2022*. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/annexiinformefinaltb2022_tcm30-653223.pdf
- Didkowska, A., Krajewska-Wędzina, M., Klich, D., Prolejko, K., Orłowska, B. & Anusz, K. (2021). The risk of false-positive serological results for paratuberculosis in mycobacterium bovis-infected cattle. *Pathogens*, 10(8), 1–8. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081054>

- Diéguez, F. J., Arnaiz, I., Sanjuán, M. L., Vilar, M. J., López, M. & Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in cattle in Galicia (northwest Spain). *Preventive Veterinary Medicine*, 82(3–4), 321–326. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2007.08.006>
- Donat, K., Soschinka, A., Erhardt, G. & Brandt, H. R. (2014). Paratuberculosis: Decrease in milk production of German Holstein dairy cows shedding *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis depends on within-herd prevalence. *Animal*, 8(5), 852–858. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000305>
- Donat, Karsten, Schmidt, M., Köhler, H. & Sauter-Louis, C. (2016). Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3744–3752. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-10625>
- Doré, E., Paré, J., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J. P. & Fecteau, G. (2012). Risk Factors Associated with Transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to Calves within Dairy Herd: A Systematic Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(1), 32–45. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2011.00854.X>
- Dufour, B., Pouillot, R. & Durand, B. (2004). A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Veterinary Research*, 35(1), 69–81. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2003045>
- Eda, S., Bannantine, J. P., Waters, W. R., Mori, Y., Whitlock, R. H., Scott, M. C. & Speer, C. A. (2006). A highly sensitive and subspecies-specific surface antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(8), 837–844. <https://doi.org/10.1128/CVI.00148-06>
- Eisenberg, S. W., Rutten, V. P. & Koets, A. P. (2015). Dam *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: A cohort study Modeling Johne's disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn. *Veterinary Research*, 46(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13567-015-0191-2/TABLES/2>
- Eslami, M., Shafiei, M., Ghasemian, A., Valizadeh, S., Al-Marzoqi, A. H., Shokouhi Mostafavi, S. K., Nojoomi, F. & Mirforoghi, S. A. (2019). *Mycobacterium avium* paratuberculosis and *Mycobacterium avium* complex and related subspecies as causative agents of zoonotic and occupational diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 12415–12421. <https://doi.org/10.1002/jcp.28076>
- European Commission. (2020). *Communication from the commission to the European Parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions. Brussels 20-05-2020.* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A52020DC0381#footnote6>
- Falkinham, J. O. (2002). Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clinics in Chest Medicine*, 23(3), 529–551. [https://doi.org/10.1016/S0272-5231\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0272-5231(02)00014-X)
- FAOSTAT. (2023). *Food and Agriculture Organization statistical database.* <https://www.fao.org/faostat/es/#data/TCL/visualize>
- Fawzy, A., Eisenberg, T., El-Sayed, A. & Zschöck, M. (2015). Improvement of sensitivity for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) detection in bovine fecal samples by specific duplex F57/IC real-time and conventional IS900 PCRs after solid culture enrichment. *Tropical Animal Health and Production*, 47(4), 721–726. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0784-9>
- Fechner, K., Dreyman, N., Schimkowiak, S., Czerny, C. P. & Teitzel, J. (2019). Efficacy of dairy on-farm high-temperature, short-time pasteurization of milk on the viability of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11280–11290. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-16590>

- Fecteau, M. E., Whitlock, R. H., Buergelt, C. D. & Sweeney, R. W. (2010). Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 51(2), 198. /pmc/articles/PMC2808288/
- Fernandez, M. (2017). *Influencia del agentes etiológico y la respuesta inmunitaria local sobre la patogenicidad de la paratuberculosis de los rumiantes.*
- Florkowski, C. M. (2008). Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 29 Suppl 1(August), S83-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852864> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556590>
- Fock-Chow-Tho, D., Topp, E., Ibeagha-Awemu, E. A. & Bissonnette, N. (2017). Comparison of commercial DNA extraction kits and quantitative PCR systems for better sensitivity in detecting the causative agent of paratuberculosis in dairy cow fecal samples. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 572–581. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11384>
- Francis, J. (1943). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. *Journal of Comparative Pathology*, 53, 140–150. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(62\)80024-1](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(62)80024-1)
- García-Ispuerto, I. & López-Gatius, F. (2016). Early Foetal Loss Correlates Positively with Seroconversion against *Mycobacterium avium* paratuberculosis in High-Producing Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(2), 227–231. <https://doi.org/10.1111/RDA.12670>
- García-Martos, P. & García-Agudo, L. (2012). Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(4), 192–200. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2011.09.017>
- García, A. B. & Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5019–5039. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-9241>
- García de Tena, A., Gámiz, P. & Barba, C. (2018). *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Manual técnico sobre controles de la cadena alimentaria en el sector lácteo de Andalucía.*
- Gardner, I. A., Colling, A., Caraguel, C. G., Crowther, J. R., Jones, G., Firestone, S. M. & Heuer, C. (2021). Introduction – Validation of tests for OIE-listed diseases as fit-for-purpose in a world of evolving diagnostic technologies. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 40(1), P.P 173-188. <https://doi.org/10.20506/RST.40.1.3207>
- Garrido, J. M., Cortabarría, N., Oguiza, J. A., Aduriz, G. & Juste, R. A. (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 379–386. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00323-0)
- Garrido, Joseba M., Vazquez, P., Molina, E., Plazaola, J. M., Sevilla, I. A., Geijo, M. V., Alonso-Hearn, M. & Juste, R. A. (2013). Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS ONE*, 8(11), 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080985>
- Geraghty, T., Graham, D. A., Mullowney, P. & More, S. J. (2014). A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Preventive Veterinary Medicine*, 116(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2014.06.003>
- Gilardoni, L. R., Paolicchi, F. A. & Mundo, S. L. (2012). Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(3), 201–215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102470>
- Gill, C. O., Saucier, L. & Meadus, W. J. (2011). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis

- in dairy products, meat, and drinking water. *Journal of Food Protection*, 74(3), 480–499. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-301>
- Godden, S. M., Fetrow, J. P., Feirtag, J. M., Green, L. R. & Wells, S. J. (2005). Economic analysis of feeding pasteurized nonsaleable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(9), 1547–1554. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.2005.226.1547>
- González, J., Geijo, M. V., García-Pariente, C., Verna, A., Corpa, J. M., Reyes, L. E., Ferreras, M. C., Juste, R. A., García Marín, J. F. & Pérez, V. (2005). Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 133(2–3), 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.04.007>
- Gwyther, C. L., Williams, A. P., Golyshin, P. N., Edwards-Jones, G. & Jones, D. L. (2011). The environmental and biosecurity characteristics of livestock carcass disposal methods: A review. *Waste Management*, 31(4), 767–778. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2010.12.005>
- Harris, N. B. & Barletta, R. G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 489–512. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001>
- Hasonova, L., Trcka, I., Babak, V., Rozsypalova, Z., Pribylova, R. & Pavlik, I. (2009). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in tissues of naturally infected cattle as affected by age. *Veterinarni Medicina*, 54(6), 257–269. <https://doi.org/10.17221/54/2009-VETMED>
- Hett, E. C. & Rubin, E. J. (2008). Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(1), 126–156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-07/ASSET/16F75C19-D1BA-4EAA-B38C-07C6160F1053/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0010821750005.JPEG>
- Hosseiniporham, S., Cubeddu, T., Rocca, S. & Sechi, L. A. (2020). Identification of mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (map) in sheep milk, a zoonotic problem. *Microorganisms*, 8(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091264>
- INLAC. (2022). *Organizacion interprofesional lactea. Informe IFCN (International Farm Comparison Network) Dairy Report enero-octubre*. <https://inlac.es/wp-content/uploads/2022/12/Informe-IFCN-noviembre-2022.pdf>
- Ireng, L. M., Walravens, K., Govaerts, M., Godfroid, J., Rosseels, V., Huygen, K. & Gala, J. L. (2009). Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of M. avium sub sp. paratuberculosis in faecal samples. *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.087>
- Jain, M., Singh, A. K., Kumar, A., Gupta, S., Polavarapu, R. & Sohal, J. S. (2022). Comparative performance of different antigens on the lateral flow assay (LFA) platform for the rapid serodiagnosis of paratuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 192(September 2021), 106367. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106367>
- Jiménez-Martín, D., García-Bocanegra, I., Risalde, M. A., Fernández-Molera, V., Jiménez-Ruiz, S., Isla, J. & Cano-Terriza, D. (2022). Epidemiology of paratuberculosis in sheep and goats in southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 202, 105637. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2022.105637>
- Johne, H. A. & Frothingham, L. (1895). Ein eigenthüemlicher Fall von Tuberkulose beim rind. *Dtsch. Z. Tiermed. Pathol*, 21, 438–454.
- Jubb, T. & Galvin, J. (2000). Herd testing to control bovine Johne's disease. *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 423–428. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00327-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00327-8)
- Juste, R. A., Geijo, M. V., Elguezabal, N., Sevilla, I. A., Alonso-Hearn, M. & Garrido, J. M.

- (2021a). Paratuberculosis vaccination specific and non-specific effects on cattle lifespan. *Vaccine*, 39(11), 1631–1641. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.058>
- Karuppusamy, S., Mutharia, L., Kelton, D., Plattner, B., Mallikarjunappa, S., Karrow, N. & Kirby, G. (2021). Detection of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis (MAP) Microorganisms Using Antigenic MAP Cell Envelope Proteins. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(February). <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.615029>
- Kawaji, S., Nagata, R., Minegishi, Y., Saruyama, Y., Mita, A., Kishizuka, S., Saito, M. & Mori, Y. (2020). A novel real-time PCR-based screening test with pooled fecal samples for bovine johnes disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(12). <https://doi.org/10.1128/JCM.01761-20>
- Keller, S. M., Stephan, R., Kuenzler, R., Meylan, M. & Wittenbrink, M. M. (2014). Comparison of fecal culture and F57 real-time polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Swiss cattle herds with a history of paratuberculosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 68. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0068-9>
- Kennedy, A. E., da Silva, A. T., Byrne, N., Govender, R., MacSharry, J., O'Mahony, J. & Sayers, R. G. (2014). The single intradermal cervical comparative test interferes with Johnes disease ELISA diagnostics. *Frontiers in Immunology*, 5(NOV), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00564>
- Kennedy, A. E., O'Mahony, J., Byrne, N., MacSharry, J. & Sayers, R. G. (2017). Is TB testing associated with increased blood interferon-gamma levels? *Frontiers in Veterinary Science*, 4(OCT). <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00176>
- Khol, J. L., Wassertheurer, M., Sodoma, E., Revilla-Fernández, S., Damoser, J., österreichischer, E., Dünser, M., Kleb, U. & Baumgartner, W. (2013). Long-term detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual and bulk tank milk from a dairy herd with a low prevalence of Johnes disease. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3517–3524. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-6466>
- Khol, Johannes Lorenz & Baumgartner, W. (2012). Examples and Suggestions for the Control of Paratuberculosis in European Cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60(Supplement), S1–S7. <https://doi.org/10.14943/JJVR.60.SUPPL.S1>
- Kirkeby, C., Græsboell, K., Nielsen, S. S., Toft, N. & Halasa, T. (2017). Epidemiological and economic consequences of purchasing livestock infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1119-z>
- Krasil'nikov, N. A. (1941). Guide to the bacteria and Actinomycetes. *Institute of Microbiology, Academy of Science, Publishing Firm Nauka, Moscow, USSR*, 1–830.
- Kudahl, A. B. & Nielsen, S. S. (2009). Effect of paratuberculosis on slaughter weight and slaughter value of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4340–4346. <https://doi.org/10.3168/JDS.2009-2039>
- Kuenstner, J. T., Naser, S., Chamberlin, W., Borody, T., Graham, D. Y., McNees, A., Hermon-Taylor, J., Hermon-Taylor, A., Thomas Dow, C., Thayer, W., Biesecker, J., Collins, M. T., Sechi, L. A., Singh, S. V., Zhang, P., Shafran, I., Weg, S., Telega, G., Rothstein, R., ... Kuenstner, L. (2017). The consensus from the Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) conference 2017. *Frontiers in Public Health*, 5(September), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00208>
- Künzler, R., Torgerson, P., Keller, S., Wittenbrink, M., Stephan, R., Knubben-Schweizer, G., Berchtold, B. & Meylan, M. (2014). Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Swiss dairy and beef herds. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-132/TABLES/5>

- Lamont, E. A., Bannantine, J. P., Armién, A., Ariyakumar, D. S. & Sreevatsan, S. (2012). Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. Paratuberculosis Cultures. *PLOS ONE*, 7(1), e30648. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030648>
- Laurin, E., McKenna, S., Chaffer, M. & Keefe, G. (2015). Sensitivity of solid culture, broth culture, and real-time PCR assays for milk and colostrum samples from *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis-infectious dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8597–8609. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8758>
- Lavers, C. J., Barkema, H. W., Dohoo, I. R., McKenna, S. L. B. & Keefe, G. P. (2014). Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in dairy herds and association with within-herd prevalence. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 299–309. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7101>
- Lehman, K. & Neumann, L. B. (1896). *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*. (1st ed.).
- Lesmanawati, D. A. S., Veenstra, P., Moa, A., Adam, D. C. & MacIntyre, C. R. (2020). A rapid risk analysis tool to prioritise response to infectious disease outbreaks. *BMJ Global Health*, 5(6), e002327. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-002327>
- Levy-Frebault, V. V. & Portaels, F. (1992). Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 315–323. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-315>
- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S. & Kapur, V. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(35), 12344–12349. https://doi.org/10.1073/PNAS.0505662102/SUPPL_FILE/05662FIG5.JPG
- Lienuax, E. & van den Eeckhout, A. (1906). Recherches nouvelles concernant la nature tuberculeuse de l'enterite hypertrophiante du boeuf. *Annals de Médecine Vétérinaire*, 55, 84–93.
- Lilenbaum, W., Marassi, C. D., Vargas, R., Medeiros, L., Oelemann, W. M. R. & Fonseca, L. S. (2009). Occurrence of false-positive results in three paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd. *Veterinary Research Communications*, 33(7), 693–699. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9218-3>
- Lilenbaum, Walter, Ferreira, R., Marassi, C. D., Ristow, P., Oelemann, W. M. R. & Fonseca, L. D. S. (2007). Interference of tuberculosis on the performance of ELISAs used in the diagnosis of paratuberculosis in cattle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 472–477. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300016>
- López, A. S. (2021). One health: implicaciones de la erradicación de la brucelosis en el reservorio animal en España. *Revista Española de Salud Pública*, 3–3. <https://recyt.fecyt.es/index.php/RESP/article/view/93062>
- Machado, G., Kanankege, K., Schumann, V., Wells, S., Perez, A. & Alvarez, J. (2018). Identifying individual animal factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) milk ELISA positivity in dairy cattle in the Midwest region of the United States. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-018-1354-Y>
- Magombedze, G., Ngonghala, C. N. & Lanzas, C. (2013). Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne’s Disease through Mathematical Modelling. *PLoS ONE*, 8(10).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076636>

- Maio, E., Carta, T., Balseiro, A., Sevilla, I. A., Romano, A., Ortiz, J. A., Vieira-Pinto, M., Garrido, J. M., de la Lastra, J. M. P. & Gortázar, C. (2011). Paratuberculosis in European wild rabbits from the Iberian Peninsula. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2010.12.014>
- Mallikarjunappa, S., Brito, L. F., Pant, S. D., Schenkel, F. S., Meade, K. G. & Karrow, N. A. (2021). Johne's Disease in Dairy Cattle: An Immunogenetic Perspective. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.718987>
- Manning, E. J. B. & Collins, M. T. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20(1), 133–150. <https://doi.org/10.20506/RST.20.1.1275>
- MAPA. (2019). *Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. Razas de ganado del catálogo oficial de España*. (Vol. 14).
- MAPA. (2022). *Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España. Estudio sobre el sector vacuno de carne en España. Datos SITRAN. Segmento: Engorde de Terneros*.
- MAPA. (2023). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Sanidad Animal*. <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/>
- Martins, E. G., Oliveira, P., Oliveira, B. M., Mendonça, D. & Niza-Ribeiro, J. (2018). Association of paratuberculosis sero-status with milk production and somatic cell counts across 5 lactations, using multilevel mixed models, in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7638–7649. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13746>
- McAloon, C. G., Doherty, M. L., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Citer, L. & Green, M. J. (2017). Relative importance of herd-level risk factors for probability of infection with paratuberculosis in Irish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(11), 9245–9257. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12985>
- McAloon, C. G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H. W., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Green, M. J. & Doherty, M. L. (2019a). A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 1: Epidemiology. *Veterinary Journal*, 246, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.010>
- McAloon, C. G., Roche, S., Ritter, C., Barkema, H. W., Whyte, P., More, S. J., O'Grady, L., Green, M. J. & Doherty, M. L. (2019b). A review of paratuberculosis in dairy herds — Part 2: On-farm control. *Veterinary Journal*, 246, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.009>
- McFadyean, J. (1906). A new disease of cattle (Johne's disease). *Annual Report for 1906 of the Principal of the Royal Veterinary College. J.R. Agric. Soc. Engl.*, 6, 230–241.
- McHugh, M. L. (2012). Lessons in biostatistics interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemica Medica*, 22(3), 276–282. <https://hrcak.srce.hr/89395>
- McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., Barkema, H. W. & Sockett, D. C. (2005). Evaluation of three ELISAs for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis using tissue and fecal culture as comparison standards. *Veterinary Microbiology*, 110(1–2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.010>
- McNees, A. L., Markesich, D., Zayyani, N. R. & Graham, D. Y. (2015). Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 9(12), 1523. <https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1093931>
- Miranda, C., Matos, M., Pires, I., Ribeiro, P., Álvares, S., Vieira-Pinto, M. & Coelho, A. C. (2011). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in slaughtered domestic

- pigs for consumption detected by molecular methods. *Food Research International*, 44(10), 3276–3277. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.09.010>
- Mizzi, R., Timms, V. J., Price-Carter, M. L., Gautam, M., Whittington, R., Heuer, C., Biggs, P. J. & Plain, K. M. (2021). Comparative Genomics of Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis Sheep Strains. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 637637. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.637637/BIBTEX>
- Möbius, 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. *Veterinary Microbiology*, 126(4), 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.016>
- Morales, A. B., Schmidt, C. G., Luis, J. & Llorente, S. (2020). *Tuberculosis animal: una aproximación desde la perspectiva de la Ciencia y la Administración*. <https://cpage.mpr.gob.es/>
- Mortier, R. A. R., Barkema, H. W., Bystrom, J. M., Illanes, O., Orsel, K., Wolf, R., Atkins, G. & De Buck, J. (2013). Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis using pathology and tissue culture. *Veterinary Research*, 44(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-94>
- Mortier, R. A. R., Barkema, H. W. & De Buck, J. (2015). Susceptibility to and diagnosis of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in dairy calves: A review. *Preventive Veterinary Medicine*, 121(3–4), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.011>
- Munárriz, R., Díez, E. & Caspistegui, D. (2018). Nuevo programa de control de paratuberculosis bovina. *Navarra Agraria*, 41–44.
- Nielsen, S. S., Bjerre, H. & Toft, N. (2008). Colostrum and milk as risk factors for infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91(12), 4610–4615. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1272>
- Nielsen, S. S. & Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4), 217–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011>
- Nielsen, S. S. & Toft, N. (2009). A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003>
- Nielsen, S. S. & Toft, N. (2011). Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1849–1857. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3817>
- Nielsen, Søren Saxmose. (2011). Dairy farmers' reasons for participation in the Danish control programme on bovine paratuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 98(4), 279–283. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2010.12.005>
- Nigou, J., Gilleron, M. & Puzo, G. (2003). Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. *Biochimie*, 85(1–2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00048-8)
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H. P., Goodfellow, M. & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 355158. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02007/BIBTEX>
- Obasanjo, I. O., Gröhn, Y. T. & Mohammed, H. O. (1997). Farm factors associated with the presence of Mycobacterium paratuberculosis infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Preventive Veterinary Medicine*, 32(3–4), 243–251. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00027-5)

- Olsen, I., Sigurðardóttir, O. G. & Dønne, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle a review. *Veterinary Quarterly*, 24(1), 12–28. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695120>
- Olsen, I., Tryland, M., Wiker, H. G. & Reitan, L. J. (2001). AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4), 797–801. <https://doi.org/10.1128/CDLI.08.4.797-801.2001>
- Ozsvari, L., Harnos, A., Lang, Z., Monostori, A., Strain, S. & Fodor, I. (2020). The Impact of Paratuberculosis on Milk Production, Fertility, and Culling in Large Commercial Hungarian Dairy Herds. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(October), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.565324>
- Park, H. E., Park, H. T., Jung, Y. H. & Yoo, H. S. (2017). Establishment a real-time reverse transcription PCR based on host biomarkers for the detection of the subclinical cases of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *PLoS ONE*, 12(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178336>
- Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pearson, L. (1908). A note on the occurrence in America of chronic bacterial dysentery of cattle. *American Veterinary Review*, 32, 602–605.
- Picasso-Risso, C., Gil, A., Nunez, A., Suanes, A., Macchi, V., Salaberry, X., Alvarez, J. & Perez, A. (2019). Diagnostic interaction between bovine tuberculosis (bTB) and Johne's disease in bTB highly prevalent dairy farms of Uruguay. *Veterinary and Animal Science*, 7(January), 100052. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100052>
- Picasso-Risso, Catalina, Grau, A., Bakker, D., Nacar, J., Mínguez, O., Perez, A. & Alvarez, J. (2019). Association between results of diagnostic tests for bovine tuberculosis and Johne's disease in cattle. *Veterinary Record*, 185(22), 693. <https://doi.org/10.1136/vr.105336>
- Pozzato, N., Gwozdz, J., Gastaldelli, M., Capello, K., Ben, C. D. & Stefani, E. (2011). Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 413–417. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.01.019>
- Prendergast, D. M., Pearce, R. A., Yearsley, D., Ramovic, E. & Egan, J. (2018). Evaluation of three commercial PCR kits for the direct detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) in bovine faeces. *Veterinary Journal*, 241(June 2017), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.09.013>
- Pritchard, T. C., Coffey, M. P., Bond, K. S., Hutchings, M. R. & Wall, E. (2017). Phenotypic effects of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 679–690. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11323>
- Puerto-Parada, M., Arango-Sabogal, J. C., Paré, J., Doré, E., Côté, G., Wellemans, V., Buczinski, S., Roy, J. P., Labrecque, O. & Fecteau, G. (2018). Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis herd status in Québec dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 152(February), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.010>
- Raffo, E., Steuer, P., Monti, G. & Salgado, M. (2017). Effect of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) infection on the diagnostic accuracy for *Mycobacterium bovis* (M. bovis) infection under field conditions in cattle belonging to low M. bovis prevalence herds. *Tropical Animal Health and Production*, 49(4), 771–775. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1259-y>

- Raffo, E., Steuer, P., Tomckowiack, C., Tejada, C., Collado, B. & Salgado, M. (2020). More insights about the interfering effect of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) infection on *Mycobacterium bovis* (M. bovis) detection in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 52(3), 1479–1485. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02151-2>
- Raizman, E. A., Wells, S. J., Godden, S. M., Fetrow, J. & Oakes, J. M. (2007). The associations between culling due to clinical Johne's disease or the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fecal shedding and the diagnosis of clinical or subclinical diseases in two dairy herds in Minnesota, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 80(2–3), 166–178. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2007.02.005>
- Rangel, S. J., Paré, J., Doré, E., Arango, J. C., Côté, G., Buczinski, S., Labrecque, O., Fairbrother, J. H., Roy, J. P., Wellemans, V. & Fecteau, G. (2015). A systematic review of risk factors associated with the introduction of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis (MAP) into dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 56(2), 169. [/pmc/articles/PMC4298270/](https://doi.org/10.1139/cvja-2014-0111)
- Raszek, M. M., Guan, L. L. & Plastow, G. S. (2016). Use of genomic tools to improve cattle health in the context of infectious diseases. *Frontiers in Genetics*, 7(MAR), 171574. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2016.00030/BIBTEX>
- Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales., (1996). <https://www.boe.es/buscar/pdf/1996/BOE-A-1996-28539-consolidado.pdf>
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R. & Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 77–90. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2005.12.021>
- Reynolds, J., Moyes, R. B. & Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Acid Fast Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1), A.3H.1-A.3H.5. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.MCA03HS15>
- Richardson, E. K. B. & More, S. J. (2009). Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. *Irish Veterinary Journal*, 62(8), 526–532. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-8-526>
- Rogall, T., Flohr, T. & Bottger, E. C. (1990). Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *Journal of General Microbiology*, 136(9), 1915–1920. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-9-1915>
- Rossi, G., Grohn, Y. T., Schukken, Y. H. & Smith, R. L. (2017a). The effect of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7446–7454. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12721>
- Rossi, G., Grohn, Y. T., Schukken, Y. H. & Smith, R. L. (2017b). The effect of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis infection on clinical mastitis occurrence in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7446–7454. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12721>
- Roupie, V., Alonso-Velasco, E., Van Der Heyden, S., Holbert, S., Duytschaever, L., Berthon, P., Van Dosselaer, I., Van Campe, W., Mostin, L., Biet, F., Roels, S., Huygen, K. & Fretin, D. (2018). Evaluation of mycobacteria-specific gamma interferon and antibody responses before and after a single intradermal skin test in cattle naturally exposed to *M. avium* subsp. paratuberculosis and experimentally infected with *M. bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 196(July 2017), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.12.007>
- Sackett, D., Straus, S., Richardson, W., Rosenberg, W. & Haynes, R. (2001). Diagnóstico y cribado. In Harcourt (Ed.), *Medicina basada en la evidencia : Cómo practicar y enseñar la medicina basada en la evidencia* (Second, pp. 62–68).
- Salem, M., Heydel, C., El-Sayed, A., Ahmed, S. A., Zschöck, M. & Baljer, G. (2012).

- Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: An insidious problem for the ruminant industry. *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), 351–366. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0274-2>
- Salgado, M., Collins, M. T., Salazar, F., Kruze, J., Bölske, G., Söderlund, R., Juste, R., Sevilla, I. A., Biet, F., Troncoso, F. & Alfaro, M. (2011). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis after application of contaminated dairy cattle manure to agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2122–2129. <https://doi.org/10.1128/AEM.02103-10>
- Sánchez-Carvajal, J. M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Jurado-Martos, F., Larenas-Muñoz, F., Vera, E., Gómez-Gascón, L., Cardoso-Toset, F., Rodríguez-Gómez, I. M., Maldonado, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Gómez-Laguna, J. & Luque, I. (2021). Real-Time PCR Validation for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection Targeting IS6110 Directly From Bovine Lymph Nodes. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(April), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643111>
- Sechi, L. A. & Dow, C. T. (2015). *Mycobacterium avium* ss. paratuberculosis Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn’s Disease. *Frontiers in Immunology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00096>
- Serrano, M., Elguezabal, N., Sevilla, I. A., Geijo, M. V., Molina, E., Arrazuria, R., Urkitza, A., Jones, G. J., Vordermeier, M., Garrido, J. M. & Juste, R. A. (2017). Tuberculosis Detection in Paratuberculosis Vaccinated Calves: New Alternatives against Interference. *PLOS ONE*, 12(1), e0169735. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0169735>
- Sevilla, I., Aduriz, G., Garrido, J. M., Geijo, M. V. & Juste, R. A. (2002). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. In *In Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis*. <https://doi.org/10.1079/9781789243413.0001>
- SGACE. (2022). *Subdirección General de Análisis Coordinación y Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe Anual de Comercio Exterior Agroalimentario y Pesquero 2021*. <https://cpage.mpr.gob.es>
- SGAGyA. (2021). *Secretaría General de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía. Caracterización del sector agrario y pesquero de Andalucía*. 1–498.
- SGAGyDR. (2007). *Secretaría General de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural-Junta de Andalucía. Caracterización de las Explotaciones Andaluzas de Vacuno Lácteo*.
- SGPGyC & DGPyMA. (2022a). *Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cínicas. Dirección General de Productos y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. El sector vacuno de leche en cifras 2021*. <https://cpage.mpr.gob.es/NIPO:003221192>
- SGPGyC & DGPyMA. (2022b). *Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cínicas. Dirección General de Productos y Mercados Agrarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Estructura del sector vacuno lechero en España y en la Unión Europea*.
- Shinnick, T. M. & Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 13(11), 884–901. <https://doi.org/10.1007/BF02111489>
- Sidoti, F., Banche, G., Astegiano, S., Allizond, V., Cuffini, A. M. & Bergallo, M. (2011). Validation and standardization of IS900 and F57 real-time quantitative PCR assays for the specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(5), 347–354. <https://doi.org/10.1139/w11-022>
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A. & Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium*

- subsp. paratuberculosis in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.013>
- Stabel, J. R., Bradner, L., Robbe-Austerman, S. & Beitz, D. C. (2014). Clinical disease and stage of lactation influence shedding of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6296–6304. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-8204>
- Stevenson, K. & Kapur, V. (2020). *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control* (M. A. Behr (ed.)).
- Stich, R. W., Byrum, B., Love, B., Theus, N., Barber, L. & Shulaw, W. P. (2004). Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of Mycobacterium avium paratuberculosis in bovine feces. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 267–275. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2003.10.013>
- Streeter, R., Hoffsis, G., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. & Rings, D. (1995). Isolation of Mycobacterium paratuberculosis from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res*, 56(10), 1322–1324.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 12(2), 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30408-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30408-4)
- Sweeney, R. W., Uzonna, J., Whitlock, R. H., Habecker, P. L., Chilton, P. & Scott, P. (2006). Tissue predilection sites and effect of dose on Mycobacterium avium subs. paratuberculosis organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. *Research in Veterinary Science*, 80(3), 253–259. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2005.07.007>
- Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J. L. & Gicquel, B. (1990). Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), 2668–2673. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.12.2668-2673.1990>
- Thorel, M. F., Krichevsky, M. & Levy-Frebault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of Mycobacterium avium, and description of Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov., Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov., and Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 254–260. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-254/CITE/REFWORKS>
- Thorel, M., Huchzermeyer, H., Weiss, R., Fontaine, J. & Fontaine, J. J. (1997). Mycobacterium avium infections in animals. Literature review Mycobacterium avium infections in animals. Literature review MF Thorel. *Literature Review. Veterinary Research*, 28(5), 439–447. <https://hal.science/hal-00902492>
- Timms, V. J., Mitchell, H. M. & Neilan, B. A. (2015). Optimisation of DNA extraction and validation of PCR assays to detect Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*, 112, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.016>
- Tribunal De Cuentas Europeo. (2016). Informe Especial: Programas de erradicación, control y vigilancia para combatir las enfermedades animales. In *Unión Europea*. <https://doi.org/10.2865/9431>
- Twort, F. W. & Ingram, G. L. Y. (1912). Johne's disease. A method for isolating and cultivating the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johnei, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Veterinary Journal*, 68, 353–365.
- USDA. (2005). *United States Department of Agriculture, Johne's Disease on U.S. Dairy*

- Van der Giessen, J. W. B., Haring, R. M. & Van der Zeijst, B. A. M. (1994). Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiology (Reading, England)*, *140* (Pt 5)(5), 1103–1108. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-5-1103>
- Van Ingen, J., Turenne, C. Y., Tortoli, E., Wallace, R. J. & Brown-Elliott, B. A. (2018). A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(11), 3666–3677. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003026>
- Varges, R., Marassi, C. D., Oelemann, W. & Lilenbaum, W. (2009). Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Research in Veterinary Science*, *86*(3), 371–372. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.08.006>
- Vazquez, P., Garrido, J. M., Molina, E., Geijo, M. V., Gomez, N., Perez, V., Sevilla, I. A., Alonso-Hearn, M., Cortes, A. & Juste, R. A. (2014). Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered friesian cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *12*(4), 1049–1060. <https://doi.org/10.5424/sjar/2014124-5978>
- Verdugo, C., Pleydell, E., Price-Carter, M., Prattley, D., Collins, D., de Lisle, G., Vogue, H., Wilson, P. & Heuer, C. (2014). Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolated from sheep, cattle and deer on New Zealand pastoral farms. *Preventive Veterinary Medicine*, *117*(3–4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2014.09.009>
- Verdugo, C., Valdes, M. F. & Salgado, M. (2020). Herd level risk factors for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection and clinical incidence in dairy herds in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, *176*(November 2019), 104888. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104888>
- Waddell, L. A., Rajić, A., Stärk, K. D. C. & Mcewen, S. A. (2016). The potential Public Health Impact of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses and Public Health*, *63*(3), 212–222. <https://doi.org/10.1111/ZPH.12221>
- Weber, M. F., Groenendaal, H., Van Roermund, H. J. W. & Nielen, M. (2004). Simulation of alternatives for the Dutch Johne's disease certification-and-monitoring program. *Preventive Veterinary Medicine*, *62*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2003.11.006>
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W. & Van Tiem, J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): Sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*, *77*(3–4), 387–398. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00324-2)
- Whitlock, Robert H. (2010). Paratuberculosis control measures in the USA. *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*, 319–329. <https://doi.org/10.1079/9781845936136.0319>
- Whittington, R., Donat, K., Weber, M. F., Kelton, D., Nielsen, S. S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J. L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M. A. S., ... De Waard, J. H. (2019). Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>
- Whittington, R. J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C. A., Marshall, D. J. & Links, I. J. (2000). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in flocks of sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(7), 2550–2556. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2550-2556.2000>

- Whittington, Richard J., Marsh, I. B., Saunders, V., Grant, I. R., Juste, R., Sevilla, I. A., Manning, E. J. B. & Whitlock, R. H. (2011). Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis Isolates from Different Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1822. <https://doi.org/10.1128/JCM.00210-11>
- Whittington, Richard J., Whittington, A. M., Waldron, A., Begg, D. J., De Silva, K., Purdie, A. C. & Plain, K. M. (2013). Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 3993–4000. <https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13>
- Wilton, S. & Cousins, D. (1992). Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *Genome Research*, 1(4), 269–273. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.269>
- Windsor, P. A. & Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johnes's disease. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 184(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2009.01.007>
- Wiszniewska-Łaszczych, A., Liedtke, K. G., Szteyn, J. M. & Lachowicz, T. (2020). The Effect of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis Infection on the Productivity of Cows in Two Dairy Herds with a Low Seroprevalence of Paratuberculosis. *Animals (Basel)*, 10(3), 490. <https://doi.org/10.3390/ani10030490>
- WOAH. (2022). World Organisation for Animal Health. Volume II, Chapter 8.13 Paratuberculosis. In *Terrestrial animal health code*.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). (2019). Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic tests for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th Ed.OIE, Paris*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06
- Wolf, R., Barkema, H. W., De Buck, J. & Orsel, K. (2016). Dairy farms testing positive for *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis have poorer hygiene practices and are less cautious when purchasing cattle than test-negative herds. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4526–4536. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-10478>
- Woolhouse, M. (2011). How to make predictions about future infectious disease risks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1573), 2045–2054. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0387>
- Yoo, H. S. & Shin, S. J. (2012). Recent research on bovine paratuberculosis in South Korea. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1–2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2012.06.005>

