

Efecto de la infección de *Mycobacterium avium paratuberculosis* en la producción de anticuerpos bovinos

Effect of the infection with *Mycobacterium avium paratuberculosis* on the production of bovine antibodies

Fernández, B. ¹; Jolly, A. ¹; Colavecchia, S. ¹; Fernández, E. ²; Mundo S.L. ¹

¹ Cátedra de Inmunología, ² Cátedra de Clínica de Rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires.

RESUMEN

La paratuberculosis es una enfermedad granulomatosa crónica intestinal, causada por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, que afecta a los rumiantes. El objetivo del trabajo fue caracterizar la respuesta inmune humoral sistémica y local de bovinos infectados. Se estudiaron once bovinos, seis infectados (asintomáticos, sintomáticos y terminales) y cinco controles. Se determinaron los niveles de inmunoglobulinas totales y se cuantificaron los subisotipos de IgG específicos a paratuberculosis en suero y materia fecal por ELISA. Los niveles de inmunoglobulinas totales en sueros fueron similares. Sin embargo, se evidenciaron aumentos significativos de IgM e IgG totales, e IgG-específica en materia fecal de los sintomáticos. La IgG1 específica fue predominante en sueros de bovinos sintomáticos y terminales. La IgG3 fue la inmunoglobulina específica de mayor cantidad detectada tanto en suero como en materia fecal de los asintomáticos. Nuestros resultados muestran que la infección no afecta la producción de inmunoglobulinas totales. El aumento de inmunoglobulinas en materia fecal podría relacionarse con la lesión de la mucosa intestinal. El predominio de IgG1 se corresponde con el cambio de perfil a Th2 en el periodo sintomático. El hallazgo de incrementos de IgG3 específica en asintomáticos sugiere el estudio de este isotipo para poder mejorar su identificación.

Palabras clave: (paratuberculosis), (bovino), (anticuerpos).

Correspondencia *e-mail*: Silvia Mundo smundo@fvet.uba.ar

Recibido: 26-05-2011

Aceptado: 20-07-2011

* Premio "Estímulo a la Investigación Científica 2010" en la categoría graduados de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

SUMMARY

Paratuberculosis, caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, is a chronic granulomatous enteric disease affecting ruminants. Our aim was to characterize systemic and local humoral responses of infected cows. Eleven cows were studied: six naturally infected (asymptomatic, symptomatic and terminal) and five control. Total IgM and IgG and paratuberculosis-specific IgG subisotypes, from feces and serum, were assessed by ELISA. No differences were detected on the levels of total immunoglobulins in sera. Symptomatic cows showed significative higher level of totals IgM and IgG, and specific-IgG in feces. IgG1 was the highest from sera of symptomatic and terminal. IgG3 was the highest specific immunoglobulin in sera and feces of asymptomatic. Our results showed total immunoglobulins levels in serum are not modified by the infection. The increment of immunoglobulins in feces could be caused by the lesions of intestinal mucosa. The predominance of IgG1 in symptomatic period is related to the change toward Th2 profile. The use of anti-IgG3 could improve the identification of asymptomatic cows.

Key words: (paratuberculosis), (bovine), (antibodies).

INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis es una patología crónica intestinal que afecta a los rumiantes y es causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*)¹⁰. La enfermedad causa notables pérdidas económicas en la producción agropecuaria^{19; 20}.

La infección se produce por ingestión de calostro, leche o materia fecal de animales eliminadores de bacterias.

Los animales infectados atraviesan un largo estadio subclínico durante el cual eliminan pequeñas cantidades de *Map* por leche y heces en forma intermitente. Su identificación es dificultosa, se utilizan principalmente kits que evalúan la producción de interferón gamma por linfocitos en cultivo²². En algunos bovinos, por causas todavía inciertas, la forma subclínica avanza hacia el período clínico, que se caracteriza por la aparición de diarrea profusa, mala absorción de nutrientes y pérdidas de proteínas. En ese momento hay un cambio de perfil de la respuesta inmune de Th1 (celular) a Th2 (humoral)^{1;6;7}, lo que conlleva a un aumento de inmunoglobulinas (Ig) circulantes facilitando el diagnóstico serológico de la enfermedad.

En la especie bovina, al perfil Th1 se lo relaciona con las IgM e IgG2, mientras que al Th2 se lo asocia con IgG1 e IgA⁸. Sin

embargo, el papel funcional de los isotipos de anticuerpos (Ac) aún no ha sido totalmente dilucidado. Se describe al isotipo IgG1 como crítico para bloquear bacterias y toxinas en el sitio de infección, y al IgG2 se lo relaciona principalmente con el incremento de la fagocitosis mediada por neutrófilos frente a las infecciones bacterianas agudas.

El papel de los Ac en la protección frente a micobacterias ha sido reevaluado, demostrando que los Ac juegan un rol importante en la respuesta inmune frente a micobacterias^{2;11;24}. Nuestro grupo ha demostrado un incremento en la asociación del *Map* con la célula blanco de la infección (el macrófago bovino) luego de la opsonización con IgG1 específica frente a la bacteria entera o a la proteína p34 recombinante. Además, se detectó un incremento en la activación celular y la formación del granuloma¹⁷.

En este contexto, se plantean como objetivos del presente trabajo la evaluación de la respuesta inmune humoral local y sistémica de bovinos en distintos estadios de paratuberculosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestras

Se estudiaron 11 bovinos adultos: 6 provenientes de rodeos infectados con paratuberculosis y 5 bovinos controles (C)

provenientes de campos libres de paratuberculosis y tuberculosis de la provincia de Buenos Aires. De cada bovino se obtuvo 10 ml de sangre sin anticoagulante y materia fecal (MF). El suero se fraccionó y congeló a -20°C hasta el momento de utilización. Las MFs fueron fraccionadas para realizar el cultivo y los ELISAs (se homogenizó 10 gr de MF y 10 ml de PBS Tween 20 al 0,05%, se centrifugaron varias veces a fin de obtener las muestras lo más límpida posible¹⁵. Luego fueron fraccionadas y congeladas a -20°C hasta el momento de uso).

Los bovinos fueron clasificados según: rodeo de origen; presencia de signos clásicos de la enfermedad; niveles de proteínas séricas (evaluados por refractometría); detección de anticuerpos específicos en sueros frente al Antígeno Protoplasmático de *Map* (PPA); aislamiento e identificación de *Map* a partir de materia fecal.

Detección de anticuerpos específicos en sueros frente al PPA por ELISA

Se utilizaron placas de 96 hoyos sensibilizadas con $2\mu\text{g/hoyo}$ PPA (Allied Monitor Inc., Missouri, USA). Para evitar reacciones cruzadas con otras micobacterias, se pre-adsorbieron los sueros con *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) inactivada por calor (crecida en nuestro laboratorio). El sistema de revelado empleado fue un anticuerpo anti-IgG bovina en conejo conjugado a peroxidasa (Cappel, Fountain, USA) (anti-IgG-HRP). Para interpretar los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se calculó el valor de corte (VC) sumando al promedio de los sueros controles negativos, dos desvíos estándares. A partir de los resultados se clasificó cada suero como: negativo (menor al VC), sospechoso (con densidades ópticas entre el VC y 1,5 el VC) y positivo (mayor a 1,5 el VC).

Aislamiento e identificación de Map a partir de materia fecal

Se cultivó la MF de los bovinos problema en medio Herrold con huevo, piruvato y micobactina (Allied Monitor Inc., Missouri, USA), a fin de confirmar el diagnóstico^{12;16}.

Se observaron todos los cultivos una vez por semana durante 18 semanas. En aquellos casos que crecieron colonias de bacterias con las características esperadas, se identificó el IS900 por PCR⁹. Para ello se utilizaron las secuencias de primers diseñadas por Mundo¹⁸ y Collins⁵. *Map* ATCC 19698 y *M. phlei* ATCC 11758 fueron utilizadas como cepas controles.

Producción de IgG3 bovina recombinante

Para obtener la IgG3 bovina recombinante (IgG3r) se cultivaron²¹ las *E. coli* BL21 pLysS transformadas con un plásmido obtenido en nuestro laboratorio¹⁷. Se realizó la purificación parcial de las proteínas a través de una columna de Níquel (His*Bind® Resin, Novagen, Darmstadt, Germany). Posteriormente se realizó la diálisis de las proteínas purificadas. Las bacterias *E. coli* BL21 (BL21-pRSET A) transformadas con el plásmido pRSET A sin inserto fueron procesadas y denominadas como extracto de *E. coli* (EEc).

Caracterización de los anti-isotipos de IgG.

Para el estudio de IgG1 e IgG2 se utilizaron reactivos comerciales: anti-IgG1 bovina en ovino conjugado a peroxidasa (Bethyl inc., Montgomery, USA), anti-IgG2 bovina monoclonal en ratón (Sigma-Aldrich Co., USA.), anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania, USA). Mientras que para evaluar la IgG3 se utilizó el suero de conejo anti-IgG3r obtenido previamente en nuestro laboratorio¹⁷, y el anti-IgG de conejo en cabra conjugado a peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratorios, inc. Maryland, USA).

El suero de conejo anti-IgG3r fue pre-adsorbido con BL21-pRSET A en medio líquido (a una densidad óptica_{660nm} de 2) y EEc en medio sólido (en placas de 96 hoyos) con el fin de disminuir la cantidad de Ac anti-*E. coli*.

La determinación de las reacciones cruzadas se realizó por Inmunoblot y ELISA, utilizando los patrones comerciales IgG1 e IgG2 (Bethyl

inc., Montgomery, USA), IgG3r, suero de un bovino normal y EEC.

Isotipos de inmunoglobulinas por ELISA

Niveles de Igs totales. Se sensibilizaron hoyos con 50 µl de los sueros diluidos 1/6000 (IgM) y 1/20000 (IgG), y de las MFs sin diluir (IgM) y 1/100 (IgG). Se utilizaron los siguientes Ac conjugados a peroxidasa: anti-IgM bovina en ovino (Bethyl inc., Montgomery, USA) y anti-IgG-HRP.

Niveles de Igs específicas a *Map*. Los hoyos fueron sensibilizados con una cepa de referencia de origen bovino totalmente caracterizada y secuenciada denominada K10¹⁴ (gentilmente cedida por el Dr. Raul Barletta). Esta cepa se cultivó en medio 7H9 líquido y fue inactivada por calor en nuestro laboratorio. Se utilizaron 50 µl de K10 a una DO_{660nm} de 0,4.

Análisis Estadístico

Para analizar los resultados se utilizó el software estadístico Stastistix 8.0 (Analitical Software, Tallahassee, USA). Para la comparación de los niveles (DO) o cantidad de isotipos (µg/ml) entre grupos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA). Los niveles de significación fueron fijados en un 5%. Se determinó la homogeneidad de varianza y se realizó el Test de Dunet como análisis post-ANOVA.

RESULTADOS

Clasificación de los grupos de animales infectados

El origen, sinología y los resultados de niveles de proteínas séricas, de reactividad frente a PPA en suero y el aislamiento e identificación de *Map* en materia fecal se muestran en la Tabla 1. Estos resultados permitieron clasificar a este grupo en infectados asintomáticos (IA), infectados sintomáticos (IS) e infectados terminales (IT).

Producción de IgG3r y caracterización de los anti-isotipos de IgG bovinos

La purificación permitió obtener la IgG3r acompañada de una pequeña cantidad de proteínas contaminantes provenientes de la *E. coli* (Figura 1A). La pre-adsorción del suero de conejo anti-IgG3r disminuyó notablemente la cantidad de Ac anti-*E. coli* (Figura 1B). La evaluación del reconocimiento de *E. coli* por el anti-IgG3r mediante ELISA demostró que, al pre-adsorber el suero, la DO obtenida pasó de 1.01 (suero sin pre-adsorber) a 0.16 (suero pre-absorbido).

La lectura de los Inmunoblots reveló la existencia de reacciones cruzadas entre IgG3r con IgG1 e IgG2, ya que el anti-IgG3r pre-adsorbido reconoce a las tres subclases de IgG bovina (Figura 1B). Por otro lado, los anti-isotipos comerciales (anti-IgG1 y anti-IgG2) sólo reconocieron el patrón correspondiente (IgG1 e IgG2 respectivamente, resultados no mostrados).

Por la técnica de ELISA se observó que el reactivo comercial anti-IgG2 reconoce la IgG3r y el antisuero anti-IgG3r pre-adsorbido reconoce IgG2 (patrón comercial). Sin embargo, estas reacciones cruzadas son siempre con menor intensidad que al reactivo correspondiente (Figura 1C).

*Isotipos de inmunoglobulinas totales y específicas a *Map* en sueros y MFs*

Niveles de IgM. Los resultados se muestran en Figura 2. Se detectó un leve aumento de IgMs totales y específicas a *Map* en los sueros de los infectados, especialmente en los IS en relación al C, aunque el análisis estadístico no permitió identificar estas diferencias como significativas. En MF los niveles fueron bajos en relación a los del suero. Sin embargo, el comportamiento fue similar al del suero. Se evidenció un incremento en los niveles de IgMs totales en IS e IT, siendo sólo significativa la diferencia entre los C y el IS.

Niveles de IgG. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se determinaron niveles similares de IgG totales en sueros de los distintos grupos.

Tabla 1. Clasificación de los grupos de bovinos. Grupo C (control), IA (infectado asintomático), IS (infectado sintomático), e IT (infectado terminal).

Grupo	proteínas séricas (g/dl)	Campo de origen	Signos	ELISA PPA	Cultivo de MF	PCR
C (n=5)	6,6±0,5	-	-	-	-	-
IA (n=2)	8,2±0,3	+	-	Sospechoso	-	-
IS (n=2)	7,3±1,1	+	+	+	+	+
IT (n=2)	4,7±0,3	+	+	+	+	+

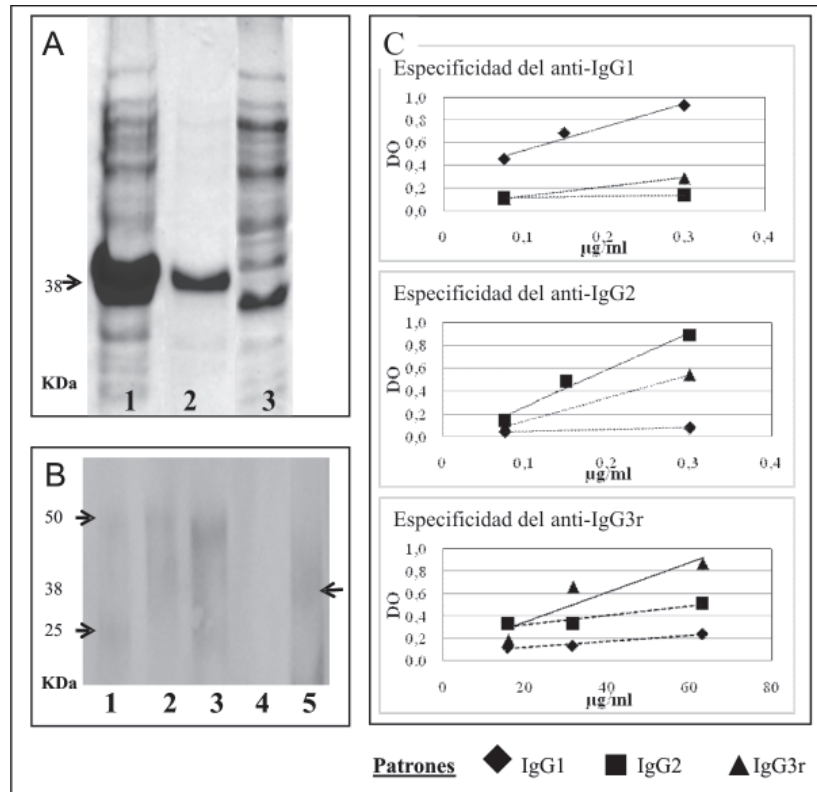


Figura 1. Producción de IgG3r y caracterización de los anti-isotipos de IgG bovinos.

A. Producción de IgG3r. SDS-PAGE al 12%. Calle 1 IgG3r expresada por Clon 36; Calle 2 IgG3r purificada; Calle 3 E. coli BL21 transformadas con el plásmido pRSET A sin inserto (EEc). B. Caracterización del anti-IgG3r. Inmunoblot. Antígenos: Calle 1 IgG2; Calle 2 IgG1; Calle 3 suero bovino; Calle 4 EEc; Calle 5 IgG3r. Se utilizó el anti-IgG3r como anticuerpo primario. C. Reacciones cruzadas de los anti-isotipos de IgG. ELISA.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en los niveles de IgG *Map*-específica en los sueros de los bovinos IS e IT. Llamativamente, la cantidad de IgG específica a *Map* en sueros de IA fue menor que en los C. En MFs se evidenciaron comportamientos similares entre IgG totales y específicas. Así mismo se detectaron altos niveles en IS e IT (IgG total y específica), siendo significativa la diferencia entre el IS y el C.

Isotipos de IgG específicas a *Map*: Los resultados se muestran en Tabla 2.

Niveles de IgG1: Se observaron incrementos significativos en los niveles de IgG1 de sueros de IS e IT. Mientras que sólo se detectó IgG1 específica en MF del grupo sintomático ($14,8 \pm 3 \mu\text{g/ml}$).

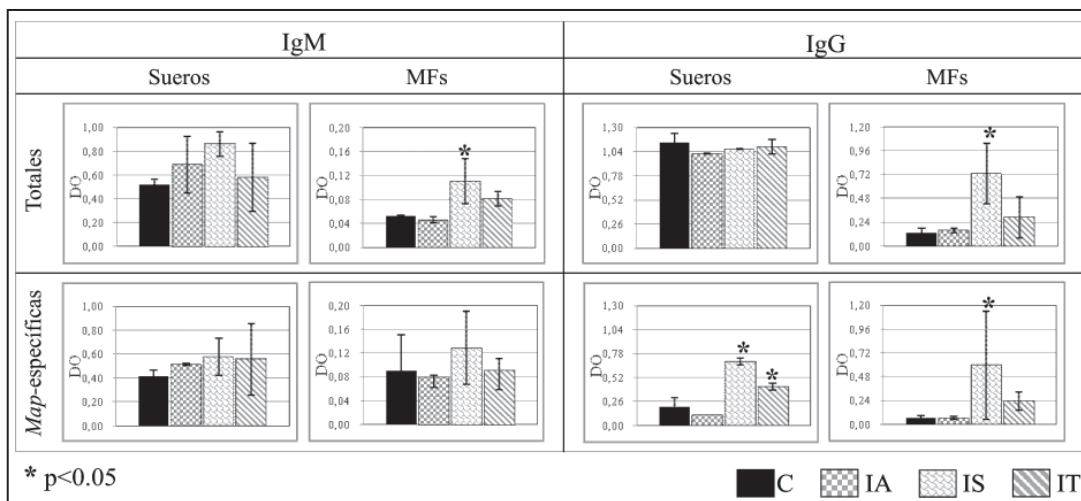


Figura 2. Niveles de IgM e IgG totales y *Map*-específicas en sueros y materias fecales evaluados por ELISA.

Tabla 2. Análisis de isotipos de IgG en sueros y materias fecales, expresados en µg/ml.

Grupos	IgG1		IgG2		IgG3		IgG1/IgG2
	Suero	MF	Suero	MF	Suero	MF	
C	<0.08	<0.08	3.4±0.7	<0.08	<0.08	9.2±0.8	<0.02
IA	2.07±0.1	<0.08	10.2±2.8*	<0.08	18.5±8.8*	10.3±0.8	0.2
IS	679.2±1*	14.8±3*	14.1±0.7*	0.09±0.0	17.5±6.7*	18.9±13	48
IT	1160.3±3*	<0.08	10.4±3.7*	<0.08	19.5±14*	<0.08	112

*p<0.05

Niveles de IgG2. Se identificó un aumento significativo en los sueros de todos los animales infectados (IA, IS e IT). En MF sólo pudo ser detectado en el grupo sintomático y en baja concentración (0.09±0.0 µg/ml). Mientras que en el resto de los bovinos los niveles fueron menores a 0.08 µg por ml correspondiente al límite de detección de la técnica.

Niveles de IgG3. Se determinó un incremento significativo en los sueros de los bovinos infectados mostrando además cantidades similares entre ellos. En MF, los infectados IA e IS mostraron niveles similares a los detectados en suero.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que la infección con *Map* afecta los niveles de

proteínas séricas sin modificar la producción de anticuerpos totales en suero, en contraposición al estudio realizado en pequeños rumiantes³. Por otro lado, se pudo observar un incremento de los niveles de IgM e IgG totales en materia fecal coincidiendo con el periodo clínico sintomático (IS). La IgM es el isotipo indicador de respuesta activa, sólo esperable en infecciones agudas o re-agudizaciones de infecciones crónicas. Este aumento de IgM en MF podría ser posible por la lesión intestinal y la re-estimulación de nuevos clones de linfocitos B como respuesta a la re-infección endógena característica de éste periodo.

La IgM es una inmunoglobulina pentamérica que posee alta avidéz pero poca afinidad. Por lo tanto, los altos niveles de IgM obtenidos en los bovinos controles podrían deberse a reacciones cruzadas con otras micobacterias²⁵.

Estos resultados coinciden con trabajos nuestros previos sobre bovinos infectados¹⁸.

El aumento de IgG específica a *Map* en sueros de bovinos sintomáticos y terminales está acompañado de incrementos de todas las sub-clases de IgG, principalmente de IgG1. Esta última parecería ser la Ig predominante en suero en estas etapas de la enfermedad tal como se han descripto previamente^{13;17}.

Los animales asintomáticos presentaron niveles basales de IgGs *Map*-específicas en sueros. Esto podría deberse al tipo de respuesta inmune que predomina en esta etapa (celular).

Los altos niveles de IgG1 específicos encontrados en materias fecales de bovinos sintomáticos coinciden el predominio de este isotipo en la mucosa intestinal en bovinos normales⁴.

La respuesta de tipo Th2 no es tan clara dado que la IgG2 específica en suero aumentó en todos los bovinos infectados y los niveles son similares. Sin embargo, al analizar la relación IgG1/IgG2 se observa un incremento de dicha relación, coincidente con el avance de la patología (asintomáticos, sintomáticos, terminales). Estos resultados concuerdan con los expresados por Estes y Brown (2002) y Vanden Bush (2003).

Son pocos los trabajos que estudiaron la IgG3 en bovinos infectados con *Map*¹⁷. Y a nuestro entender, este es el primer trabajo que describe a la IgG3 bovina en mucosas. Se encontró un aumento de este isotipo en sueros de todos los bovinos infectados. Los niveles fueron levemente superiores a los hallados para IgG2 y parecería tener una cinética similar a la de IgG2. La detección de IgG3 *Map*-específica en MF del grupo control podría deberse a reacciones cruzadas con micobacterias intestinales no patógenas.

La IgG2 e IgG3 poseen cadenas pesadas similares; razón por la cual Butler⁴ las clasificó como IgG2a e IgG2b. La IgG3r producida para este trabajo, incluye regiones compartidas, lo que justifica las reacciones cruzadas encontradas. Sin embargo, se han encontrado diferencias entre los niveles de IgG2 e IgG3 en sueros

y MFs estudiados, mostrando el poder de discriminación del reactivo (anti-IgG3r).

Es de destacar el predominio de la IgG3 específica en los animales asintomáticos. Dado que el diagnóstico serológico utilizado de rutina falla en la identificación de este grupo, se sugiere la utilización de un reactivo específico anti-IgG3 para mejorar su detección. En este sentido, nuestro próximo objetivo será desarrollar un ELISA diagnóstico utilizando PPA como antígeno y antisuero frente a IgG3 bovina recombinante.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó que la infección con *Map* no modifica los niveles de Igs totales séricas. Se corroboró el predominio de IgG1 en sueros de bovinos sintomáticos y terminales.

Se identificó IgG1 específica en materia fecal de los sintomáticos.

Se detectó IgG3 en sueros y materias fecales de animales asintomáticos y sintomáticos.

Se demostró que los reactivos desarrollados en nuestro laboratorio permitieron ampliar el conocimiento de la respuesta inmune humoral específica a paratuberculosis.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los veterinarios L. Gilardoni y L. Goldman por su apoyo técnico, y al doctor F. Paolicchi por sus aportes teóricos en el presente trabajo. Esta investigación fue financiada por los subsidios UBA-SeCyT v038 y v023.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas B., Riemann H.P. IgG, IgM and IgA in the serum of cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1988; 11:171-175.
2. Abebe F. y Bjune G. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. And Experimental Immunology*. 2009; 157: 235-243.
3. Begara-McGorum I.; Wildblood L.A.; Clarke C.J. Early immunopathological events in experimental ovine

- paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998; 63: 265-287.
4. Butler J.E.; Kehrli M.E. Immunocytes and immunoglobulins in milk. In *Mucosal Immunology* 3rd edition Ogra PL; Mesteckyme J; Lamm ME; Strober W; McGhee JR; Bienenstock J. Academic Press, New York. 2004.
5. Collins D.M., Stephens D.M., de Lisle G.W. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol.* 1993; 36(3-4):289-99.
6. Coussens P.M., Verman N., Coussens M.A., Elftman M.D., McNulty A.M. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect Immun.* 2004; 72(3):1409-22.
7. Coussens P.M. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun.* 2004; 72(6):3089-96.
8. Estes D.M., Brown W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. and Immunop.* 2002; 90: 1-10.
9. Green E., Tizard M., Moss M., *et al.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:9063-9073.
10. Harris N.B., Barletta R.G. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14 (3):489-512.
11. Jolly A., Colavecchia S.B., Fernández B., *et al.* Antibodies induced by lipoarabinomannan in bovines: characterization and effects on the interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and macrophages *in vitro*. *Vet. Med. Int.* 2011: 1-8.
12. Jorgensen JB. 1982. An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. *Acta Vet Scand.* 23(3):325-35.
13. Koets A.P., Rutten V.P., de Boer M., Bakker D., Valentin-Weigand P., van Eden W. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2001; 69, 3:1492-1498.
14. Li L. Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(35):12344-9.
15. Marcoppido, G.A. Anticuerpos pasivos lactogénicos: modulación de la respuesta inmune y capacidad protectora frente a la diarrea por Rotavirus en un modelo ternero. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 2007.
16. Merkal R.S., Richards W.D. Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. *Appl Microbiol.* 1972; 24(2):205-7.
17. Mundo, S.L., Fontanals A.M., García M., *et al.* Bovine IgG1 antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* protein p34-cx improve association of bacteria and macrophages. *Vet Res.* 2008; 39(1):6.
18. Mundo S.L. *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. 2005.
19. Paolicchi F. Paratuberculosis: aspectos clínico-patológicos y su impacto en la producción (Parte 1). *XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 2004, p. 127, Paysandú, Uruguay.
20. Passucci JA y col. Análisis económico del saneamiento de paratuberculosis en un rodeo de cría bovina. *Revista Argentina de Producción Animal.* 2007; 27(supl. 1): 337-8.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, USA. 1989.
22. Stabel J.R. Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 2000; 61:754-760.

23. Vanden Bush, Rosenbusch R.F. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003; 94: 23–33.
24. Williams A., Reljic R., Naylor I., *et al.* Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology*. 2004; 111:328–333.
25. Yokomizo Y., Merkal R.S., Lyle P.A., Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44:2205–2207.

