

# Control de la paratuberculosis bovina: identificación y validación de biomarcadores de detección precoz de la enfermedad

Las enfermedades son responsables del 20% de las pérdidas de la producción animal y constituyen una de las barreras al comercio de animales vivos y alimentos de origen animal. En este contexto, cabe destacar la importancia estratégica de la sanidad animal, ya que garantiza la salud y el bienestar animal, la salud pública, la seguridad alimentaria, la producción sostenible de alimentos, la conservación del medio ambiente y la sostenibilidad y competitividad de la producción ganadera y la economía rural. (Rodríguez García y col., 2014).

**Rosa Casais<sup>1\*</sup>, Cristina Blanco Vázquez<sup>1</sup>, Natalia Iglesias<sup>1</sup>, Ana Balseiro<sup>1,2</sup>, Fernando Vicente<sup>3</sup>, Javier Amado<sup>4</sup>, María Canive<sup>5</sup>, Ramón A. Juste<sup>3,5</sup>, Marta Alonso-Hearn<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Biotecnología Animal. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (Serida), Deva, Asturias, Spain. \*rosacg@serida.org

<sup>2</sup>Departamento de Salud Animal. Facultad de Veterinaria, Instituto Ganadería de Montaña (CSIC-ULE). Universidad de León. León, España.

<sup>3</sup>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (Serida), Villaviciosa, Asturias, Spain.

<sup>4</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Laboratorio de Sanidad Animal del Principado de Asturias (LSAPA). Gijón, Asturias, Spain.

<sup>5</sup>Departamento de Salud Animal. Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker). Derio, Bizkaia, Spain.

**M***ycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) es la bacteria que causa la paratuberculosis (PTB) o enfermedad de Johne, y que afecta a rumiantes domésticos y silvestres. La PTB es una enteritis (inflamación del intestino delgado) crónica muy contagiosa. Esta enfermedad, endémica a nivel mundial, origina importantes pérdidas económicas en la industria láctea debido a que causa la reducción de la producción de leche, el adelgazamiento progresivo de los animales, el sacrificio prematuro de los casos clínicos, la venta selectiva prematura y el aumento de los costes veterinarios. Además, MAP tiene un claro

potencial zoonótico (se puede transmitir a las personas), ya que esta micobacteria ha sido postulada como un posible factor desencadenante de varias enfermedades autoinmunes en humanos como la enfermedad de Crohn, la diabetes tipo I, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (Feller *et al.*, 2007; Mameli *et al.*, 2016; Niegowska *et al.*, 2016; Bo *et al.*, 2018).

La PTB está presente en la mayoría de las explotaciones ganaderas, un estudio realizado en muestras de leche de tanque mediante un test que detecta anticuerpos específicos frente a MAP, estimó que el 18% de las explotaciones lecheras en España estaban infectadas (Sevilla *et al.*,

2002). En Asturias, en 2019, el 32,6% de las explotaciones de ganado vacuno y el 1,9% de las vacas analizadas, mediante un método de diagnóstico para la detección de anticuerpos específicos frente a MAP, estaban infectados (datos aportados por la Consejería de Medio Rural y Cohesión Territorial del Principado de Asturias).

La PTB presenta un periodo de incubación muy largo, una vez infectados los animales pueden no manifestar signos clínicos durante un largo periodo de tiempo (dos a diez años), pero mientras tanto pueden estar eliminando MAP en las heces, calostro y leche y transmitiendo la enfermedad a otros animales en la ganadería (Bastida y Juste, 2011). Varios estudios afirman que los terneros son más susceptibles a la infección volviéndose más resistentes con la edad (Larsen *et al.*, 1962; Winsor & Wittington, 2010). La base de estas diferencias de susceptibilidad dependientes de la edad no ha sido bien documentada, sin embargo, su correcta comprensión es fundamental para el desarrollo de programas de control efectivos (Mortier *et al.*, 2013).

La PTB bovina se manifiesta bajo un amplio espectro de formas de infección que van desde formas latentes generalmente asintomáticas y caracterizadas por la presencia de lesiones leves de tipo focal en el tejido intestinal, a formas más avanzadas de la enfermedad, en las que las lesiones son más severas (lesiones multifocales y difusas) (Vázquez *et al.*, 2014), y los animales presentan los signos clínicos típicos de la PTB. Estos signos consisten en trastornos diarreicos (intermitentes al principio y progresivamente más severos) y pérdida progresiva de peso (**figura 1**).



Como hemos mencionado la PTB es una infección subclínica (no se detectan síntomas) en la mayoría de los animales infectados, con un periodo de incubación muy largo, que hace que se detecten muchos menos casos de los que en realidad están presentes en las ganaderías, enmascarando el impacto de la enfermedad sobre la productividad y el bienestar de los animales, y dificultando enormemente su control. A pesar del posible efecto de la enfermedad sobre la salud pública y las enormes pérdidas económicas que ocasiona en las explotaciones no se han establecido estrategias de control de la PTB bovina exitosas.

El control se ha visto obstaculizado por la falta de tratamientos y herramientas de diagnóstico eficaces (Barkema *et al.*, 2017). Además, la vacunación frente a la PTB bovina ha sido prohibida por parte de las autoridades sanitarias competentes (Directiva 78/52/CEE) debido a su interferencia con los Programas de Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Estas circunstancias hacen necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de control de la PTB.

Actualmente, el control de la PTB a nivel de rebaño se basa fundamentalmente en el saneamiento, así como en la utilización de técnicas de manejo y medidas higiénico-sanitarias adecuadas para prevenir nuevas infecciones y evitar la transmisión de MAP a animales susceptibles (Garry, 2011). El saneamiento consiste en la identificación de los animales infectados, especialmente animales que no manifiestan signos clínicos pero que están infectados y eliminan MAP al medio ambiente (pastos y bebederos), y su retirada del grupo para suprimir las fuentes de infección, disminuir la contaminación ambiental y maximizar la vida productiva del resto de los animales.

La eficacia de estos programas de control está fuertemente condicionada por la baja sensibilidad de los métodos de diagnóstico utilizados para identificar infecciones latentes (infecciones asintomáticas y caracterizadas por la pre-



**Figura 1.** Vaca con PTB mostrando delgadez extrema.

sencia de lesiones leves de tipo focal). Esto es debido a que los animales con infecciones latentes son asintomáticos, y tienen niveles bajos de bacterias y de anticuerpos difíciles de detectar (Bastida y Juste, 2011). Aunque existen también otros factores que han impedido el éxito de los programas de control de la PTB (Barkema *et al.*, 2017), está claro que la detección de infecciones latentes sigue siendo un desafío y se necesitan nuevas herramientas de diagnóstico para poder controlar la propagación de la enfermedad.

### PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Frente a las metodologías de diagnóstico clásicas (**tabla 1**) emergen nuevos

métodos de diagnóstico basados en la detección y cuantificación de biomarcadores asociados a las distintas formas en las que se manifiesta una enfermedad. Un biomarcador o marcador biológico es una molécula del hospedador que puede medirse objetivamente y por la cual se puede identificar un proceso fisiológico o patológico (ej. marcadores del cáncer), es decir, la presencia de ese biomarcador por encima de una cantidad determinada indicaría que el animal tiene PTB. Estos biomarcadores pueden utilizarse para el desarrollo de herramientas de diagnóstico específicas (biomarcadores de diagnóstico), para monitorizar el curso y predecir el desenlace de la enfermedad (biomarcadores de pronóstico), para predecir la

**Tabla 1. Técnicas de diagnóstico utilizadas actualmente para detectar la PTB**

Técnica	Detección MAP	Diana	Muestra
<b>Métodos de diagnóstico ante-mortem</b>			
Aislamiento	Directa	Bacteria MAP	Heces
PCR a tiempo real	Directa	Genoma MAP	Heces
ELISA IDEXX	Indirecta	Anticuerpos MAP	Suero/leche
Interferón $\gamma$	Indirecta	Interferón $\gamma$	Sangre
<b>Métodos de diagnóstico post-mortem</b>			
Aislamiento	Directa	MAP	Tejidos
PCR a tiempo real	Indirecta	Genoma MAP	Tejidos
Histología (HE)	Indirecta	Lesiones microscópicas	Tejidos
ZN	Directa	Bacterias ácido-resistentes	Tejidos

**Tabla 2. Valoración del estado infeccioso (PTB) de las 155 vacas de raza frisona incluidas en el estudio**

Método diagnóstico	Focal (n=55)	Multifocal (n=18)	Difuso (n=15)	Sin Lesiones (n=6)	Ganadería libre de PTB (n=61)
ZN	49,1%	94,4%	100%	0,0%	ND
IDEXX ELISA	5,5%	27,8%	73,3%	0,0%	0,0%
PCR FECAL	9,1%	33,3%	73,3%	0,0%	0,0%
AISLAMIENTO FECAL	5,5%	16,7%	26,7%	0,0%	0,0%
PCR TEJIDO	28,3%	44,4%	73,3%	0,0%	ND
AISLAMIENTO TEJIDO	28,3%	44,4%	66,7%	0,0%	ND
SIGNOS CLÍNICOS	0,0%	21,4%	64,3%	0,0%	0,0%

ND, no determinado (animales vivos, no hay disponibilidad de tejidos para realizar esas pruebas diagnósticas); el cálculo del porcentaje de animales que muestran signos clínicos se basa únicamente en aquellos animales en los que se conocía su estado clínico (focal n=28, multifocal n=14, difuso n=14, sin lesiones n=4 y ganadería libre de PTB n=61).

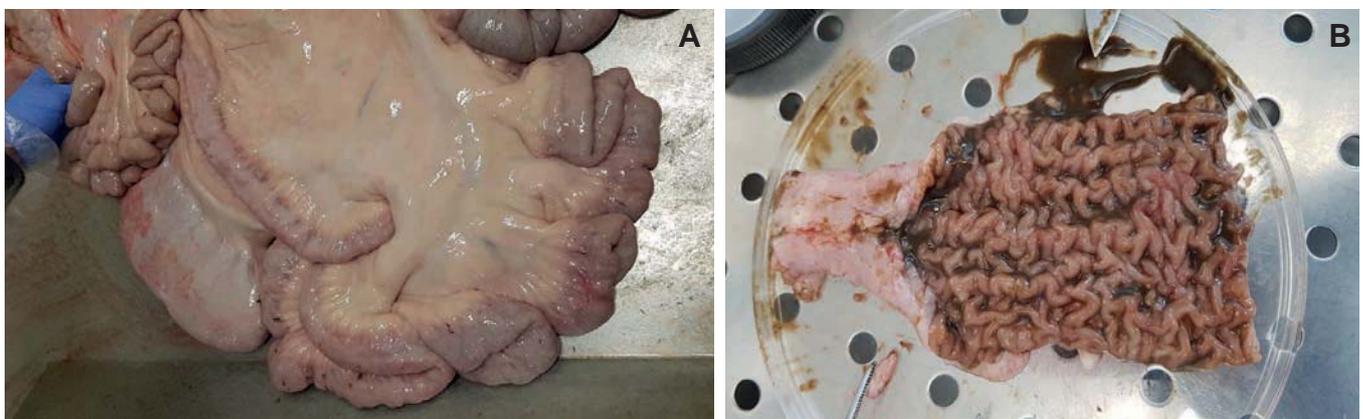
El aislamiento se refiere al cultivo del agente causal de la enfermedad (la micobacteria MAP); la PCR a tiempo real, detecta dos dianas en el genoma de MAP, una de ellas específica de esta bacteria; Histología (HE): tinción hematoxilina-eosina del tejido intestinal e identificación de las lesiones microscópicas típicas de la PTB; ZN, tinción de Ziehl-Neelsen para la visualización de los bacilos ácido-alcohol resistentes de MAP.

respuesta a tratamientos terapéuticos e intervenciones basadas en vacunas (biomarcador predictivo) y para el desarrollo de terapias (biomarcador terapéutico) (Seth *et al.*, 2009; Carlomagno *et al.*, 2017).

En estudios previos de nuestro equipo de investigación (proyecto RTA2014-

00009-C02-00) se identificaron y seleccionaron cinco biomarcadores bovinos con niveles de expresión elevados en sangre de animales con lesiones focales y difusas en comparación con animales control no infectados sin lesiones (Alonso-Hearn *et al.*, 2019). El potencial

diagnóstico de esos cinco biomarcadores para detectar ganado vacuno de la raza frisona infectado de forma natural fue evaluado utilizando muestras de suero (n=155) procedentes de nuestras ganaderías colaboradoras. Las muestras se recogieron a partir de 94 animales



**Figura 2.** Lesiones macroscópicas en una vaca frisona con lesiones difusas. La pared intestinal aparece muy engrosada, lo que le otorga al intestino un aspecto externo de tubo de goma (A). La mucosa y la submucosa intestinal presentan gruesos pliegues que asemejan las circunvoluciones cerebrales con una ligera congestión en los ápices de los mismos (B).

sacrificados procedentes de ganaderías con alta prevalencia de PTB y 61 animales obtenidos en una ganadería libre de PTB.

Para empezar teníamos que valorar cual era el estado infeccioso de cada animal utilizado en el estudio y para ello se hicieron cultivos bacteriológicos de heces y tejido intestinal, se valoró el estado inmunológico de esas vacas mediante el ELISA de IDEXX (una técnica utilizada para detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a MAP), se hicieron análisis moleculares mediante PCR de heces y tejidos para detectar el ADN de la bacteria, y por último, se realizaron análisis histopatológicos (tabla 2).

El examen patológico de las secciones del tejido intestinal permitió la observación de lesiones macroscópicas (figura 2) y la clasificación de los animales en cuatro grupos según el tipo y la extensión de las

lesiones microscópicas observadas, así y en orden creciente de gravedad serían los siguientes (González *et al.*, 2005; revisado en Balseiro *et al.*, 2019): sin lesiones histológicas detectables, grupo focal, multifocal, y difuso, (figura 3).

La mayoría de las vacas presentaban lesiones focales (58,51%) que podríamos encontrar en animales con infecciones latentes o con formas de resistencia que no progresan hacia formas más severas de la infección. En este grupo, ningún animal presentó signos clínicos asociados con la enfermedad. En el grupo de animales con lesiones multifocales (19,14%), el 100% de los animales fueron positivos al menos por una de las técnicas de diagnóstico empleadas y el 21,43% de los animales presentaron signos clínicos.

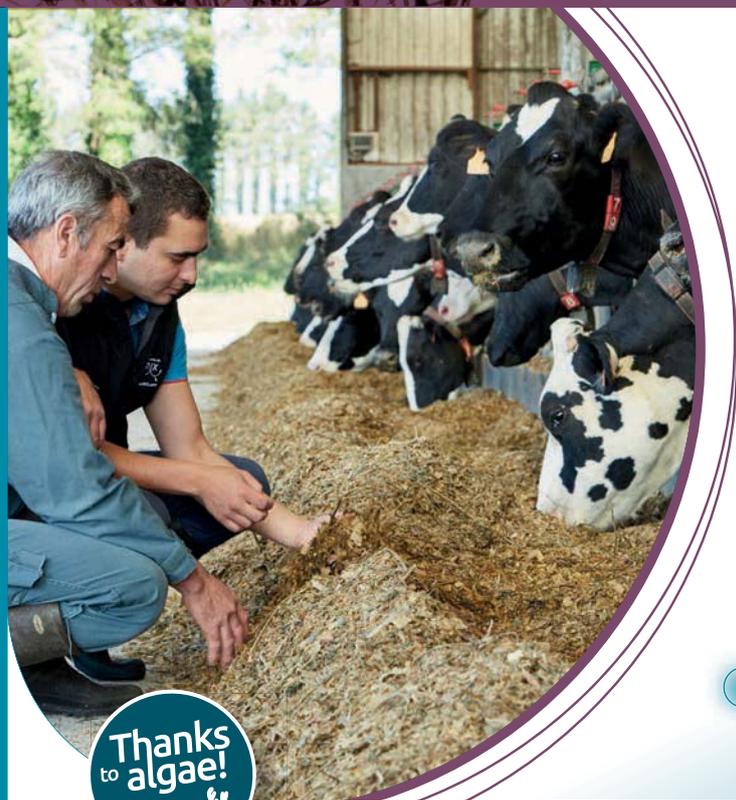
Por último, en el grupo con lesiones difusas (15,95%) la bacteria se detectó

en el 100% de los animales por tinción ZN. En este grupo, se observó la mayor proporción de animales con signos clínicos asociados a la PTB (64,28%). Sólo seis animales (6,38%) de los 94 analizados mediante histopatología no mostraron lesiones detectables. Dada la dificultad que tuvimos para encontrar animales sin lesiones para realizar nuestro estudio se estableció un grupo control no-infectado formado por estos seis animales sin lesiones y los 61 animales de la ganadería libre de PTB.

### POTENCIAL DE LOS BIOMARCADORES SELECCIONADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA PTB

Una vez valorado el estado infeccioso de los animales se investigó la concentración de los cinco biomarcadores bovinos

## RIESGO DE MICOTOXINAS



# mmi.s<sup>®</sup>

## Capitaliza

la experiencia de Olmix

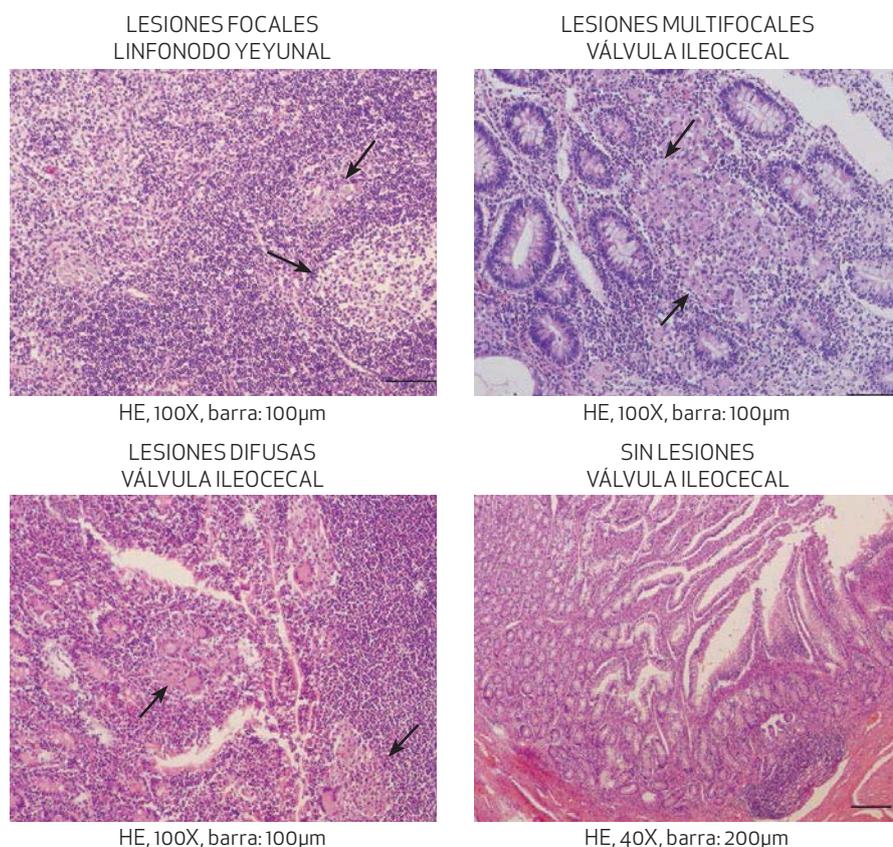
- Diagnóstico
- Soluciones a medida
- Tecnología exclusiva de Olmix



Fabricado en Francia

[www.olmix.com](http://www.olmix.com)





**Figura 3.** Clasificación histopatológica de los animales. Los animales incluidos en este estudio se clasificaron, de acuerdo con la presencia-ausencia, localización y extensión de las lesiones presentes en los tejidos intestinales en grupo focal, multifocal, difuso y sin lesiones. Las flechas indican la localización de granulomas de PTB. Los granulomas son áreas de inflamación formadas por el acúmulo de células inmunes como macrófagos y ocasionalmente células gigantes. Se forma cuando el sistema inmune intenta aislar sustancias/bacterias extrañas que ha sido incapaz de eliminar.

Tabla 3			
ELISA	SE (%)	ES (%)	VD (%)
LESION FOCAL (N=55) VS. CONTROL (N=67)			
BIO. ABCA13	79,2	88,1	83,7
ELISA IDEXX	14,5	100	57,3
LESION MULTIFOCAL (N=18) VS. CONTROL (N=67)			
BIO. SPARC	66,7	95,5	79,6
ELISA IDEXX	27,8	100	63,9
LESION DIFUSA (N=15) VS. CONTROL (N=67)			
BIO. MMP8	100	71,6	85,8
ELISA IDEXX	86,7	97	91,8
CUALQUIER LESION (N=88) VS. CONTROL (N=67)			
BIO. ABCA13	69,4	86,6	78
ELISA IDEXX	28,4	100	64,2

SE, sensibilidad; ES, especificidad; VD, valor diagnóstico (media aritmética de la sensibilidad y la especificidad); N, indica el número de animales por grupo. BIO, biomarcador.

(MMP8, ABCA13, FAM84A, SPARC y DES) en las muestras de suero de los 155 animales mediante técnicas ELISA diseñadas específicamente para la detección y cuantificación de esos biomarcadores.

Los resultados obtenidos (**tabla 3**) indicaban que para detectar animales con lesiones focales el método más eficiente era el basado en la detección del biomarcador ABCA13, mientras para la detección de animales con lesiones multifocales el más eficiente era el basado en la detección del biomarcador SPARC, y para la detección de animales con lesiones difusas el MMP8. Para la detección global de animales con cualquier tipo de lesión el ELISA basado en la detección del biomarcador ABCA13 superó el valor diagnóstico de todos los biomarcadores e incluso el del ELISA comercial de IDEXX. El ELISA ABCA13 es más sensible (detecta el 70,60% de los animales con lesiones) y más específico (detecta como negativos el 100% de los animales control sin lesiones) que el ELISA comercial de IDEXX (sensibilidad 28,40% y especificidad 100%).

El valor diagnóstico del biomarcador ABCA13 se mantuvo para todas las categorías histopatológicas de animales infectados, mejorando ampliamente las prestaciones de cualquier prueba de diagnóstico actualmente disponible. Por ello, su uso en los programas de control de la PTB permitiría una detección rápida y sensible de infecciones latentes y patentes, impidiendo la transmisión de MAP a otros animales de la explotación.

## CONCLUSIÓN

Los ELISAs actuales, basados en la detección de anticuerpos específicos frente a MAP, son eficaces en la identificación de animales con infecciones patentes, sin

**Tabla 3.** Valor diagnóstico de los ELISAs basados en la detección de los biomarcadores seleccionados para el diagnóstico de ganado con diferentes tipos de lesiones histopatológicas en tejido intestinal. Comparación con los resultados obtenidos con el ELISA de IDEXX para la detección específica de anticuerpos anti-MAP.



embargo, las infecciones latentes pasan en su mayoría desapercibidas obstaculizando el control de la PTB y su erradicación. La alternativa que hemos presentado en este artículo, los ELISAs basados en la detección de biomarcadores bovinos, y más concretamente el basado en la detección del biomarcador ABCA13, parecen tener el potencial de convertirse en una nueva herramienta de diagnóstico que mejore enormemente la sensibilidad en la detección de animales con formas latentes de infección.

No obstante, la limitada casuística a la que se ha aplicado hasta la fecha requiere que se realice una validación a gran escala de este ELISA para confirmar su utilidad en la práctica. Una vez realizada, estos ELISAs podrían utilizarse: 1) en campañas de erradicación para identificar vacas eliminadoras antes de que empiecen a contaminar el medio y transmitir el patógeno, 2) para prevenir la compra de ganado infectado y evitar la difusión de MAP entre ganaderías y 3) para reducir la transmisión potencial de esta micobacteria a otras especies domésticas y animales silvestres susceptibles a la infección.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA RTA-2014-00009-C02), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MICINN RTI2018-094192-R-C22), Fondos Europeos para el Desarrollo Regional (FEDER) y fondos regionales PCTI 2018-2020 (GRUPIN: IDI2018-000237). Agradecemos al INIA la financiación de los contratos pre-doctorales de formación de Cristina Blanco Vázquez y María Canive.

Nos gustaría agradecer la asistencia técnica de la Unidad de Asesoramiento Estadístico de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, la asistencia en los muestreos de nuestras ganaderías colaboradoras y los Servicios Veterinarios Astega y la colaboración de los operarios de campo del Serida en la toma de muestras, y el cuidado y mantenimiento de los animales. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALONSO-HEARN, M., CANIVE, M., BLANCO-VÁZQUEZ, C., TORREMOCHA, R., BALSEIRO, A., AMADO, J., VARELA-MARTÍNEZ, E., RAMOS, R., JUGO, B.M. & CASAS, R. (2019). RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Scientific Reports* 9, 14845.
- BALSEIRO, A., PEREZ, V., JUSTE R.A. (2019). Chronic regional intestinal inflammatory disease: A transspecific slow Infection? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 62, 88-100.
- BARKEMA, H.W., ORSEL, K., NIELSEN, S.S., KOWTS, A.P., RUTTEN, V.P.M.G., BANNANTINE, J.P., KEEFE, G.P., KELTON, D.F., WELL, S.J., WHITTINGTON, R.J., MACKINTOSH, C.G., MANNING, E.J., WEBER, M.F., HEURER, C., FORDE, T.L., RITTER, C., ROCHE, S., CORBETT, C.S., WOLD, R., GRIEBEL, P.J. & DE BUCK, J. (2017). Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 125-148.
- BASTIDA, F. & JUSTE, R.A. (2011). *Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination*. *Journal of Immune-Based Therapies and Vaccines* 9, 8.
- BO M, ERRE GL, NIEGOWSKA M, PIRAS M, TARAS L, LONGU MG, PASSIU G, SECHI LA. Interferon regulatory factor 5 is a potential target of autoimmune response triggered by Epstein-Barr virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rheumatoid arthritis: investigating a mechanism of molecular mimicry. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(3): 376-381.
- CARLOMAGNO, N., INCOLLING, P., TAMMRO, V., PELUSO, G., RUPEALTA, N., CHIACCHIO, G., SANDOVAL SOTELO, M.L., MINIERI, G., PISANI, A., RICCIO, E., SABBATINI, M., BRACALE, U.M., CALOGERO, A., DODARO, C.A. & SANTANGELO, M. (2017). Diagnostic, Predictive, Prognostic, and Therapeutic Molecular Biomarkers in Third Millennium: A Breakthrough in Gastric Cancer. *Biomed Research International* 2017, 7869802.
- FELLER M, HUWILER K, STEPHAN R, ALTPETER E, SHANG A, FURRER H, PFYFFER GE, JEMMIT, BAUMGARTNER A, EGGER M. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9): 607-613. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70211-6.
- GARRY, F. (2011). Control of paratuberculosis in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27, 599-607.
- GONZÁLEZ, J., GEJO, 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, 184-196.
- LARSEN, A.B., MERKAL, R.S. & SULIP, R.C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research* 36, 255-257.
- MAMELI G, COCCO E, FRAU J, MARROSU MG, SECHI LA. (2016). Epstein-Barr virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides are recognized in sera and cerebrospinal fluid of MS patients. *Sci Rep*; 6: 22401. doi: 10.1038/srep22401.
- 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, 94.
- NIEGOWSKA M, RAPINI N, PICCINI S, MAMELI G, CAGGIU E, MANCA BITTI ML, SECHI LA. Type 1 diabetes at-risk children highly recognize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* epitopes homologous to human Znt8 and proinsulin. *Sci Rep*. 2016;6: 22266. doi: 10.1038/srep22266.
- RODRÍGUEZ GARCÍA, M.J., RANZ CASARES, A., BARREIRO MORÁN, B., DEBECQUE PEÑA, J., SANZ FERNÁNDEZ, A., RUEDA PÉREZ, P. (2014). La biotecnología en Sanidad Animal. *Arbor* 190(768), A154.
- SETH, M., LAMONT, E.A., JANAGAMA, H.K., WIDDEL, A., VULCHANOVA, L., STABEL, J.R., WATERS, W.R., PALMER, M., V.SREEVATSAN, S. (2009). Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS One* 4, e5478.
- SEVILLA, I., ADURIZ, G., GARRIDO, J.M., GEJO, M.V., JUSTE R.A. A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, 11-15th June.
- VAZQUEZ, P., GARRIDO, J.M., MOLINA, E., GEJO, 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.
- WINDSOR, P.A. & WHITTINGTON, R.J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal* 184, 37-44.