

Marcadores inmunológicos y genéticos asociados a infecciones causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en ganado bovino

eman ta zabal zazu

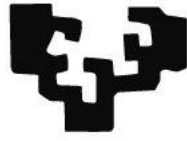


Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

María Canive Ruiz

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

**Marcadores inmunológicos y genéticos
asociados a infecciones causadas por
Mycobacterium avium subsp.
paratuberculosis en ganado bovino**

Autor: María Canive Ruiz

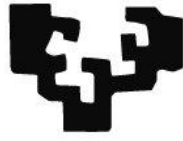
Directora: Dra. Marta Alonso Fernández-Pacheco

**Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea
(UPV/EHU)**

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Leioa, 2022

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

Marcadores inmunológicos y genéticos asociados a infecciones causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en ganado bovino

Memoria para optar al grado de Doctor en Inmunología, Microbiología y
Parasitología

por la Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea
(UPV/EHU)

Presentada por: **María Canive Ruiz**

Dirigida por: **Dra. Marta Alonso Fernández-Pacheco**

NEIKER-Basque Research and Technology Alliance

NEIKER

MEMBER OF
BASQUE RESEARCH
& TECHNOLOGY ALLIANCE

La presente Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Sanidad Animal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER), Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Su desarrollo ha sido posible gracias a una beca FPI-INIA para la formación de personal investigador (FPI2016-00041) de la convocatoria CPD2016-0016.

El desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación: "MARKPARA: Marcadores inmunológicos y genéticos asociados a infecciones latentes o patentes causadas por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*" (RTA 2014-00009-CO2-01) financiado por el INIA- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, y "PARACON: Soluciones innovadoras e integradas para el control de la paratuberculosis bovina basadas en genómica, transcriptómica y digital PCR (ddPCR)" (RTI2018-094192-R-C21) financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo una estancia nacional en el Departamento de Mejora Genética Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha contado con la colaboración del Departamento de Matemática Aplicada de NEIKER, del Departamento de Sanidad Animal del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), del departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal (UPV/EHU), de la Confederación de Asociaciones de Frisón Española (CONAFE) y de la red académica i2basque.



La presente Tesis Doctoral ha sido redactada en la modalidad de compendio de publicaciones. A continuación, se presentan las referencias bibliográficas de los cinco artículos, publicados o en proceso de publicación, que mantienen una misma unidad temática y se integran en esta Tesis Doctoral:

- **PUBLICACIÓN I:** Alonso-Hearn M, **Canive M**, Blanco-Vázquez C, Torremocha R, Balseiro A, Amado J, Varela-Martínez E, Ramos R, Jugo BM, Casais R. (2019). RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17.
- **PUBLICACIÓN II:** **Canive M**, Fernández-Jiménez N, Casais R, Vázquez P, Lavín JL, Bilbao JR, Blanco-Vázquez C, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M (2021a). Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the MECOM, eEF1A2, and U1 spliceosomal RNA expression. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14.
- **PUBLICACIÓN III:** **Canive M**, González-Recio O, Fernández A, Vázquez P, Badia-Bringué G, Lavín JL, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. (2021b). Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. *PLoS ONE*, 16, 1–17.
- **PUBLICACIÓN IV:** **Canive M**, Badia-Bringué G, Vázquez P, González-Recio O, Fernández A, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. (2021c). Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using whole-genome sequence data. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13.
- **PUBLICACIÓN V:** **Canive M**, Badia-Bringué G, Vázquez P, Garrido JM, Juste RA, Fernández A, González-Recio O, Alonso-Hearn M. A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair, innate immunity, and pathogen persistence. *Frontiers in Immunology*. Aceptado.

A mi abuelo Maldo y a Katy,
siempre ♥

AGRADECIMIENTOS

Ya dice el refrán que: “Es de bien nacidos ser agradecidos” y, en el largo camino de una tesis, hay mucho que agradecer a muchas personas sin las cuales este trabajo no habría sido posible. Es imposible resumir en unos párrafos cuatro años, pero me gustaría agradecer a compañeros, familia y amigos el haberme apoyado y comprendido.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, Marta Alonso-Hearn, la oportunidad de llevar a cabo esta Tesis Doctoral y el hecho de haber confiado en un potencial que ni yo misma sabía que tenía, no se me olvida ninguna de las palabras de ánimo ni el reconocimiento del trabajo realizado. A Gerard, gracias por haber hecho que el último año haya sido mucho más llevadero, por las clases de catalán para principiantes y por corregir con tanta paciencia mis errores de programación (install.packages= “Gracias_Gerard”). También me gustaría agradecer su ayuda y apoyo a todo el grupo de micobacterias de Neiker: Joseba, Ramón, Natalia e Iker, así como a Patricia cuyo trabajo ha sido fundamental para poder llevar a cabo esta Tesis. Gracias en general a todo el Departamento de Sanidad Animal de Neiker por hacerme sentir como en casa a lo largo de estos años y, en particular, a Mertxe sin la cual aún seguiría buscando muestras en la sala de -20°C, perdida entre plantillas y micronics. También agradecerle a José Luis su ayuda con la bioinformática y su paciencia con esos análisis que tanto se resistían a veces. A Mariví, Bea, Zuri, Bego, Jesse, Elena, Ainara, Jon Paul...a todo el edificio azul, GRACIAS!

También me gustaría agradecer a Rafa su inestimable ayuda durante los muestreos, al Dr. Óscar González Recio y a todo su equipo de INIA la hospitalidad con la que me recibieron y su paciencia y dedicación durante mi estancia con ellos, y al equipo de Sanidad Animal del SERIDA por su colaboración y apoyo a lo largo de este tiempo, especialmente a la Dra. Rosa Casais y a Cristina. Gracias también a la Dra. Nora Jiménez, al Dr. Jose Ramón Bilbao, a la Dra. Bego Jugo y al Dr. Endika Varela de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) por su ayuda y apoyo en diferentes etapas del camino.

A tod@s l@s becari@s, a los que han estado y a los que están, mil millones de gracias: Olalla, Miriam, Lucía, Maitane, Iraia, Medelín, Raquel, Fátima, Ion... sin olvidar tampoco a Sofía y Aitor, “postdocs” que nos enseñan que es posible sobrevivir al doctorado y seguir sonriendo. Si hay alguien que entiende el esfuerzo y es capaz de compartir cada alegría y cada pena, es@s sois vosotr@s. Gracias por la pequeña gran familia que hemos formado. Esta tesis es tan vuestra como mía.

Agradecer también a mi familia por el apoyo incondicional pese a no entender muy bien a qué me dedico ni qué hago con mi vida. Muy especialmente a mi hermano, la única persona que

cuando ha sido el momento de echarle ganas a las cosas, siempre ha dicho: “¡Adelante!”. Gracias, por ser siempre mi red de seguridad y por supuesto, gracias por enseñarme la tabla del 8 (básica para la vida). Gracias ama por tanto... no hay páginas suficientes para agradecerte tantas y tantas cosas a lo largo de los años, de tesis y de vida. Y a ti aita, gracias, porque si no me hubieras llevado la contraria tantas veces y con tantas ganas no habría llegado hasta aquí. Está claro que todo ying necesita su yang.

Tengo la suerte de tener muy buenos amigos, a todos ellos: GRACIAS. A Iva, kiitos paljon! Por creer en mí, por alegrarte por mis avances más que yo misma y por estar incluso sin estar, rakastan sinua. Mila esker Ana, por acompañarme a lo largo de los años, por ser amiga y mentora a la vez, y especialmente por tu clarividencia que siempre me ha dado tanta tranquilidad cuando yo me desesperaba. A mis *Rs sin fronteras*, gracias de corazón por cuidarme tanto y tan bien y no dejarme caer en ningún momento. Pilar, Aitor y Nerea, os conocí en un punto de inflexión de mi vida en el que no sabía que os necesitaba pero no sé qué habría hecho sin vosotros. Iria, mi gallega favorita, la más empática de todos nosotros según múltiples test estadísticamente significativos y la voz de la sensatez que tanta falta me hace en algunos momentos, moitas grazas! Sandra, gracias por tu creatividad y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Tampoco quiero olvidarme de “desagradecer” a mis maños favoritos: Teresa y Álvaro, por los fardeles, por los almendros, por tantos kilómetros de risas... Siempre nos quedará Almadrén. Y por último, aunque no menos importante, gracias Fer. Muchas gracias por haberte hecho querer tan rápido, independientemente de los kilómetros que tenga que hacer para recuperar las cosas que olvidas. A mis *Tapaculos 4.0*, mil gracias por estar siempre cerca en la distancia. Y a Cris, moltes gràcies por indicarme dónde está el norte y por recordarme una y otra vez sin descanso lo que yo ya sabía pero me empeñaba en olvidar,.

A todas y cada una de las personas que trabajan en el Hospital de Santa Marina. Este hospital ha sido mi casa durante muchos años y no puedo ni quiero olvidarme de agradecer que, cada vez que he vuelto me han recibido con los brazos abiertos y un cariño que no creo merecer. Agradecer muy especialmente a la segunda planta por tantos y tan buenos momentos; Itzi, Natalia, Bego, Marian, Pilar, Olga, Íñigo, Xabi, Fer y Patri G, Carmen, Ainhoa, Irune... absolutamente a tod@s GRACIAS! Crecer con vosotr@s ha sido de las mejores experiencias de mi vida.

Finalmente, gracias a todos los mamíferos no humanos de mi vida por haber sido el motivo que me ha traído hasta aquí. Como dijo Anatole France: “Hasta que no hayas amado a un animal, parte de tu alma estará dormida”. Gracias por despertar mi alma.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AG	Arabinogalactan / Arabinogalactano
AGID	Agarose gel immunodiffusion / Inmunodifusión en gel de agarosa
APC	Antigen presenting cell / Célula presentadora de antígenos
ATP	Adenosine triphosphate / Adenosina trifosfato
AUC	Area under the curve / Área bajo la curva
AFB	Acid fast bacilli / Báculo ácido alcohol resistente
Bad	BCL-2-associated death promoter / Promotor de muerte celular asociado a BCL-2
BCG	Bacillus Calmette-Guérin / Bacilo de Calmette-Guérin
BCL-2	Nuclear gene encoding mitochondrial protein 2 / Gen codificante de la proteína mitocondrial 2
BP	Biological process / Proceso biológico
bp	Base pair / Par de bases
C3	Complement 3 / Complemento 3
CC	Cellular component / Componente celular
CD	Cluster of differentiation / Grupo de diferenciación
cDNA	Complementary DNA / DNA complementario
CF	Complement fixation / Fijación del complemento
CFU	Colony forming unit / Unidad formadora de colonias
CI	Confidence interval / Intervalo de confianza
CONAFE	Confederación Nacional de Frisona Española
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin / Molécula de adhesión intracelular 3 no asociada a integrina específica de células dendríticas
ddPCR	Droplet digital PCR / PCR digital
DNA	Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico
EBV	Estimated breeding values / Valores estimados de selección
EGF	Epidermal growth factor / Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme-linked immunoassay / Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assays / Ensayos de cambio en la movilidad electroforética
eQTL	Expression Quantitative trait locus / Locus de expresión de carácter cuantitativo
FAP	Fibronectin attachment protein / Proteínas de unión de fibronectina
FDR	False discovery rate / Tasa de falsos positivos
GBLUP	Genomic Best linear unbiased prediction / Modelo genómico de predicción lineal no sesgado
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GO	Gene ontology / Ontología génica
GWAS	Genome wide association study / Estudio de asociación de genoma completo
h²	Heritability / Heredabilidad

HBSS	Hank's balanced salt solution / Solución salina de Hank
HD	High density / Alta densidad
HDL	High density lipoprotein / Lipoproteína de alta densidad
HE	Hematoxylin eosin / Hematoxilina eosina
IBD	Inflammatory bowel disease / Enfermedad inflamatoria intestinal
ICAM1	Intracellular adhesion molecule 1 / Molécula de adhesión intracelular 1
ICO	Índice combinado
ICU	Índice compuesto de la ubre
ICV	Ileocecal valve / Válvula ileocecal
IFN-γ	Gamma interferon / Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulin / Inmunoglobulina
IL	Interleukin / Interleuquina
IPP	Índice de pies y patas
ISP	Índice de salud podal
Kb	Kilobases
KRT	Keratin / Queratina
LAM	Lipoarabinomannan / Lipoarabinomanano
LD	Low density / Baja densidad
MA	Micolic acids Ácidos micólicos
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex / Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
ManLAM	Mannosylated lipoarabinomannan / Lipoarabinomanano manosilado
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MAPK38	Mitogen activated protein kinase 38 / Proteína kinasa activada por mitógeno P38
Mb	Megabase
MD	Medium density / Media densidad
MDM	Monocyte derived macrophage / Macrófago derivado de monocito
MF	Molecular function / Función molecular
MGIT	Mycobacteria Growth indicator tubes / Tubos indicadores de crecimiento de micobacterias
MHC	Major histocompatibility complex / Complejo mayor de histocompatibilidad
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex / Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-$\kappa\beta$	Nuclear factor kappa beta / Factor nuclear kappa beta
NGS	Next generation sequencing / Secuenciación de nueva generación
NK	Natural killer / Asesina natural
NTM	Non tuberculous Mycobacteria / Micobacterias no tuberculosas
OADC	Oleic-acid-albumin-dextrose-catalase / Oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
OD	Optical density / Densidad óptica
OIE	World organization for animal health / Organización mundial de sanidad animal
OR	Odds ratio / Tasa de probabilidad
PB	Peripheral blood / Sangre periférica
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell / Célula mononuclear de sangre periférica
PCR	Polymerase chain reaction / Reacción en cadena de la polimerasa

PG	Peptidoglicano / Peptidoglicano
PLI	Profit lifetime index / Índice de vida útil
PPDa	Aviar purified protein derivative / Derivado proteico purificado aviar
PRM	Protamine / Protamina
PRR	Pathogen Recognition receptors / Patrones de reconocimiento de patógenos
PTB	Paratuberculosis
qPCR	Quantitative PCR / PCR cuantitativa
QTL	Quantitative trait locus / Locus de caracter cuantitativo
RNA	Ribonucleic acid / Ácido ribonucleico
RNA-Seq	RNA-Sequencing / Secuenciación de ARN
RNI	Reactive nitrogen intermediates / Reactivos intermediarios de nitrógeno
ROI	Reactive oxygen intermediates / Reactivos intermediarios de oxígeno
ROS	Reactive oxygen species / Especies reactivas de oxígeno
rSNP	Regulatory SNP / SNP regulador
RT-qPCR	Real time quantitative PCR / PCR cuantitativa a tiempo real
SNP	Single-nucleotide polymorphism / Polimorfismo de nucleótido único
TACO	Tryptophan aspartate containing coat protein / Proteína de envuelta que contiene triptófano aspartato
TBS	Tris buffered saline / Solución salina tamponada
TFBS	Binding sites for transcription factors / Sitio de unión de factores de transcripción
TGF-β	Transforming growth factor beta / factor de crecimiento transformante beta
TLR	Toll like receptors / Receptores tipo toll
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha / Factor de necrosis tumoral alpha
TSS	Transcription start site / Sitio de inicio de transcripción
TTD	Time to detection / Tiempo de detección
VEP	Variant effect predictor / Predictor del efecto de la variante
VLDL	Very low density lipoprotein / lipoproteínas de muy baja densidad
WGS	Whole genome sequence / Secuencia de genoma completo
ZN	Ziehl Nielsen
λ	Inflation factor / Factor de inflación
μm	Micrómetro

Genes

ABCA13	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 13	Miembro 13 de la subfamilia A de casetes de unión a ATP
ACSM1	Acyl-CoA synthetase medium chain family member 1	Miembro 1 de la familia de la acil-CoA sintetasa de cadena media
ADA	Adenosine Deaminase	Adenosina desaminasa
ADGRF1	Adhesion G protein-coupled receptor F1	Receptor acoplado a la proteína G de adhesión F1
ADGRF5	Adhesion G protein-coupled receptor F5	Receptor acoplado a la proteína G de adhesión F5
ADIPOQ	Adiponectin C1Q	Adiponectina C1Q
ANGPTL4	Angiopoietin Like 4	Angiopoyetina tipo 4
ANGPTL8	Angiopoietin Like 8	Angiopoyetina tipo 8
ANO6	Anoctamin 6	Anoctamina 6
APO4	Apolipoprotein A4	Apolipoproteína A4
APOB	Apolipoprotein B	Apolipoproteína B
APOC3	Apolipoprotein C3	Apolipoproteína C3
APOLD1	Apolipoprotein L domain containing 1	Dominio 1 de apolipoproteína L
AQP8	Aquaporin 8	Acuaporina 8
ARAP2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	ArfGAP con dominio RhoGAP repetición de anquirina y dominio PH 2
BATF2	Basic leucine zipper ATF transcription factor 2	Factor de transcripción ATF de cremallera básica de leucina 2
BOLA-DQβ	Bovine Major histocompatibility complex II	Complejo mayor de histocompatibilidad bovina II
CASP7	Caspase 7	Caspasa 7
CATH3	Cathelicidins 3	Catelicidina 3
CATH4	Cathelicidins 4	Catelicidina 4
CCK	Cholecystokinin	Colecistoquinina
CCL14	C-C motif chemokine ligand 14	Ligando de quimioquina C-C 14
CCND3	Cyclin D3	Cyclina D3
CCR6	C-C Motif Chemokine Receptor 6	Motivo C-C del receptor de quimioquinas 6
CD177	CD177 molecule	Molécula CD177
CD209	CD209 molecule	Molécula CD209
CD36	CD36 Molecule	Molécula CD36
CD5L	CD5 antigen-like precursor	Precursor del antígeno CD5
CHUK	Nuclear Factor NF-Kappa-B Inhibitor Kinase Alpha	Factor nuclear NF-Kappa-B inhibidor de la quinasa alfa
CKM	Creatine kinase M-type	Creatina quinasa tipo M
CLEC16A	C-Type Lectin Domain Containing 16A	Dominio de lectina tipo C que contiene 16A
CLEC7A	C-Type Lectin Domain Containing 7A	Dominio de lectina de tipo C que contiene 7A
CLIC5	Chloride Intracellular Channel 5	Canal intracelular de cloro 5
CNPY3	Canopy FGF signaling regulator 3	Regulador de la señalización del FGF de la cubierta 3
COL1A2	Collagen Type I Alpha 2 Chain	Cadena alfa 2 del colágeno tipo I
CPE43	Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Oncogene Partner	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 Socio oncogénico
CPS1	Carbamoyl-phosphate synthase 1	Carbamil-fosfato sintasa 1
CREB5	CAMP Responsive Element Binding Protein 5	Proteína 5 de unión a elementos sensibles a CAMP
CRISP3	Cystine rich secretory protein 3	Proteína secretora rica en cistina 3
CXCL10/IL10	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	Ligando de quimioquina C-X-C 10
CXCL8/IL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8	Ligando de quimioquina C-X-C 8
CXCR3	C-X-C Motif Chemokine Receptor 3	Receptor de quimioquinas C-X-C 3
DAB2	DAB2 interacting protein	Proteína de interacción DAB2
DEFB110	Defensin β110	Defensina β110
DEFB114	Defensin β114	Defensina β114

DEFβ4A	Defensin Beta 4A	Defensina Beta 4A
DES	Desmin	Desmina
DUSP10	Dual Specificity Phosphatase 10	Fosfatasa de doble especificidad 10
EDN2	Endothelin 2	Endotelina 2
ENPP2	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2
ENPP4	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 4	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4
ENPP5	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 5	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 5
ERCC4	Excision Repair 4	Reparador por escisión 4
EREG	Epiregulin	Epiregulina
FABP6	Fatty Acid Binding Protein 6	Proteína de unión a ácidos grasos 6
FOXP4	Forkhead Box P4	Caja Forkhead P4
FXR	Farnesoid X receptor	Receptor F farnesoide
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GOT1	Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1	Transaminasa glutámico-oxalacética 1
HBEGF	Heparin Binding EGF Like Growth Factor	Factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina
HOXB13	Homeobox B13	Homeobox B13
HSPA6	Heat Shock Protein Family A Member 6	Proteína de choque térmico de la familia A, miembro 6
ICAM3	Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules 3	Moléculas de adhesión intracelular específicas de las células dendríticas 3
IFI27	Interferon α-inducible protein 27	Proteína 27 inducible por interferón α
IFNGR2	Interferon Gamma Receptor 2	Receptor 2 del interferón gamma
IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	Proteína de unión al ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2
IGSF23	Immunoglobulin superfamily member 23	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas 23
IKBKB	Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta	Inhibidor de la subunidad beta de la quinasa del factor nuclear Kappa B
IL10RA	Interleukin 10 Receptor Subunit Alpha	Subunidad alfa del receptor de interleucina 10
IL12RB1	Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 1	Subunidad beta 1 del receptor de interleucina 12
IL12RB2	Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 2	Subunidad beta 2 del receptor de interleucina 12
IL23R	Interleukin 23 Receptor	Receptor de interleuquina 23
IRF1	Interferon Regulatory Factor 1	Factor regulador del interferón 1
ITLN2	Intelectin 2	Intelectina 2
KIAA1324L	KIAA1324 like	
KRT	Keratin	Queratina
LDLR	Low density lipoprotein receptor	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LHX6	LIM/homeoboxprotein	LIM/homeoboxproteína
LYZ1	Lysozyme C milk isozyme 1	Lisozima C, isoenzima láctea 1
LYZB	Lysozyme C intestinal isozyme	Isozima intestinal de lisozima C
MDM	Monocyte to macrophage differentiation gene	Gen de diferenciación de monocitos a macrófagos
MECOM	MDS1 And EVI1 Complex Locus	Locus del complejo MDS1 y EVI1
MED20	Mediator Complex Subunit 20	Subunidad 20 del complejo mediador
MMP13	Matrix Metalloproteinase 13	Metalopeptidasa de la matriz 13
MMP8	Matrix Metalloproteinase 8	Metalopeptidasa de la matriz 8
MYL2	Myosin light chain 2	Cadena ligera de miosina 2
NCEH1	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	Esterhidrolasa neutra del colesterol 1
NFKBIE	NFKB Inhibitor Epsilon	Inhibidor NFKB Epsilon
NKX2-3	NK2 Homeobox 3 transcription factor	Factor de transcripción NK2 Homeobox 3
NOD2	Nucleotide oligomerization domain 2	Dominio de oligomerización de nucleótidos 2
NPAS	Neuronal PAS domain protein 2	Proteína neuronal de dominio PAS 2

NR4A1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1	Subfamilia de receptores nucleares 4 Grupo A Miembro 1
OBSC	Obscurin	Obscurina
OGN	Osteoglycin	Osteoglicina
ORL1	Oxidized low density lipoprotein receptor	Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PGLYRP1	Peptidoglycan Recognition Protein 1	Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 1
PIAS2	Protein inhibitor of activated STAT2	Proteína inhibidora de STAT2 activada
PIK3R1	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1	Subunidad reguladora de la fosfoinositida-3-kinasa 1
PPP2R5D	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B'Delta	Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2 B'Delta
PRKCA	Protein Kinase C Alpha	Proteína Kinasa C alfa
PRM1	Protamine 1	Protamina 1
PRM2	Protamine 2	Protamina 2
PRM3	Protamine 3	Protamina 3
PYGM	Glycogen phosphorylase muscle associated	Glucógeno fosforilasa asociada al músculo
RCAN2	Calcineurin nuclear factor of activated T cells	Factor nuclear de calcineurina de las células T activadas
RMI2	RecQ Mediated Genome Instability 2	Inestabilidad del genoma mediada por RecQ 2
SLC10A2	Solute Carrier Family 10 Member 2	Miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 10
SLC11A1	Solute Carrier Family 11 Member 1	Miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 11
SLC25A8	Solute Carrier Family 25 Member 8	Miembro 8 de la familia 25 de transportadores de solutos
SLC2A5	Solute carrier family 2 member 5	Miembro 5 de la familia de transportadores de solutos 2
SOCS1	STAT-Induced STAT Inhibitor 1 or suppressor of cytokine Signaling 1	Inhibidor STAT 1 o supresor de la señalización de citoquinas 1
SP110	SP110 Nuclear Body Protein	Proteína del cuerpo nuclear SP110
SPARC	Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich	Proteína secretada ácida y rica en cisteína
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Transductor de señales y activador de la transcripción 3
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	Proteína del marco de lectura alternativo del TCR gamma
TFEB	Transcription factor EB	Factor de transcripción EB
TGFB2	Transforming Growth Factor Beta 2	Factor de crecimiento transformante Beta 2
TMEM117	Transmembrane protein 117	Proteína transmembrana 117
TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21	Miembro de la superfamilia de receptores del TNF 21
TNP2	Nuclear transition protein 2	Proteína de transición nuclear 2
TPC3	Two pore channel 3	Canal de dos poros 3
TRAF5	TNF Receptor Associated Factor 5	Factor 5 asociado al receptor del TNF
TREM1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2
TREML1	Triggering receptor expressed on myeloid cells like 1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides parecido a 1
TREML2	Triggering receptor expressed on myeloid cells like 2	Receptor desencadenante expresado en células mieloides parecido a 2
TTYH2	Tweety family protein 2	Proteína 2 de la familia Tweety
TUSC5	Tumor suppressor candidate 5	Candidato supresor de tumores 5
WNT2	Wnt Family Member 2	Miembro 2 de la familia Wnt

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN I	2
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Impacto económico y social de la paratuberculosis bovina	12
2.2. Etiología	14
2.2.1. Historia y taxonomía	14
2.2.2. Características morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP	16
2.2.3. Resistencia físico-química y ambiental de MAP	18
2.3. Epidemiología	20
2.3.1. Distribución y prevalencia en ganado bovino de leche	20
2.3.2. Rango de hospedadores	22
2.3.3. Transmisión	25
2.4. Patogenia	26
2.4.1. Entrada de MAP en el hospedador	26
2.4.2. Mecanismos de supervivencia de MAP en los macrófagos del hospedador	28
2.4.3. Establecimiento y progresión de la infección	29
2.5. Respuesta inmune del hospedador	31
2.5.1. Respuesta inmune anti-inflamatoria inducida en los macrófagos infectados	31
2.5.2. Respuesta inmune celular	32
2.5.3. Respuesta inmune humoral	32
2.6. Cuadro lesional y signos clínicos	34
2.6.1. Lesiones macroscópicas	34
2.6.2. Lesiones microscópicas	36
2.6.3. Signos clínicos	39
2.7. Diagnóstico	40
2.7.1. Métodos directos de detección del patógeno	41
2.7.2. Métodos indirectos	42
2.7.3. Nuevas técnicas diagnósticas	44
2.8. Inmunopatogenia	47
2.9. Tratamiento y medidas de control	48
2.9.1. Tratamiento	48
2.9.2. Medidas de control	51
2.10. Factores implicados en la resistencia/susceptibilidad a la infección por MAP	52
2.10.1. Susceptibilidad, tolerancia y resistencia genética a la infección por MAP	53
2.10.2. Estudios de variantes alélicas reguladoras	66
2.10.3. Programas de selección genética	68
3. MARCO TEÓRICO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	72
4. MATERIAL Y MÉTODOS	80
4.1. Análisis transcriptómico mediante RNA-Seq para la identificación de genes diferencialmente expresados en sangre y tejido intestinal de animales con diferentes lesiones asociadas a la PTB	78
4.1.1. Animales seleccionados y diagnóstico de PTB	80
4.1.2. Extracción de RNA y preparación de librerías	80

4.1.3. Secuenciación de RNA y análisis bioinformático	81
4.1.4. Análisis metabólico y de ontologías génicas	82
4.1.5. Análisis de asociación proteína-proteína	83
4.1.6. RT-qPCR	83
4.1.7. Inmunohistoquímica	83
4.2. Identificación y validación de SNPs reguladores de la expresión génica y asociados a susceptibilidad a la PTB	84
4.2.1. Selección de animales y diagnóstico de PTB	84
4.2.2. Análisis bioinformático	84
4.2.3. Genotipado	85
4.2.4. Análisis de cis-eQTLs	85
4.2.5. Validación de cis-eQTLs identificados mediante estudio dirigido de asociación génica	86
4.2.6. Validación del cis-eQTL asociado a la expresión del gen <i>MECOM</i> mediante ELISA	86
4.2.7. Validación del cis-eQTL asociado a la expresión del gen <i>MECOM</i> mediante ensayos ex vivo de macrófagos purificados de animales con las distintas variantes alélicas	87
4.3. Identificación y validación de SNPs asociados a la susceptibilidad/tolerancia a la PTB empleando GWAS	89
4.3.1. Animales y diagnóstico de PTB	89
4.3.2. Selección de animales	89
4.3.3. Genotipado e imputación de los datos a WGS	90
4.3.4. Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad	90
4.3.5. GWAS	91
4.3.6. Identificación de SNPs, QTLs y genes candidatos	92
4.3.7. Cuantificación de colesterol en muestras de plasma de animales con diferentes lesiones asociadas a la PTB	92
4.3.8. EBV y validación cruzada de las predicciones genómicas	93
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	94
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
6.1. El análisis RNA-Seq de ICV y PB en ganado frisón infectado con <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> identificó desregulación de la vía de señalización CXCL8/IL8	100
6.1.1. RNA-Seq	100
6.1.2. Análisis de expresión diferencial	101
6.1.3. Análisis de GOs	106
6.1.4. Análisis metabólico	107
6.1.5. Análisis de interacción proteína-proteína	108
6.1.6. RT-qPCR	109
6.1.7. Aplicaciones de los resultados del análisis de RNA-Seq al diagnóstico de la PTB bovina	110
6.2. Identificación de loci asociados con la susceptibilidad a la PTB bovina y con la desregulación de la expresión de los genes <i>MECOM</i> , <i>eEF1A2</i> y <i>U1snRNA</i>	111
6.2.1. Análisis de cis-eQTLs	111
6.2.2. Estudios de asociación caso-control	112
6.2.3. Validación funcional del cis-eQTL-rs43744169	116
6.3. Identificación de regiones genéticas asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP en ganado bovino utilizando combinaciones de test diagnósticos y datos de genotipado imputado a secuencia completa	117

6.3.1. Animales y diagnóstico de PTB	117
6.3.2. Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad	117
6.3.3. Identificación de SNPs significativos mediante GWAS	118
6.3.4. Identificación de QTLs y genes candidatos	119
6.4. Identificación de loci asociados con lesiones histopatológicas en ganado frisón infectado con MAP utilizando datos de genotipado imputado a secuencia completa	125
6.4.1. Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad	125
6.4.2. Estudios de asociación genética a genoma completo e identificación de SNPs	126
6.4.3. Identificación de QTLs y genes candidatos	127
6.4.4. Análisis de GOs y rutas metabólicas	128
6.4.5. Determinación de los niveles de colesterol en muestras de plasma de animales condistintos tipos de lesiones asociadas a la PTB	130
6.5. Identificación de genes candidatos implicados en el empaquetamiento del DNA, la reparación del daño del DNA, la inmunidad innata y persistencia mediante un estudio GWAS de tolerancia a la PTB	131
6.5.1. Definición del fenotipo de tolerancia y cálculo de estimas de heredabilidad	132
6.5.2. Identificación de SNPs asociados a la tolerancia a la PTB	133
6.5.3. Identificación de QTLs y genes candidatos	133
6.5.4. Análisis funcional para la identificación de GOs y rutas metabólicas	135
6.5.5. Valores de selección estimados y validación cruzada de las predicciones genómicas	138
6. 5.6. Aplicabilidad e impacto de los marcadores genéticos identificados	139
7. BIBLIOGRAFÍA	142
SECCIÓN II: CONCLUSIONES	175
SECCIÓN III: ANEXOS	179

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Causas de las pérdidas económicas provocadas por la PTB	12
Tabla II	Características morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP	17
Tabla III	Prevalencias de PTB en diferentes regiones de España	22
Tabla IV	Especies de rumiantes silvestres en las que se ha aislado MAP	23
Tabla V	Especies silvestres no rumiantes en las que se ha aislado MAP	24
Tabla VI	Mecanismos de evasión utilizados por MAP para sobrevivir en el macrófago	29
Tabla VII	Potencial de los test diagnósticos para la detección de MAP en función de la presencia o ausencia de signos clínicos	41
Tabla VIII	Test diagnósticos de la PTB en función de su objetivo	44
Tabla IX	Estudios de RNA-Seq llevados a cabo en diferentes muestras de ganado bovino	45
Tabla X	Biomarcadores inmunológicos, genéticos y proteicos desregulados en respuesta a la infección por MAP	46
Tabla XI	Técnicas diagnósticas de la PTB tradicionales y nuevas	47
Tabla XII	Medidas higiénico-sanitarias utilizadas en el control de la PTB en las explotaciones	52
Tabla XIII	Factores genéticos y ambientales que influyen en la susceptibilidad a la infección por MAP	53
Tabla XIV	Estudios de genes candidatos asociados con MAP	58
Tabla XV	Estudios GWAS y número de variantes asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP en bovino	60
Tabla XVI	Genes candidatos identificados como asociados a la susceptibilidad a la PTB mediante estudios de asociación GWAS	60
Tabla XVII	QTLs asociadas a la resistencia a la PTB en un estudio multirraza	64
Tabla XVIII	Variantes genéticas asociadas a la tolerancia identificadas mediante un fenotipo cuantitativo de tolerancia	65
Tabla XIX	QTLs descritos para otros rasgos sanitarios coincidentes con los identificados en el estudio GWAS llevado a cabo con diferentes combinaciones de test diagnósticos	123
Tabla XIX	Resumen de los resultados de los 5 estudios incluidos en la tesis	141

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Árbol filogenético de las diferentes especies y subespecies micobacterianas basado en la secuenciación parcial de rRNA 16S	15
Figura 2	Imagen de MAP y tinción Ziehl Nielsen de una muestra de tejido intestinal de una vaca infectada con MAP	16
Figura 3	Estructura de la pared celular de las micobacterias	18
Figura 4	Vías de transmisión de MAP al ser humano mediante agua y productos de origen animal	20
Figura 5	Prevalencia mundial de la infección por MAP a nivel de rebaño en vacuno lechero	21
Figura 6	Entrada de MAP por vía oral	26
Figura 7	Estrategias de MAP para atravesar la barrera intestinal	27
Figura 8	Estructura del granuloma	30
Figura 9	Esquema de la respuesta inmune Th1 y Th2 que tiene lugar tras la infección con MAP	34
Figura 10	Lesiones macroscópicas de PTB en íleon bovino	35
Figura 11	Lesiones microscópicas asociadas a la PTB bovina	38
Figura 12	Vacas Frisonas en estadios avanzados de la PTB	39
Figura 13	Tinción ZN de tejido intestinal de un animal con lesiones difusas multibacilares	41
Figura 14	Representación esquemática de las diferentes formas lesionales de la PTB de acuerdo al modelo propuesto por Bastida y Juste	48
Figura 15	Perfiles de susceptibilidad de 18 aislados de MAP de origen humano y animal frente a diferentes agentes antimicrobianos	50
Figura 16	Estrategias incluidas en la resiliencia	55
Figura 17	Variantes causales (<i>cis</i> -eQTL)	67
Figura 18	Pesos porcentuales de cada carácter en el ICO del programa de mejora genética de la raza frisona de CONAFE	70
Figura 19	Flujo de trabajo seguido para el análisis de la expresión diferencial de genes	81
Figura 20	Flujo de trabajo para el análisis de las variantes reguladoras de la PTB partiendo de los datos de RNA-Seq y de genotipado	85
Figura 21	Flujos de trabajo de los estudios de asociación de genoma completo	90
Figura 22	Comparación de los niveles de expresión de los genes seleccionados mediante RNA-Seq y RT-qPCR	109
Figura 23	Interacción entre la genética del hospedador y la infección con MAP en el fenotipo del hospedador	139

SECCIÓN I

1. RESUMEN

I. RESUMEN

La paratuberculosis (PTB) bovina es una enteritis granulomatosa crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que afecta a rumiantes tanto domésticos como silvestres. El control de la enfermedad se fundamenta en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias en las explotaciones y en el diagnóstico y eliminación de animales infectados. Sin embargo, el diagnóstico de animales infectados con MAP está fuertemente condicionado por la falta de sensibilidad de las técnicas de diagnóstico disponibles. Esta limitación incide sobre la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control de la PTB que permitan la detección de animales con infección subclínica o la selección genética de animales naturalmente resistentes a la infección.

En la presente Tesis Doctoral se identificaron mediante análisis transcriptómico (RNA-Seq), genes diferencialmente expresados en muestras de sangre periférica (PB) y válvula ileocecal (ICV) de animales con diferentes tipos de lesiones asociadas a la PTB (focales y difusas) respecto a animales control (sin lesiones). El análisis proporcionó información valiosa sobre la respuesta del hospedador a una infección natural con MAP, y permitió identificar genes, procesos biológicos, rutas metabólicas y redes de proteínas, desregulados en animales con lesiones focales y difusas que no habían sido previamente descritos, como la inhibición de la vía de señalización de CXCL8/IL8. El número de genes diferencialmente expresados fue mayor en muestras de ICV que en muestras de PB. Se identificaron cinco genes diferencialmente expresados en muestras de PB e ICV, independientemente del tipo de lesión, incluyendo el *CXCL8/IL8*, *APOLD1*, *IFI27*, *KIAA1324L* y *ARAP2*. Así mismo se identificaron dos rutas metabólicas enriquecidas comunes a PB e ICV de los animales con lesiones difusas: respuesta defensiva (GO:0006952) y respuesta inmune (GO:0006955). El gen más sobre-expresado en las muestras de ICV, independientemente del tipo de lesión, fue el precursor de la intelectina 2 (*ITLN2*), lo que sugería que podría ser utilizado como biomarcador de la infección por MAP en muestras de tejido. Por otro lado, el gen más sobre-expresado en muestras de PB de animales con lesiones focales, el transportador *ABCA13*, fue seleccionado como un posible biomarcador de la infección subclínica. En estudios realizados posteriormente en colaboración con el departamento de Sanidad Animal del SERIDA, se confirmó y validó el potencial de la *ITLN2* y del *ABCA13* como biomarcadores diagnósticos facilitando ambos la detección de animales con lesiones focales, y difícilmente detectables con los métodos tradicionales de diagnóstico.

La integración de datos de expresión génica obtenidos mediante RNA-Seq y datos de genotipado de animales infectados con MAP en condiciones naturales, permitió la identificación de 192 y 48 *cis*-eQTLs reguladores de la expresión de 145 y 43 genes en PB e ICV, respectivamente.

1. RESUMEN

Tres de estos *cis*-eQTLs regulaban la expresión de los genes *MECOM* (rs43744169), *eEF1A2* (rs110345285) y *UI* (rs109859270) y fueron asociados con la susceptibilidad a la infección por MAP mediante un estudio de asociación genética dirigida. En dicho estudio, se incluyeron los genotipos para los *cis*-eQTLs identificados y los datos fenotípicos (histopatología, ELISA, PCR y cultivo bacteriológico) de 986 animales de una población independiente. El genotipo heterocigoto para el rs43744169 (T/C), regulador del gen *MECOM*, se asoció con una sobreexpresión del gen *MECOM*, resultados positivos a los test de ELISA, PCR y cultivo bacteriológico, con mayores niveles de *MECOM* en el plasma de animales infectados con MAP, con una mayor supervivencia intracelular de MAP en ensayos *ex vivo* llevados a cabo con macrófagos bovinos y con una mayor riesgo de progresión a PTB clínica. Estos resultados sugieren que determinadas variantes alélicas del *cis*-eQTL regulador de la expresión del gen *MECOM*, un regulador transcripcional de la respuesta inflamatoria mediada por el *NF-κβ*, podrían causar una respuesta inflamatoria incontrolada y progresiva que exacerbaría el daño tisular en los animales infectados por MAP.

En la presente Tesis Doctoral también se han llevado a cabo tres análisis de asociación a genoma completo utilizando datos de genotipado imputado a secuencia completa y fenotipos antemortem (ELISA, para la detección de anticuerpos frente a MAP) y postmortem (PCR y cultivo de tejidos, para la detección de MAP, y análisis histopatológico de lesiones intestinales). La combinación de varios test diagnósticos mejoró las estimas de heredabilidad respecto al uso de test individuales remarcando la importancia de una correcta definición del fenotipo. En el primer estudio, la combinación de ELISA-PCR-Cultivo ($h^2 = 0,139$) permitió identificar 159 SNPs asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP. En el segundo estudio se identificaron un total de 129 y 92 SNPs asociados ($P < 5 \times 10^{-7}$) con la presencia de lesiones multifocales ($h^2 = 0,075$) y difusas ($h^2 = 0,189$), respectivamente. Así mismo se identificaron genes candidatos implicados en el proceso de queratinización en los animales con lesiones multifocales, mientras que en los animales con lesiones difusas se identificaron genes candidatos relacionados con el metabolismo del colesterol lo que se confirmó funcionalmente al detectarse niveles más bajos de colesterol en el plasma de animales con lesiones difusas. En el tercer estudio de asociación llevado a cabo, se buscaron variantes asociadas con la tolerancia a la PTB. Se consideró que un animal era tolerante cuando era positivo a PCR y cultivo bacteriológico de tejidos pero no presentaba lesiones asociadas a la PTB en tejido intestinal. La heredabilidad del fenotipo de tolerancia a la PTB fue alta ($h^2 = 0,55$), identificándose 40 SNPs ($P < 5 \times 10^{-7}$), 9 QTLs y 98 genes candidatos asociados a este fenotipo. El análisis de enriquecimiento funcional utilizando los genes candidatos identificados permitió definir un perfil inmunogenético específico en los animales tolerantes, diseñado para

reparar daños en el DNA, controlar la carga bacteriana, modular la inflamación, limitar el daño tisular, y favorecer el establecimiento de una infección persistente.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral proporcionan información nueva y global acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la susceptibilidad a la infección por MAP y a la tolerancia a la PTB con aplicaciones en el diagnóstico y control de la enfermedad. El uso de algunos de los biomarcadores identificados mediante RNA-Seq ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para la detección de animales subclínicos, difícilmente detectables con los métodos diagnósticos tradicionales. Además, los SNPs identificados podrían ser integrados en los programas de selección de ganado bovino asistidos por marcadores con el objetivo de seleccionar animales menos susceptibles a la infección por MAP y más tolerantes a la PTB, y probablemente también a otras enfermedades, lo que redundará en una mejor sanidad y bienestar animal, mayor longevidad, reduciría los costes económicos de las explotaciones, minimizaría el uso de agentes antimicrobianos y la aparición de resistencias a los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Impacto económico y social de la paratuberculosis bovina

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) causa la paratuberculosis (PTB), una enteritis granulomatosa crónica que afecta a rumiantes tanto domésticos como silvestres. La PTB fue descubierta hace más de un siglo pero continúa comprometiendo la salud y bienestar animal y supone un importante problema económico y social. Por estos motivos, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), ha catalogado la PTB como una enfermedad de declaración obligatoria (OIE, 2021).

La PTB es una enfermedad de distribución mundial. Whittington y col. llevaron a cabo una encuesta en 48 países en la que se estimó que, en la mitad de los países encuestados, el 20% de los rebaños estarían infectados (Whittington y col., 2019). Otros estudios previos determinaron una prevalencia de la infección del 50% en rebaños bovinos de producción láctea en Europa y Estados Unidos, pudiendo considerarse una enfermedad endémica de estas zonas (Nielsen & Toft, 2009). La PTB causa pérdidas económicas importantes en las explotaciones de ganado ovino, caprino y bovino de leche. Estas pérdidas económicas se deben principalmente a la muerte prematura de animales infectados, al descenso en la fertilidad y la producción láctea y a la mayor susceptibilidad a otras enfermedades (García & Shalloo, 2015).

Tabla I. Causas de las pérdidas económicas provocadas por la PTB. Basado en Hasonova & Pavlik, 2006

Pérdidas económicas directas	Pérdidas económicas indirectas
<ul style="list-style-type: none"> • Mortalidad de animales con clínica de PTB • Disminución de la producción de leche • Cambios en parámetros de calidad de la leche: aumento de los recuentos de células somáticas • Disminución de la fertilidad • Disminución de la edad de producción de los animales • Predisposición a otras enfermedades: artritis, dermatitis, mastitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Sacrificio prematuro de los animales • Gastos por reemplazo de animales • Gastos de asistencia veterinaria • Gastos de los programas de control • Pérdida del valor genético de los animales • Gastos asociados a las restricciones impuestas por el mercado o por la legislación • Gastos por la pérdida de reputación de una granja con animales infectados con MAP

Las pérdidas económicas exactas son difíciles de cuantificar debido a la dificultad para determinar la prevalencia real de la enfermedad y la magnitud de los efectos de la enfermedad subclínica. Se estima que las pérdidas anuales por vaca infectada al año en Estados Unidos rondan los 21 dólares (Verteramo Chiu y col., 2018). Mientras que en rebaños infectados en Australia, Canadá, Francia y Reino Unido se han establecido pérdidas por animal infectado al año de 88 dólares australianos, 49 dólares canadienses, 234 euros y 27 libras, respectivamente (Dufour y col., 2004; Stott y col., 2005; Tiwari y col., 2008; Shephard y col., 2016). Algunos estudios, han propuesto que las pérdidas económicas en la industria láctea de Estados Unidos debido a la PTB

2. INTRODUCCIÓN

representan un 1% de los ingresos brutos anuales obtenidos de la leche (Rasmussen y col., 2021). En España, la prevalencia a nivel de rebaño se sitúa por encima del 40% en ganado bovino lechero (Whittington y col., 2019). En un estudio previo llevado a cabo en muestras de leche de tanque mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase chain reaction; PCR) se estimó que el 18% de las explotaciones de bovino lechero en España estaban infectadas (Sevilla y col., 2002). La reducción de la producción láctea en los animales infectados se ha estimado en 2kg/vaca/día (Sorge y col., 2011; McAloon y col., 2015), produciendo las vacas positivas a cultivo fecal un 11% menos de leche que aquellos animales del mismo rebaño con resultado negativo (Raizman y col., 2007). Además, MAP ha sido aislado de especies de fauna silvestre que comparten pasto con el ganado, pudiendo suponer un riesgo importante de infección (Fox y col., 2020).

Por otro lado, no hay que olvidar el potencial zoonótico de MAP. La relación entre la PTB en ganado y la enfermedad de Crohn (Crohn's disease; CD) en humanos fue propuesta por primera vez hace más de un siglo (Dalziel, 1913). Se han observado similitudes en los signos clínicos y en las lesiones de ambas enfermedades y demostrado que pacientes con enfermedad de Crohn responden favorablemente a drogas con actividad anti-MAP (Behr & Kapur, 2008; Juste y col., 2008). Además, se ha identificado MAP en muestras de sangre y tejido de pacientes con la enfermedad de Crohn (Sechi y col., 2004; Juste y col., 2008) y de muestras de leche de mujeres lactantes con enfermedad de Crohn mediante técnicas moleculares e histopatológicas (Naser y col., 2000). Sin embargo, a día de hoy, sigue sin confirmarse una relación causal.

MAP se ha aislado de muestras de intestino de pacientes con CD, colitis ulcerosa y cáncer colorrectal asociado a la enfermedad inflamatoria intestinal (Inflammatory bowel disease; IBD) (Azimi y col., 2018; Balseiro y col., 2019; Shariati y col., 2019). El cáncer colorrectal puede aparecer como una complicación de las dos formas de IBD idiopática; la CD y la colitis ulcerosa (Pierce, 2018). Numerosos estudios han relacionado a MAP con enfermedades autoinmunes como la sarcoidosis (Celler, 2018), el síndrome de Sjogren (Dow & Chan, 2021), la enfermedad de Alzheimer (Dow, 2021), la artritis reumatoide (Bo y col., 2020), la tiroiditis de Hashimoto (Sisto y col., 2010), el síndrome de Blau (Dow & Ellingson, 2010), la diabetes tipo I (Naser y col., 2013) o la esclerosis múltiple (Frau y col., 2013). Se ha sugerido que la respuesta inmune del hospedador frente a antígenos de MAP en individuos genéticamente predispuestos, podría desencadenar enfermedades autoinmunes (Cossu y col., 2011).

2.2. Etiología

2.2.1. Historia y taxonomía

En 1894 en la región de Oldenburg (Alemania), un ganadero adquirió una vaca que presentaba baja producción láctea y dificultad para ganar peso. En un primer momento se asoció el cuadro a la tuberculosis intestinal causada por *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, el animal resultó negativo al test dérmico de la tuberculina. En el análisis histopatológico llevado a cabo por los doctores Heinrich Albert Johne y Langdon Frothingam tras la muerte del animal, se observó mediante tinción Ziehl Nielsen (ZN) abundante cantidad de una bacteria muy parecida a la causante de la tuberculosis. Johne y Frothingam concluyeron que la enfermedad observada había sido provocada por la bacteria responsable de la tuberculosis aviar (*Mycobacterium avium*) pero en reconocimiento de las similitudes con la tuberculosis intestinal propusieron el nombre de enteritis pseudotuberculosa (Johne & Frothingam, 1895). En 1912, se describe una enfermedad que cursa con engrosamiento de la mucosa intestinal asociada a diarrea crónica que supone la primera descripción de la PTB, pasando a denominarse la bacteria causal como “*Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosa bovis*” (Twort & Ingram, 1912). Posteriormente, la bacteria pasó a denominarse *Bacterium paratuberculosis* (Bergey y col., 1923), *Bacillus paratuberculosis* (Krasilnikov, 1941) y más adelante *Mycobacterium Johnei* (Francis, 1943). A finales del siglo XX, se observó una alta homología genética entre el agente causal de la PTB y *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (Saxegaard & Baess, 1988; Thorel y col., 1990). Por este motivo, MAP se consideró como una subespecie de *Mycobacterium avium* pasando a denominarse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

MAP pertenece al género *Mycobacterium* (Lehman & Newman, 1896), que engloba a 147 especies micobacterianas. Las micobacterias se incluyen en la división *Firmicutes*, clase *Actinomycetes*, subclase *Actinobacteriacea*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corinebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium* (Shinnick & Good, 1994). Los requisitos mínimos para la inclusión de una bacteria en este género son (Levy-Frebault & Portaels, 1992):

- Ácido-alcohol resistencia
- Presencia de ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono de longitud
- 61-71% de contenido en guanina/citosina en su genoma

Uno de los genes más comúnmente utilizados para la clasificación taxonómica de las micobacterias, es el gen RNA ribosómico 16S (ribosomic RNA 16S; rRNA16S). Este gen tiene una

2. INTRODUCCIÓN

longitud de unos 1500 nucleótidos y presenta dos regiones hipervariables (A y B) en todas las especies de micobacterias (Boddinghaus y col., 1990). Para la clasificación de las especies micobacterianas se suele secuenciar la región hipervariable A. En la figura 1 se muestra el árbol filogenético de varias especies y subespecies micobacterianas de acuerdo a la secuenciación parcial del gen rRNA 16S.

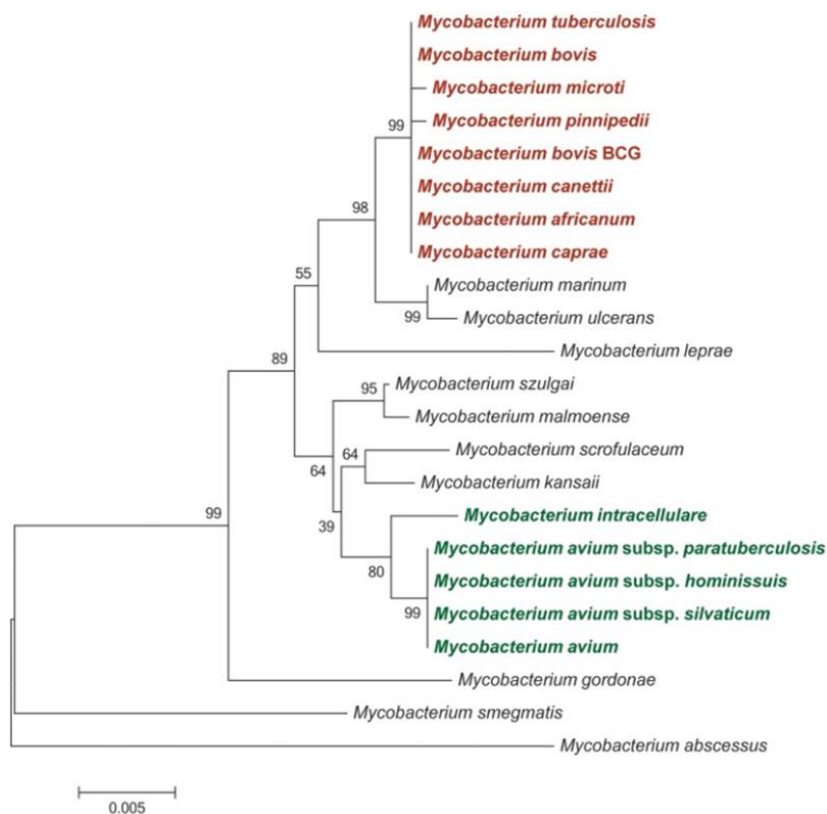


Figura 1. Árbol filogenético de las diferentes especies y subespecies micobacterianas basado en la secuenciación parcial de rRNA 16S. En rojo, se muestran las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) y, en verde, las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) (Rue-Albrecht y col., 2014)

El género *Mycobacterium* se divide en dos complejos: el complejo *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) y el complejo de micobacterias no tuberculosas (Non tuberculous mycobacteria; NTM). El complejo MTC incluye a micobacterias que causan tuberculosis en mamíferos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis en humanos. También se incluye en este complejo *Mycobacterium bovis*, agente causal de la tuberculosis en bovino. Los miembros del MTC pueden diferenciarse en función del rango de hospedadores y de su potencial patogénico. La especie que presenta mayor rango de hospedadores es *Mycobacterium bovis*, que aunque generalmente se detecta en ganado vacuno, también puede infectar a pequeños rumiantes, animales salvajes y seres humanos (Zimpel y col., 2020).

Dentro del grupo de micobacterias no tuberculosas, encontramos el complejo MAC, al que pertenece MAP (Inderlied y col., 1993). Los integrantes del complejo MAC comparten las siguientes características:

- Crecimiento lento
- Crecimiento en un amplio rango de temperatura (entre 20 y 37°C)
- Crecimiento en un amplio rango de pH (4-7,5)
- 40% de similitud de su genoma con el complejo MTC

A pesar de la similitud genética entre los integrantes del complejo MAC, las micobacterias incluidas en este complejo muestran diferente rango de hospedadores.

2.2.2. Características morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP

MAP crece muy lentamente en medios de cultivo sólido, necesitando entre 8 y 24 semanas para formar colonias visibles. Fenotípicamente, MAP da lugar a colonias de aspecto rugoso en medios sólidos y tiende a formar agregados en medios de cultivo líquidos (Twort & Ingram, 1912; Bergey y col., 1923). Cuando crece en medios de cultivo, MAP es dependiente de micobactina para la captación de hierro. MAP es micobactina dependiente debido a un acortamiento de uno de los genes responsables de la producción de micobactina (*MbtA*) respecto a *Mycobacterium tuberculosis* (Li y col., 2005). La micobactina es un sideróforo utilizado para el transporte de iones de hierro extracelulares libres al citoplasma de las células micobacterianas (Thorel y col., 1990).

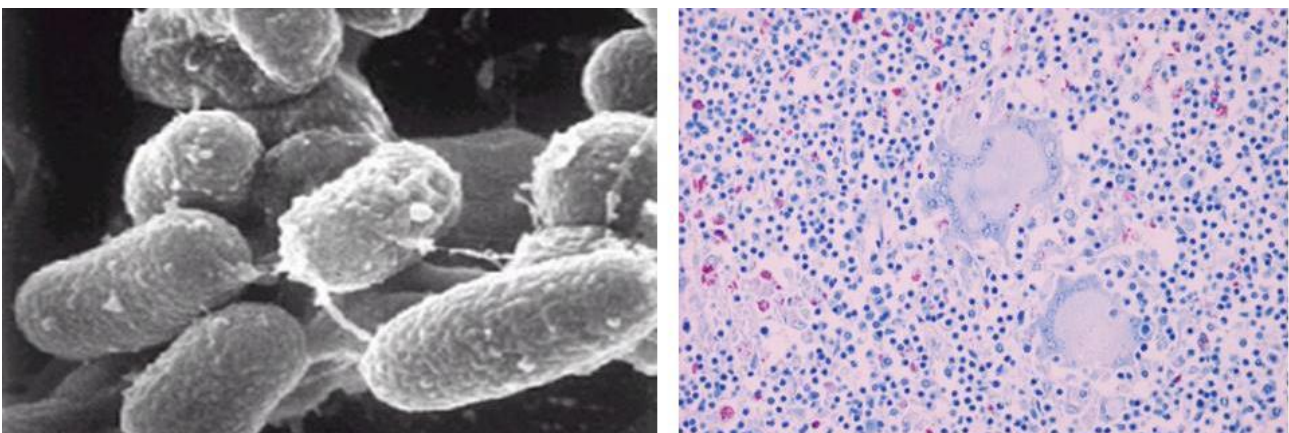


Figura 2. Imagen de MAP y tinción Ziehl Nielsen de una muestra de tejido intestinal de una vaca infectada con MAP. A la izquierda fotografía de MAP obtenida con un microscopio electrónico de barrido (<https://johnes.org/>); a la derecha tinción Ziehl Nielsen de una sección de tejido intestinal de una vaca infectada con MAP. La bacteria se observa de un color rosado intenso (40x) (Vázquez, 2014a)

2. INTRODUCCIÓN

El genoma de MAP contiene 4457 genes en un único cromosoma circular y no se han descrito plásmidos (Li y col., 2005; Rathnaiah y col., 2017). Las cepas de MAP se clasifican en: cepas S (Sheep), aisladas fundamentalmente en ovino y caprino, y cepas C (Cattle), aisladas en bovino, animales silvestres y en humanos con enfermedad de Crohn. La secuencia del genoma de la cepa bovina K10 fue publicado en 2005 y en 2012 se publicó la secuencia de la cepa S397 (Li y col., 2005; Bannantine y col., 2012). La descripción de las características morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Características morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP. Adaptado de (Abendaño, 2016)

Característica morfológicas, bacteriológicas, metabólicas y genéticas de MAP	Referencias
Características Morfológicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Bacilo inmóvil. • Tamaño: 0,5 μm x 1-2 μm • Tendencia a formar grumos 	<p>Twort e Ingram, 1912 Bergey y col., 1923 Thorel y col., 1990</p>
Características Bacteriológicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Gram + • Tinción: ZN + • Pared celular de alto contenido lipídico <ul style="list-style-type: none"> ○ 4 capas: Membrana citoplasmática, peptidoglicanos (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM) ○ Presencia de AM de 60-90 átomos de carbono. 	<p>Twort e Ingram, 1912 Wayne & Kubika, 1986 Brennan & Nikaido, 1995</p>
Características Metabólicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Aerobio Facultativo • Baja actividad metabólica • Test Bioquímicos: <ul style="list-style-type: none"> ○ Positivo a: catalasa, hidrólisis del Tween y test de la trehalosa. ○ Negativo a: producción de niacina y fosfatasa alcalina, actividad: ureasa, pirazinamidasas y arilsulfatasas, reducción de nitrato y telurito y tolerancia al cloruro sódico. • Requerimientos nutricionales <ul style="list-style-type: none"> ○ Fuente de Carbono: glicerol, piruvato e hidrocarburos. ○ Fuente de Nitrógeno: asparagina, glutamina, glutamato, ácido aspártico, sales de amonio. ○ Macroelementos: Potasio, magnesio, azufre, fósforo. ○ Microelementos: Hierro, zinc, manganeso, molibdeno. ○ Componentes que facilitan el crecimiento: ácidos palmítico y OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), yema de huevo y dióxido de carbono • Crecimiento lento en medios de cultivo sólidos: 8-16 semanas (hasta 6-12 meses) según la cepa y el medio <ul style="list-style-type: none"> ○ 37°C ○ Micobactina dependiente 	<p>Snow, 1970 Merkal & Curran, 1974 Thorel y col., 1990 Cocito y col., 1994 Whittington, 2020</p>
Características Genéticas (Cepa K10)	
<ul style="list-style-type: none"> • Genoma de 4,83Mb • 4457 genes • 69.3% GC • Cromosoma único circular • No plásmidos descritos 	<p>Li y col., 2005 Rathnaiah y col., 2017 Conde y col., 2021</p>

La pared bacteriana de MAP, y de otros miembros del género *Mycobacterium*, es una pared celular hidrofóbica con un alto contenido en lípidos (40%). Este porcentaje es muy superior al resto de otras bacterias Gram + (5%) y Gram – (10%), lo que explicaría la formación de agregados bacterianos en medios de cultivo líquidos y la ácido-alcohol resistencia (Brennan & Goren, 1979). En la figura 3 se muestra un esquema que representa la estructura de la pared de MAP. En la membrana plasmática de MAP se anclan las proteínas y el lipoarabinomano (LAM). Cuando al LAM se asocia con residuos de manosa se denomina lipoarabinomano manosilado (Mannosylated lipoarabinomannan; ManLAM). El esqueleto interno básico está formado por la capa de peptidoglicano (PG). Al PG, se une el arabinogalactano (AG), un polisacárido ramificado formado por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de la D-arabinosa se esterifica dando lugar a los ácidos micólicos a los que se anclan glicolípidos de superficie. Otras proteínas transportadoras y porinas se intercalan en la pared, representando el 15 % del peso de la ésta.

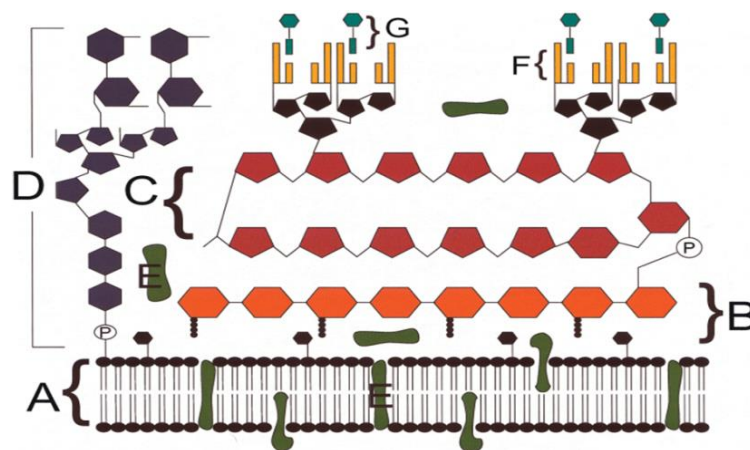


Figura 3. Estructura de la pared celular de las micobacterias. (A) Membrana plasmática, (B) Peptidoglicano (PG), (C) Arabinogalactano, (D) Lipoarabinomano (LAM), (E) Proteínas, (F) Ácidos micólicos (AM), (G) Glicolípidos. Adaptado de McNeil & Brennan, 1991

2.2.3. Resistencia físico-química y ambiental de MAP

La pared celular de MAP le confiere una alta resistencia tanto a condiciones ambientales adversas como a los tratamientos utilizados para higienizar agua y alimentos de consumo humano. Los tratamientos térmicos utilizados en los procesos de pasteurización (63°C durante 30 minutos o 72°C durante 15 segundos) no son capaces de reducir la carga de MAP completamente. Mientras que el proceso a 63°C durante 30 minutos elimina el 90% de las células viables de MAP, el tratamiento de 72°C durante 15 segundos elimina el 95% (Chiodini & Hermon-Taylor, 1993). Otros tratamientos como la aplicación de luz ultravioleta y el tratamiento con cloro tampoco consiguen eliminar totalmente los bacilos de MAP, observándose tras su aplicación viabilidades del 5,2% y 2,4%, respectivamente (Kralik y col., 2014). Recientemente, se ha comparado la eficacia de 3

2. INTRODUCCIÓN

desinfectantes comerciales para la eliminación de MAP de cultivos bacterianos puros, tejidos animales y estiércol (Stabel y col., 2020). Dos de los tres desinfectantes analizados, uno de base fenólica y otro elaborado con aceites esenciales de diversas plantas, mostraron una eficacia del 100%, consiguiendo eliminar totalmente MAP de los tres sustratos a los 30 minutos de su aplicación (Stabel y col., 2020).

Algunos estudios han demostrado que MAP puede sobrevivir en pastos entre 7 y 8 semanas (Eppleston y col., 2014), llegando hasta las 55 semanas si se encuentra protegido de la luz solar directa (Whittington y col., 2004). La supervivencia de MAP en aguas de presa oscila entre las 36 y las 48 semanas (Whittington y col., 2005). En este caso, nematodos, insectos y protozoos podrían ingerir MAP favoreciendo así su supervivencia en el ambiente (Whan y col., 2006; White y col., 2010). Eisenberg y col., detectaron MAP viable en muestras de cubículos, suelo y polvo de varios establos en Alemania mediante PCR a tiempo real (Eisenberg y col., 2010).

Los animales infectados con MAP pueden excretar la bacteria en heces contaminando cursos de agua destinados a consumo humano (Grant, 2020). La resistencia de MAP a los tratamientos aplicados para la potabilización del agua de consumo haría posible la presencia de la bacteria en el agua de bebida (Loret & Dumoutier, 2019). De hecho Vaerewijck y col., calcularon que podía acumularse una cantidad de 7×10^5 células de MAP por litro en agua potable debido a la resistencia de MAP a los tratamientos de cloración y filtración del agua (Vaerewijck y col., 2005). Esto demostraría que los procesos de sedimentación, filtrado y desinfección del agua que habitualmente se llevan a cabo, no serían suficientes para eliminar la bacteria, pudiendo detectarse en agua tratada para consumo humano (King y col., 2016).

Por otro lado, MAP podría entrar en la cadena alimentaria a través de carne y leche contaminadas. La contaminación de la leche en las explotaciones puede producirse por la eliminación directa de MAP en la leche de las vacas infectadas o, por contaminación de la leche con heces de animales excretores. La resistencia de MAP a los procesos térmicos aplicados a la leche, como se ha mencionado anteriormente, permitiría que la leche fuera un vehículo de transmisión de MAP al ser humano (Gerrard y col., 2018). En el caso de la carne destinada a consumo humano, Alonso-Hearn y col., aislaron bacilos viables de MAP en el músculo diafragma de 6 terneras sacrificadas en matadero, empleando cultivo bacteriológico y PCR convencional y a tiempo real. (Alonso-Hearn y col., 2009). Incluso en productos con una baja actividad de agua como son las leches infantiles y los sustitutivos lácteos para terneros, también se ha detectado MAP (Acharya y col., 2017; Grant y col., 2017). Además de en los productos lácteos y los cárnicos, no se puede

descartar la presencia de MAP en otros alimentos (Grant, 2020). En la figura 4 se describen las vías de exposición humana a MAP a través de agua y alimentos de origen animal.

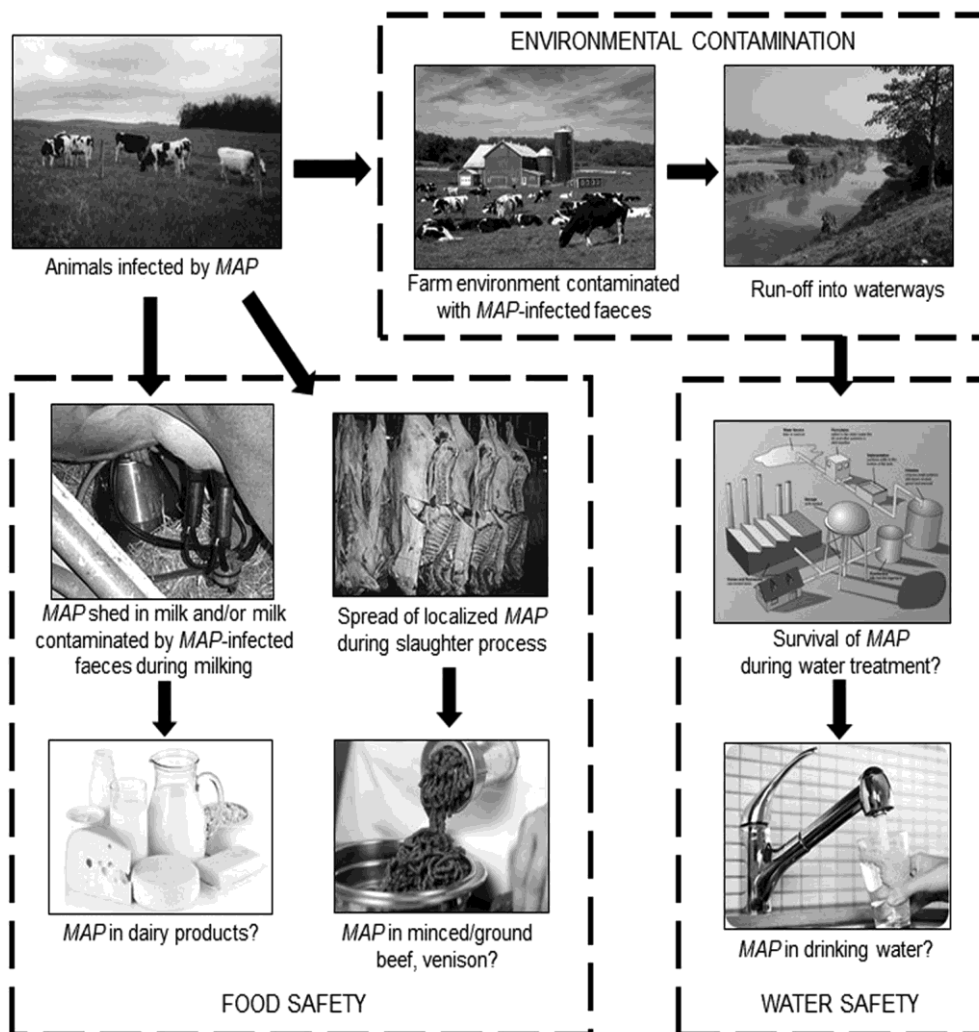


Figura 4. Vías de transmisión de MAP al ser humano mediante agua y productos de origen animal (Grant, 2020)

2.3. Epidemiología

2.3.1. Distribución y prevalencia en ganado bovino de leche

La PTB es una enfermedad de distribución mundial. Son muy pocos los países que presentan prevalencia de PTB a nivel de rebaño en vacuno lechero inferiores al 1%: Suecia, Noruega y Tailandia. La mayoría de países presentan prevalencias a nivel de rebaño superiores al 20% (Whittington y col., 2019). En 2013, Lombard y col., calcularon prevalencias de PTB a nivel de rebaño del 70% para las granjas de vacuno lechero de Estados Unidos. Además, estimaron porcentajes de prevalencia del 90% a nivel de rebaño de la infección mediante modelos bayesianos (Lombard y col., 2013). En granjas de producción lechera de Canadá se han calculado prevalencias a nivel de rebaño del 46% mediante cultivo de muestras medioambientales (Corbett y col., 2018). En otros estudios llevados a cabo por Geraghty y col. en 2014 se determinaron prevalencias del

2. INTRODUCCIÓN

85% a nivel de rebaño en Dinamarca y de entre 20-71% en Países Bajos y 28-43% en Reino Unido (Geraghty y col., 2014). Por otro lado, en Alemania la seroprevalencia a nivel de rebaño se estimó en el 85% (Khol & Baumgartner, 2012). En España, la prevalencia a nivel de rebaño se sitúa por encima del 40% en ganado bovino lechero (Whittington y col., 2019). En la figura 5 se observa la prevalencia de la PTB a nivel mundial en ganado bovino de producción láctea de acuerdo a la encuesta llevada a cabo por Whittington y col. en 2019.

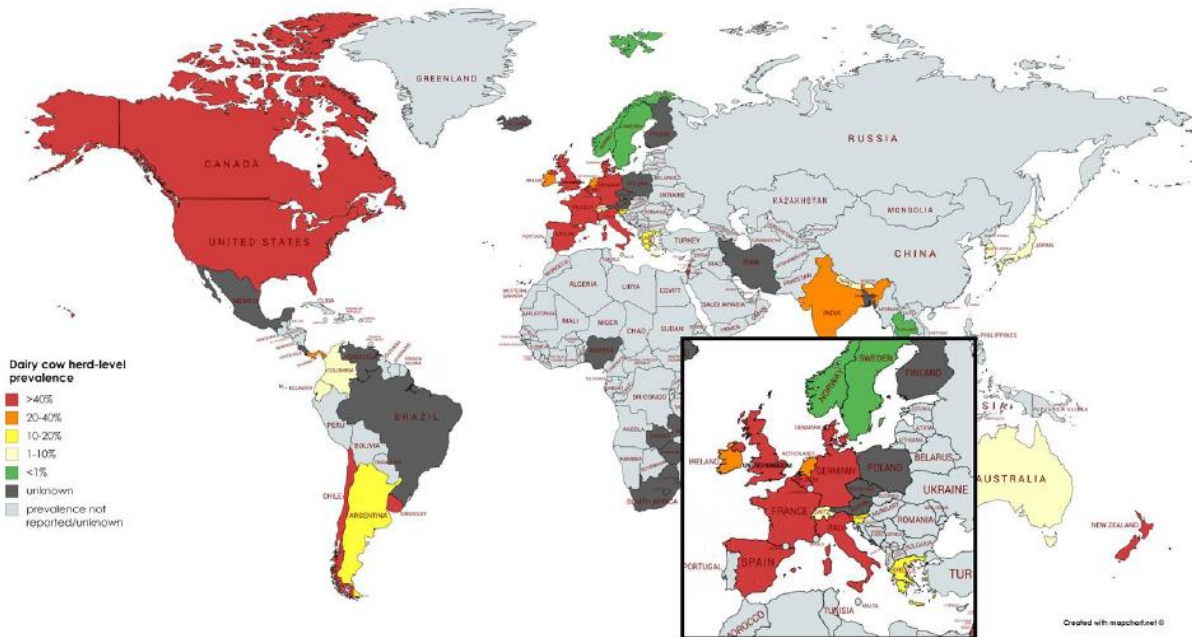


Figura 5. Prevalencia mundial de la infección por MAP a nivel de rebaño en vacuno lechero (Imada y col., 2020)

En lo referente a España, en un estudio llevado a cabo con animales sacrificados en matadero (N= 201) en Bilbao, se detectó una prevalencia individual de la infección por MAP del 31.3% (Garrido, 2001). Este dato se obtuvo mediante la combinación de resultados de diferentes test diagnósticos: cultivo bacteriológico de tejido y heces, inmunodifusión en gel de agarosa (agarose gel immunodiffusion; AGID), histopatología, PCR y enzimoimmunoanálisis de adsorción (enzyme-linked immunoassay; ELISA). El porcentaje de positivos individual fue del 0,5% tanto para AGID como para PCR de tejido y heces, del 4,7% para histopatología, el 15,4% para PCR y del 19,4% para el ELISA. Sevilla y col. estimaron mediante PCR en leche de tanque que en torno al 18% de las explotaciones españolas podrían estar infectadas (Sevilla y col., 2002). En Asturias, Balseiro y col. analizaron muestras histológicas de 134 vacas, encontrando prevalencias individual y a nivel de rebaño del 28 y 32% respectivamente (Balseiro y col., 2003). En otro estudio llevado a cabo en Galicia, Diéguez y col., establecieron prevalencias de 3,02 a nivel individual y 14,75 a nivel de rebaño mediante ELISA de 61.069 animales pertenecientes a 2.735 rebaños (Diéguez y col., 2007). En Castilla y León, Pérez y col. obtuvieron prevalencias individuales y de rebaño del

2,8 y 50% respectivamente mediante el análisis histopatológico de muestras de 15.546 animales pertenecientes a 137 rebaños (Pérez y col., 2009). En concordancia con estos datos, más recientemente, y utilizando la técnica de ELISA en muestras de suero de 264 animales, Picasso-Risso y col. han calculado prevalencias del 51,52% a nivel de rebaño en Castilla y León (Picasso-Risso y col., 2019). El resumen de estos estudios llevados a cabo en ganado bovino en España se muestra en la tabla III.

Tabla III. Prevalencias de PTB en diferentes regiones de España. Adaptado de Abendaño, 2016.

Región	Tipo Prevalencia	Prevalencia (%)	Técnica	Referencias
País Vasco	Individual	31,3	Cultivo, AGID, PCR, histopatología, ELISA	Garrido, 2001
Norte/Centro/Sur España	Rebaño	18,0	PCR	Sevilla y col., 2002
Asturias	Individual	28,0	ELISA	Balseiro y col., 2003
Asturias	Rebaño	32,0	Histopatología	Balseiro y col., 2003
Galicia	Individual	3,02	ELISA	Diéguez y col., 2007
Galicia	Rebaño	14,75	ELISA	Diéguez y col., 2007
Castilla y León	Individual	2,8	Histopatología	Pérez y col., 2009
Castilla y León	Rebaño	50,0	Histopatología	Pérez y col., 2009
Castilla y León	Rebaño	51,52	ELISA	Picasso-Risso y col., 2019

2.3.2. Rango de hospedadores

La PTB es una enfermedad que afecta a rumiantes tanto domésticos como silvestres, adquiriendo mayor interés para el ser humano por su importancia económica las especies bovina (*Bos Taurus*), ovina (*Ovis aries*) y caprina (*Capra hircus*). Todos los rumiantes son susceptibles de ser infectados por MAP al igual que los camélidos. No todas las especies de rumiantes silvestres desarrollan la enfermedad, actuando algunas especies únicamente como reservorio. Este es el caso de la cabra salvaje y los antílopes, que no desarrollan signos clínicos de la PTB (Griffin, 1988). Se ha aislado la bacteria en una gran variedad de rumiantes silvestres entre los que se encuentra el caribú (*Rangifer tarandus*), el ciervo moteado (*Axis axis*), el alce tule (*Cervus canadensis nannodes*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el gamo (*Dama dama*), el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), el corzo (*Capreolus capreolus*), el ciervo sica (*Cervus nippon*), el bisonte (*Bison bison*), el búfalo (*Bubalus bubalis*) y el alce (*Alces alces*). Dentro de los rumiantes silvestres, el ciervo es especialmente vulnerable a la PTB mostrando signos clínicos severos a edades más tempranas que otros rumiantes, especialmente cuando es criado en cautividad (O'Brien y col., 2020).

2. INTRODUCCIÓN

Respecto a los camélidos, se ha aislado MAP del camello bactriano (*Camelus bactrianus*), del dromedario (*Camelus dromedarius*), de la llama (*Llama glama*), la alpaca (*Llama pacos*) y el guanaco (*Llama guanicoe*). En los camélidos la enfermedad sigue un curso más rápido que en ganado vacuno (O'Brien y col., 2020). En la tabla IV se resumen las especies de rumiantes silvestres en las que se ha aislado MAP.

Tabla IV. Especies de rumiantes silvestres en las que se ha aislado MAP (Elliott y col., 2015)

Rumiantes	Familia	Especie	Referencia
Arruí	Bovidae	<i>Ammotragus lervia</i>	Boever & Peters, 1974
Bisonte	Bovidae	<i>Bison bison</i>	Buergelt & Ginn, 2000
Yak	Bovidae	<i>Bos grunniens</i>	Almejan, 1958
Cebú	Bovidae	<i>Bos indicus</i>	Katic, 1961
Búfalo de agua	Bovidae	<i>Bubalus bubalis</i>	Katic, 1961
Íbice	Bovidae	<i>Capra ibex</i>	Ferroglio y col., 2000
Gnu	Bovidae	<i>Connochaetes albojubatus</i>	Rankin, 1958
Cabra blanca	Bovidae	<i>Oreamnos americanus</i>	Williams y col., 1979
Musmón	Bovidae	<i>Ovis canadensis</i>	Williams y col., 1979
Muflón	Bovidae	<i>Ovis montanus</i>	Machackova y col., 2004
Saiga	Bovidae	<i>Saiga tatarica</i>	Dukes y col., 1992
Camello bactriano	Camelidae	<i>Camelus bactrianus</i>	Katic, 1961
Dromedario	Camelidae	<i>Camelus dromedarius</i>	Amand, 1974
Llama	Camelidae	<i>Llama glama</i>	Appleby & Head, 1954
Guanaco	Camelidae	<i>Llama guanicoe</i>	Salgado y col., 2009
Alpaca	Camelidae	<i>Lama pacos</i>	Ridge y col., 1995
Alce	Cervidae	<i>Alces alces</i>	Soltys y col., 1967
Axis	Cervidae	<i>Axis axis</i>	Riemann y col., 1979
Corzo	Cervidae	<i>Capreolus capreolus</i>	Machackova y col., 2004
Ciervo Común	Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	Pavlik y col., 2000
Ciervo canadiense	Cervidae	<i>Cervus elaphus nannodes</i>	Jessup y col., 1981
Ciervo sica	Cervidae	<i>Cervus nippon</i>	Thoen y col., 1977
Gamo	Cervidae	<i>Dama dama</i>	Riemann y col., 1979
Venado de cola blanca	Cervidae	<i>Odocoileus virginianus</i>	Chiodini & VanKruiningen, 1983
Ciervo de los cayos	Cervidae	<i>Odocoileus virginianus clavium</i>	Quist y col., 2002
Reno	Cervidae	<i>Rangifer tarandus</i>	Katic, 1961

Además de a rumiantes, MAP puede infectar a un amplio rango de hospedadores monogástricos (conejo, ratón, rata, armiño, tejón, hurón, zorro, mapache, jabalí, etc.), aves e insectos (Fox y col., 2020). El primer aislamiento de MAP en un animal no rumiante se remonta a 1977, cuando se aisló la bacteria de una liebre europea (Matthews & Sargent, 1977). A partir de ese momento, MAP se ha aislado en una amplia variedad de especies silvestres no rumiantes, tal y como se muestra en la tabla V.

Tabla V. Especies silvestres no rumiantes en las que se ha aislado MAP (Fox y col., 2020)

Clase	Orden	Especie	Referencia		
Mamíferos	Roedores	Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	Beard y col., 2001	
		Ratón de campo	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Beard y col., 2001	
		Ratón común	<i>Mus musculus</i>	Florou y col., 2008	
		Rata negra	<i>Rattus rattus</i>	Florou y col., 2008	
		Rata algodónera	<i>Sigmodon hispidus</i>	Corn y col., 2005	
		Topillo rojo	<i>Myodes glareolus</i>	Beard y col., 2001	
		Topillo campesino	<i>Microtus arvalis</i>	Anderson y col., 2007	
	Lagomorfos	Conejo europeo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Greig y col., 1999	
		Liebre europea	<i>Lepus europaeus</i>	Matthews & Sargent, 1977	
		Conejo castellano	<i>Sylvilagus floridanus</i>	Corn y col., 2005	
	Carnívoros	Armiño	<i>Mustela erminea</i>	Beard y col., 2001	
		Comadreja común	<i>Mustela nivalis</i>	Beard y col., 2001	
		Tejón común	<i>Meles meles</i>	Beard y col., 2001	
		Nutria europea	<i>Lutra lutra</i>	Matos y col., 2013	
		Hurón	<i>Mustela putorius furo</i>	Lisle y col., 2003	
		Zorro común	<i>Vulpes vulpes</i>	Beard y col., 2001	
		Oso pardo	<i>Ursus arctos</i>	Kopecna y col., 2008	
		Mapache boreal	<i>Procyon lotor</i>	Corn y col., 2005	
		Mofeta rallada	<i>Mephitis mephitis</i>	Corn y col., 2005	
		Coyote	<i>Canis latrans</i>	Anderson y col., 2007	
		Gato	<i>Felis catus</i>	Palmer y col., 2005	
		Eulipotiflanos	Musaraña	<i>Sorex longirostris</i>	Corn y col., 2005
			Musaraña de campo	<i>Crocidura suaveolens</i>	Kopecna y col., 2008
	Erizo común		<i>Erinaceus europaeus</i>	Nugent y col., 2011	
	Primates	Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	Zwick y col., 2002	
		Macaco rabón	<i>Macaca arctoides</i>	McClure y col., 1987	
	Artiodáctilos	Jabalí	<i>Sus scrofa</i>	Álvarez y col., 2005	
	Cingulados	Armadillo	<i>Dasyus novemcinctus</i>	Corn y col., 2005	
	Mamíferos marsupiales	Didelfimorfos	Zarigüeya americana	<i>Didelphis virginiana</i>	Corn y col., 2005
				<i>Macropus fuliginosus</i>	
		Diprotodontos	Canguro gris	<i>fuliginosus</i>	Cleland y col., 2010
			Wallabi de Tammar	<i>Macropus eugenii decres</i>	Cleland y col., 2010
	Aves	Paseriformes	Zarigüeya australiana	<i>Trichosurus vulpecula</i>	Nugent y col., 2011
Corneja negra			<i>Corvus corone</i>	Beard y col., 2001	
Grajo			<i>Corvus frugilegus</i>	Beard y col., 2001	
Grajilla occidental			<i>Corvus monedula</i>	Beard y col., 2001	
Gorrión común			<i>Passer domesticus</i>	Corn y col., 2005	
Estornino común			<i>Sturnus vulgaris</i>	Corn y col., 2005	
Caradriformes		Buscarla unicolor	<i>Locustella luscinioides</i>	Gronesova y col., 2008	
		Agachadiza común	<i>Gallinago gallinago</i>	Corn y col., 2005	
		Gaviota reidora	<i>Larus ridibundus</i>	Gronesova y col., 2008	
		Zarapito real	<i>Numenius arquata</i>	Gronesova y col., 2008	
		Combatiente	<i>Philomachus pugnax</i>	Gronesova y col., 2008	
Cuculiformes		Cuco común	<i>Cuculus canorus</i>	Gronesova y col., 2008	
Anseriformes		Oca maorí	<i>Tadorna variegata</i>	Nugent y col., 2011	
Insectos		Dípteros	Moscas comunes	<i>Scatophaga spp.</i>	Fischer y col., 2001
			Moscarda azul	<i>Calliphora vicina</i>	Fischer y col., 2001
			Mosca de golpe	<i>Lucilia caesar</i>	Fischer y col., 2001
	Blatodeos	Cucaracha negra	<i>Blatta orientalis</i>	Fischer y col., 2003a	
Clitelados	Haplotáxidos	Lombrices comunes	<i>Lumbricus spp.</i>	Fischer y col., 2003b	

2. INTRODUCCIÓN

Las cepas de MAP que infectan a estas especies son fundamentalmente cepas bovinas o tipo C, aunque ocasionalmente también se han reportado aislados de MAP de tipo S en ratón, canguros y wallabies (Florou y col., 2008; Cleland y col., 2010). En el caso de las especies no rumiantes las lesiones macroscópicas provocadas por la infección con MAP son poco frecuentes. Por ejemplo, en el conejo se han descrito lesiones macroscópicas de diferente severidad pero no se han descrito signos clínicos de la enfermedad, por lo que se consideran asintomáticos (Greig y col., 1997; Beard y col., 2001). La presencia de MAP en especies silvestres no rumiantes tiene relevancia por el papel que pueden jugar como reservorios para los rumiantes domésticos. Sin embargo, Carta y col. determinaron mediante una revisión bibliográfica de 66 estudios que abarcaban 178 especies, que la prevalencia de MAP en fauna silvestre es de tan solo el 2,41% en Europa y Norte América (Carta y col., 2013). En España, MAP es endémica en ciervo, gamo, jabalí y conejo con prevalencias que oscilan entre el 1.5% en jabalí y el 30% en ciervo (Álvarez y col., 2005; Reyes-García y col., 2008). Recientemente, Varela-Castro y col. han estimado porcentajes de prevalencia de NTM, entre las que se encontraba MAP, del 6,5 % en 108 micromamíferos de 7 especies (Varela-Castro y col., 2020).

2.3.3. Transmisión

La principal ruta de transmisión de MAP en rumiantes domésticos, es la vía fecal-oral a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados con restos fecales de animales infectados o al mamar de las ubres contaminadas con restos fecales de las madres infectadas (Sweeney, 1996; McAloon y col., 2016).

Otra posible vía de transmisión en rumiantes domésticos, aunque de menor importancia, es la intrauterina o vertical (Whittington & Windsor, 2009). En el ganado vacuno, las infecciones intrauterinas se sitúan entre un 10 y un 50 % de la descendencia en función del curso subclínico o clínico de la infección en las madres, respectivamente (Sweeney, 1996). De hecho, en animales con presencia de signos clínicos podría llegar a nacer infectada entre el 20 y el 60% de la descendencia (Donat y col., 2016). También se ha detectado MAP en el semen de toros infectados, pudiendo suponer otra vía de infección, por lo que no se recomienda el uso de estos animales como reproductores (Glawischnig y col., 2004; Khol y col., 2010; Münster y col., 2013).

Otras vías de transmisión propuestas son: a) vía aerógena (Rowe & Grant, 2006) b) a través de insectos, nematodos y otros vectores (Lloyd y col., 2001; Fischer y col., 2003a, 2003b; Mura y col., 2006), c) por consumo de presas infectadas con MAP o por conductas carroñeras (Fox y col., 2020) y d) a través de saliva. Sorge y col. demostraron la presencia de ácido desoxirribonucleico

(Deoxyribonucleic acid, DNA) de MAP en saliva de vacas infectadas planteando la posibilidad de que la saliva constituya una nueva vía de transmisión de la enfermedad (Sorge y col., 2013).

2.4. Patogenia

La patogenia de la PTB incluye los mecanismos utilizados por MAP para entrar y persistir en el hospedador. Una comprensión en profundidad de estos mecanismos es necesaria para el desarrollo de nuevos métodos de prevención, control y tratamiento de los animales infectados.

2.4.1. Entrada de MAP en el hospedador

Una vez ingerido, MAP llega al rumen, donde se activan las proteínas de unión de fibronectina (Fibronectin attachment protein; FAP), y posteriormente alcanza el íleon. En el íleon, MAP se une a los receptores de fibronectina $\beta 1$ presentes en las células M localizadas en las placas de Peyer (Momotani y col., 1988 Sweeney, 2011).

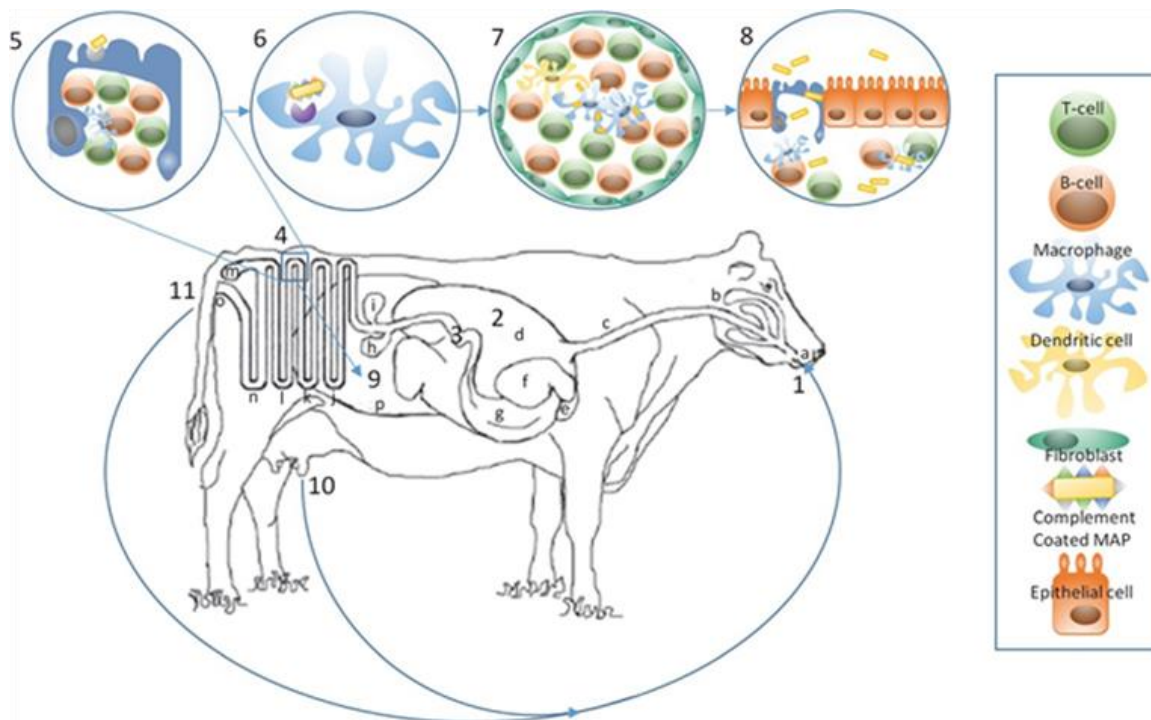


Figura 6. Entrada de MAP por vía oral. Una vez ingerida (1), MAP llega al rumen (2) donde las FAP de MAP se activan y se unen a la fibronectina. MAP avanza hasta llegar al tracto digestivo inferior (3). Una vez en el íleon (4), MAP se une a los receptores de fibronectina presentes en las células M de las placas de Peyer (5). Tras atravesar la pared intestinal, MAP es fagocitada por los macrófagos subepiteliales mediante la unión de los receptores C3 o TLR2 que se unen al ManLAM de la envuelta de MAP (6). MAP puede ser fagocitado por las células dendríticas presentes en el propio epitelio intestinal. Los macrófagos infectados se agregan a otros macrófagos y linfocitos formando los granulomas (7), donde MAP puede persistir durante largos periodos de tiempo. Cuando la inmunidad del hospedador se ve comprometida, MAP escapa de los granulomas (8) pudiendo ser eliminada en leche (10) o en heces (11). (a) boca, (b) glándulas salivares, (c) esófago, (d) rumen, (e) retículo, (f) omaso, (g) abomaso, (h) vesícula biliar, (i) páncreas, (j) duodeno, (k) yeyuno, (l) íleon, (m) ciego, (n) intestino grueso, (o) ano, (p) útero. (Arsenault y col., 2014)

2. INTRODUCCIÓN

La afinidad de MAP por las células M puede explicarse por la gran cantidad de integrinas $\beta 1$ presentes en su superficie, lo que favorecería la formación de los puentes de fibronectina entre las FAP de la bacteria y las integrinas $\beta 1$ de las células M (Secott y col., 2002, 2004). Las células M traslocan la micobacteria en el interior de vacuolas desde la luz intestinal hasta la submucosa, donde es fagocitada por los macrófagos subepiteliales. La captación y el transporte de MAP por las células M es un proceso que ocurre de manera muy rápida, en menos de una hora (Sigurdardóttir y col., 2001). No obstante, el paso de MAP a través de las células M no es exclusivo, ya que se ha descrito que MAP es capaz de atravesar células epiteliales o enterocitos (Bermudez y col., 2010; Ponnusamy y col., 2013).

La fagocitosis de MAP por los macrófagos intestinales se produce por la unión de ManLAM a los receptores de manosa del macrófago, por unión al receptor de complemento 3 de la bacteria previamente opsonizada con complemento-3 (complement 3; C3) y a través del CD14 del receptor tipo Toll 2 (Toll like receptor 2; TLR2) (Pieters, 2001; Weiss y col., 2008). Además de con los macrófagos, MAP también puede interactuar con las células dendríticas en la mucosa y submucosa intestinal mediante la interacción del ManLAM de la envuelta de MAP y el receptor de células dendríticas (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN) (Józefowski y col., 2008).

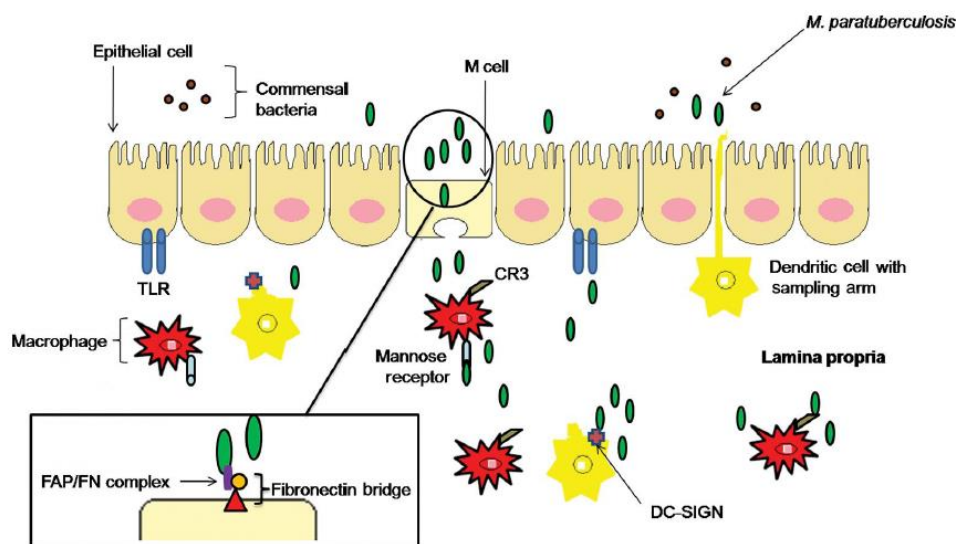


Figura 7. Estrategias de MAP para atravesar la barrera intestinal. MAP invade de manera preferente las células M mediante la formación de puentes de fibronectina, aunque también puede atravesar las células epiteliales. Una vez atravesado el epitelio intestinal, MAP es fagocitada por los macrófagos subepiteliales mediante la unión del ManLAM a los receptores de manosa y por la unión de la bacteria opsonizada con el receptor CR3. MAP también interactúa con las células dendríticas a través de los receptores DC-SIGN, pudiendo ser captada por estas células directamente a nivel del epitelio (Coussens, 2020).

2.4.2. Mecanismos de supervivencia de MAP en los macrófagos del hospedador

Uno de los principales mecanismos de supervivencia de MAP en el interior del macrófago es mediante la prevención de la maduración del fagosoma, su acidificación y su fusión con el lisosoma. Souza y col. demostraron que la incubación de macrófagos bovinos con ManLAM procedente de la envuelta de MAP previo a la infección, inhibe la acidificación del fagosoma, su fusión con el lisosoma y aumenta la supervivencia de MAP a nivel intracelular (Souza y col., 2013). Se ha demostrado que la unión del ManLAM de dos aislados virulentos de MAP al TLR2 de los macrófagos se traducía en la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno P38 (mitogen activated protein kinase; MAPK38). La activación de esta quinasa conduce, a su vez, a la activación de una cascada de factores de transcripción que resultan en una sobreexpresión de la interleuquina 10 (Interleukin 10; IL10) (Weiss & Souza, 2008). La sobreexpresión de IL10 tiene como consecuencia la inhibición de interleuquina 12 (Interleukin 12; IL12), interleuquina 8 (Interleukin 8; IL8), el factor de necrosis tumoral alpha (Tumor necrosis factor alpha; TNF- α) y del complejo mayor de histocompatibilidad (Mayor histocompatibility complex; MHC) lo que se traduce en una atenuación de la respuesta inflamatoria Th1. Estos resultados demostraron que el ManLAM es un factor de virulencia de MAP que facilita su supervivencia en los macrófagos infectados. En una revisión de la bibliográfica realizada recientemente, Ssekitoleko y col., han subrayado que la capacidad de MAP para modular IL10 e IL12 es uno de sus principales factores de virulencia (Ssekitoleko y col., 2021).

MAP es capaz de inhibir la maduración del fagosoma, su acidificación y su fusión con los lisosomas. La maduración de los fagosomas está regulada por dos GTPasas: Rab5, que favorece la fusión de los fagosomas con endosomas tempranos y Rab7, que es responsable de la fusión de los fagosomas con endosomas tardíos y con los lisosomas (Chua y col., 2011). MAP es capaz de inhibir la maduración del fagosoma mediante el bloqueo de la actividad de estas moléculas (Fratti y col., 2001). Por otro lado, la unión del fagosoma con el lisosoma se puede inhibir directamente gracias a los sulfolípidos de MAP, mediante la secreción de la fosfatasa SapM y bloqueando la liberación de la proteína de envuelta que contiene triptófano aspartato (Tryptophan aspartate containing coat protein; TACO) (Ferrari y col., 1999). Además, MAP es capaz de inhibir a acidificación del fagolisosoma mediante la neutralización de la bomba de protones H⁺ATPasa secretando fosfatasa PtpA a la vacuola fagosomal (Sturgill-Koszycki y col., 1994)

La capacidad bactericida del fagolisosoma depende de la producción de moléculas químicas reactivas como las especies reactivas de los intermediarios de oxígeno (Reactive oxygen intermediates; ROI) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales libres de

2. INTRODUCCIÓN

hidroxilo (Karakousis y col., 2004). MAP secreta la enzima superóxido dismutasa que neutraliza los radicales de superóxido. La actividad bactericida también depende de reactivos intermediarios de nitrógeno (Reactive nitrogen intermediates; RNI), entre los que destaca el óxido nítrico. MAP inhibe el reclutamiento de óxido nítrico sintetasa a los fagosomas infectados inhibiendo así la producción de óxido nítrico (Chan y col., 1992; Zhao y col., 1997; Liu y col., 2001).

La inhibición de la apoptosis es otra de las estrategias de supervivencia de MAP. Esta inhibición se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos como la reducción de la expresión de las caspasas 3/7, 8 y 9, el aumento de secreción de IL10 y posterior inhibición de TNF- α , o a través del aumento del calcio citosólico regulado por el ManLAM (Borutaite & Brown, 2003; Koul y col., 2004; Kabara & Coussens, 2012). Además, el ManLAM estimula la fosforilación del promotor de muerte celular asociado a BCL-2 (BCL-2-associated death promoter, Bad) que, una vez fosforilado, es incapaz de unirse a proteínas anti-apoptóticas como la proteína mitocondrial BCL-2 (Nuclear gene encoding mitochondrial protein; BCL-2). Las moléculas libres de BCL-2 impiden la liberación del citocromo c de la mitocondria inhibiendo la apoptosis (Arsenault y col., 2014). En la tabla VI se resumen los mecanismos de supervivencia de MAP en el interior de los macrófagos del hospedador.

Tabla VI. Mecanismos de evasión utilizados por MAP para sobrevivir en el macrófago (Weiss & Souza, 2008)

Mecanismo	Vía celular	Factor	Resultados
Sobre-expresión de IL10	TLR2-MAPK-p38	ManLAM	↓ TNF- α ↓ IL12 ↓ IL8 ↓ MHC-II ↓ Apoptosis ↓ Acidificación del fagosoma ↓ Muerte del MAP
Disminución de la expresión de TNF- α , IL12 e IL8	Mediado por IL10	ManLAM	Atenuación de la respuesta inmune Th1
Disminución de la expresión de MHC-II.	Mediado por IL10	ManLAM	↓ Presentación de antígenos
Disminución de la apoptosis	Mediado por IL10 ↓ TNF- α	ManLAM	↑ Supervivencia celular
↓ Acidificación del fagosoma ↓ Fusión fagosoma-lisosoma	Mediado por IL10 TLR2/MAPK-p38	ManLAM	↑ Supervivencia de MAP

2.4.3. Establecimiento y progresión de la infección

Una vez en el interior del macrófago, MAP se replica en el fagosoma hasta que los recursos son limitantes. En las primeras etapas de la infección, puede inducirse la apoptosis del macrófago

infectado con la consiguiente liberación de MAP al medio extracelular pudiendo ser fagocitado por otros macrófagos cercanos. Sin embargo, MAP ha desarrollado estrategias que le permiten inhibir la apoptosis y persistir en el macrófago infectado durante largos periodos de tiempo durante los cuales se produce un reclutamiento continuo de macrófagos, y linfocitos T y B al punto de infección. A este agregado celular se le denomina granuloma que se rodea de una capa de fibroblastos y colágeno que sellan la estructura (Fig.8) (Saunders & Cooper, 2000).

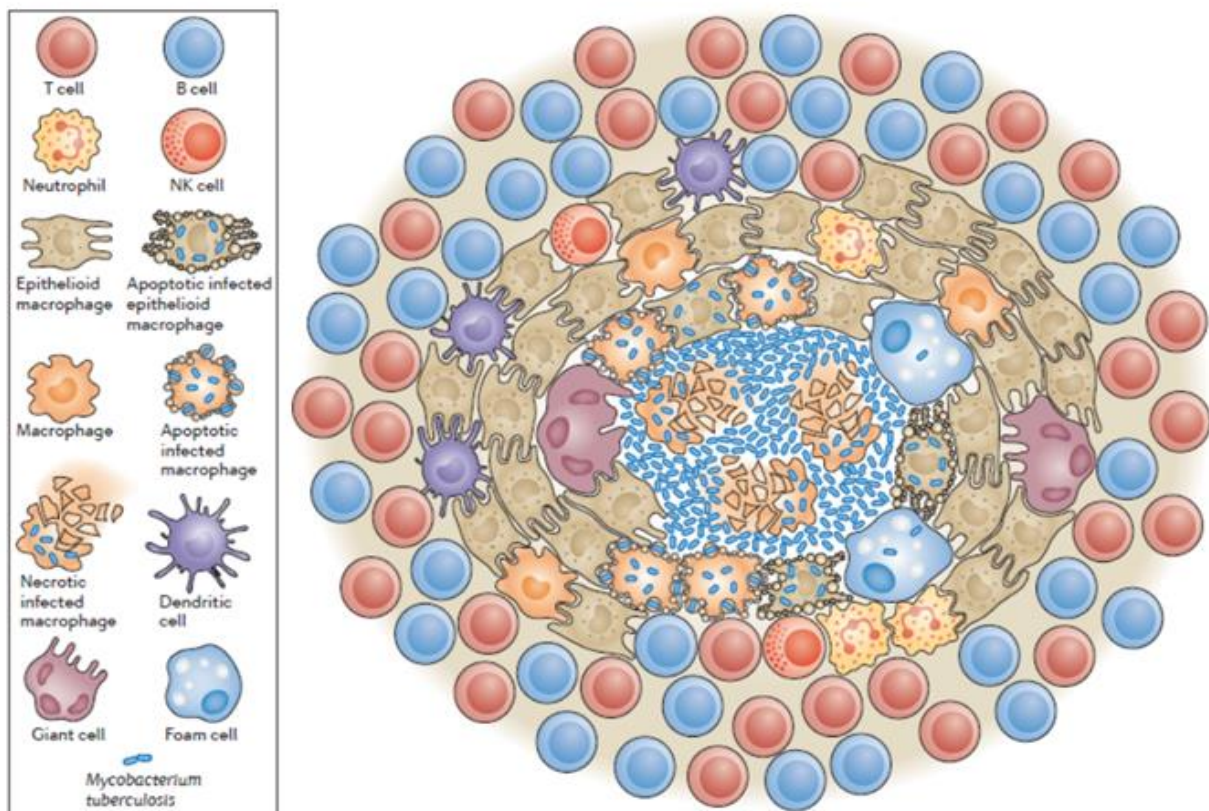


Figura 8. Estructura del granuloma. Los macrófagos del interior del granuloma pueden fusionarse dando lugar a células gigantes multinucleadas o diferenciarse en células epiteioides o espumosas, que se caracterizan por la acumulación de colesterol en su interior. La presencia de bacteria en células gigantes y células espumosas es muy escasa. Generalmente, las micobacterias se observan en las áreas necróticas centrales del granuloma donde también se observan macrófagos muertos y restos celulares. También conforman el granuloma otros tipos celulares como neutrófilos, células dendríticas, linfocitos T y B, células Natural Killer (NK), fibroblastos (Ramakrishnan, 2012)

En el granuloma, los linfocitos T secretan IFN- γ , que se encarga de activar a los macrófagos. Los macrófagos presentes en el granuloma pueden diferenciarse en células epiteioides o en células espumosas, estas últimas con un alto contenido en colesterol. Los macrófagos pueden fusionarse para dar lugar a células gigantes o células de Langhans presentando un aspecto multinucleado (Fitzgerald y col., 2014).

2. INTRODUCCIÓN

El granuloma puede considerarse como una estrategia del hospedador para la contención de MAP y evitar su diseminación, pero hay que tener en cuenta que con esta estrategia el hospedador no es capaz de eliminar la bacteria (Guirado & Schlesinger, 2013) . De hecho, MAP puede permanecer en el interior del granuloma durante años e incluso décadas. Aunque no se sabe muy bien cuál es la causa, agentes estresantes como el parto, o la propia genética del hospedador en algunos animales en estadios avanzados de la infección MAP, la bacteria sale del granuloma e infecta zonas cercanas de tejido intestinal (Sandor y col., 2003; Sivakumar y col., 2005). La infección también puede diseminarse a los linfonodos supramamarios y a las glándulas mamarias contaminando así leche y calostro (Sweeney y col., 1992).

2.5. Respuesta inmune del hospedador

2.5.1. Respuesta inmune anti-inflamatoria inducida en los macrófagos infectados

MAP es capaz de evadir la respuesta inmune pro-inflamatoria al inhibir la activación de los macrófagos infectados, la apoptosis y la presentación de antígenos a los linfocitos T.

2.5.1.1. Inhibición de la activación de macrófagos infectados

El mecanismo de entrada de MAP en el macrófago determina la respuesta de éste incluso antes de que MAP se encuentre en el interior de la célula. La unión del ManLAM de MAP al receptor TLR-2 del macrófago inicia una cadena de activación celular mediante la que se activa la proteína quinasa MAPK-p38. La activación de esta quinasa se traduce en la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL10 y factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor β , TGF- β). La IL10 inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL12, IL8 e IL18 IFN- γ y el TNF- α lo que facilita la supervivencia de MAP en el interior del macrófago infectado. La IL10, además, inhibe la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos en los macrófagos (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) y bloquea la acidificación del fagosoma que contiene la bacteria y su fusión con el lisosoma (Weiss & Souza, 2008).

2.5.1.2. Inhibición de la apoptosis

El ManLAM de MAP puede inhibir la apoptosis del macrófago mediante el aumento de los niveles de calcio intracelular (Koul y col., 2004). El aumento del calcio intracelular genera un incremento de la permeabilidad de la membrana de la mitocondria que conduce a la liberación de moléculas pro-apoptóticas, como el citocromo c, al exterior de la célula reduciendo las posibilidades de apoptosis del macrófago. El ManLAM de MAP también inhibe la apoptosis directamente estimulando la fosforilación de la proteína Bad. La fosforilación de esta proteína

impide su unión a las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y BCL-XL. Debido a esto, moléculas libres de BCL2 pueden inhibir la liberación del citocromo c de la mitocondria y por tanto, se impide la apoptosis del macrófago (Koul y col., 2004). Otro mecanismo mediante el cual MAP es capaz de inhibir la apoptosis es mediante la inhibición de la producción de TNF- α (Koul y col., 2004).

2.5.1.3. Inhibición de la presentación de antígenos a los linfocitos T

Los macrófagos infectados por cepas virulentas de MAP presentan en tan solo 12-24h tras la fagocitosis, un menor número de moléculas del MHC II en su superficie que los macrófagos infectados con cepas avirulentas o con *Mycobacterium avium* (Weiss & Souza, 2008). La presentación de los antígenos de MAP a los linfocitos T también está inhibida por la inactivación por parte de MAP de las proteínas fagosomales responsables de la degradación de antígenos a péptidos, como es el caso de la catepsina D (Gomes, 1999). Además, la IL10 también disminuye la presentación de antígenos de MAP a las células T al inhibir la producción del MHC II, CD80, CD86 y la molécula de adhesión intracelular 1 (intracelular adhesión molecule 1; ICAM1) en la membrana celular del macrófago infectado (Alzuherri y col., 1996)

2.5.2. Respuesta inmune celular

Durante la infección, se produce el reclutamiento celular de linfocitos T y B y otros macrófagos al sitio de la infección para dar lugar a las características lesiones granulomatosas que aparecen en los tejidos de animales infectados. Es esta respuesta pro-inflamatoria exacerbada y prolongada a lo largo del tiempo la que, en lugar de contener la infección, provoca la destrucción progresiva del epitelio intestinal. Los linfocitos T reclutados al sitio de la infección, secretan IFN- γ , que se encarga de activar a los macrófagos. Cuando los macrófagos infectados se activan, lo primero que se produce es una presentación de antígenos de MAP por parte del MHC II en la superficie del macrófago y la producción de IL12 y TNF- α (Stabel, 2000). El IFN- γ es responsable del reclutamiento de macrófagos al sitio de infección (Stabel, 2006). Por otro lado, se ha observado un aumento del número de linfocitos $\gamma\delta$ en la mucosa intestinal durante la infección con MAP y se ha sugerido que esta subpoblación de linfocitos podría modular la respuesta de macrófagos durante la infección (Baquero & Plattner, 2015, 2017). Por otro lado, el TNF- α también se considera una citoquina clave en la formación de granulomas y la activación de macrófagos (Fernández y col., 2017).

2.5.3. Respuesta inmune humoral

El reclutamiento continuado de macrófagos y linfocitos al sitio de infección genera una respuesta pro-inflamatoria en los animales que, si progresa a lo largo del tiempo, puede llegar ser

2. INTRODUCCIÓN

perjudicial a nivel local causando excesivo daño tisular y graves lesiones granulomatosas en la pared intestinal. Aunque no se sabe muy bien la causa que provoca el cambio de una respuesta inmune Th1 a una Th2, lo cierto es que en animales en estadios avanzados de la infección y con clínica de PTB se ha observado inducción de citoquinas antiinflamatorias, fundamentalmente la IL10 pero también IL4, IL5 e IL6, que al sobre-expresarse contribuyen a la reducción de IL12 e IFN- γ producidos por los linfocitos CD4 Th1 (Peleman y col., 1989; Khalifeh & Stabel, 2004). Ito y col., demostraron el poder inhibitorio de la IL10 sobre el IFN- γ , al inhibir el gen IP-10 necesario para su secreción (Ito y col., 1999). El cambio de una respuesta Th1 a una Th2 contribuye a la diseminación de las micobacterias a otras zonas de tejido en las fases avanzadas de la infección. La inhibición de la respuesta pro-inflamatoria Th1 y el cambio a una inmunidad de tipo Th2 se relaciona con la fase clínica de la PTB y con la estimulación de la producción de anticuerpos de tipo IgG1 por parte de las células B y, por tanto, con una inmunidad de tipo humoral. Sin embargo, cuando la producción de anticuerpos tiene lugar, la inflamación y daño tisular son ya muy evidentes y difícilmente controlables.

Varios estudios han demostrado que la expresión de IL10, IL4 y TGF- β aumenta en íleon y en ganglios linfáticos asociados de vacas con lesiones severas de PTB (Khalifeh & Stabel, 2004). El TGF- β tiene un efecto inmunomodulador y la capacidad de inhibir la secreción de IL2, pero también es capaz de inhibir la producción de IFN- γ (Khalifeh & Stabel, 2004). La secreción de TGF- β estaría relacionada por tanto con la incapacidad de los macrófagos para contener la infección y la diseminación de MAP probablemente a través de una inhibición del IFN- γ (Jenvey y col., 2019). Este efecto inmunomodulador inhibe la respuesta Th1 y trata de limitar el daño tisular provocado por la acción pro-inflamatoria característica de las citoquinas de la respuesta Th1, del reclutamiento celular y de un aumento cada vez mayor del tamaño y número de granulomas en el tejido afectado. Sin embargo, llegado este momento, la infección se ha diseminado ya a otras regiones y no se puede contener. En la figura 9 se puede observar un esquema de la respuesta inmune del hospedador que tiene lugar durante la infección con MAP.

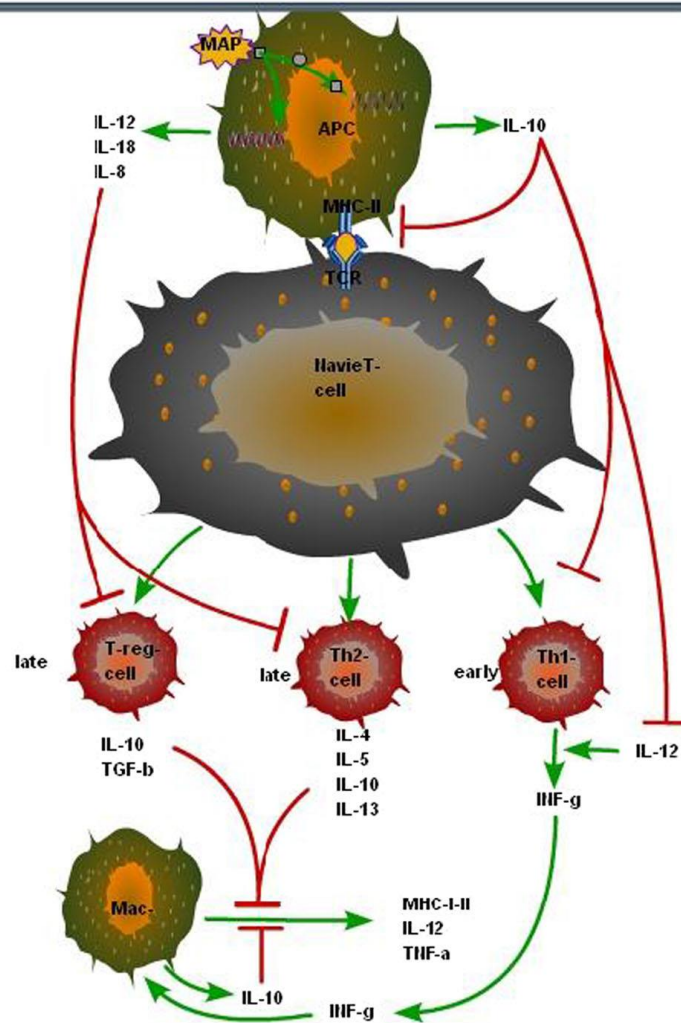


Figura 9. Esquema de la respuesta inmune Th1 y Th2 que tiene lugar tras la infección con MAP. En la infección por MAP, los linfocitos Th1 secretan IFN- γ y promueven la activación de los macrófagos y el reclutamiento de nuevos macrófagos al sitio de infección. Cuando la infección progresa a fases más severas, predominan los linfocitos Th2 que secretan citoquinas antiinflamatorias como IL4, IL5, IL10, IL13 y TGF- β . Estas citoquinas antiinflamatorias promueven la respuesta humoral mediada por anticuerpos (Hussain y col., 2016)

2.6. Cuadro lesional y signos clínicos

2.6.1. Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas asociadas a la PTB se localizan fundamentalmente en los tramos distales del intestino delgado: íleon, ICV y en los linfonodos mesentéricos, aunque también es posible observar lesiones en los tramos distales del yeyuno, en el ciego o en los segmentos más craneales del colon (Corpa y col., 2000). Macroscópicamente, el engrosamiento de la pared intestinal del íleon es característico de la enfermedad en la especie bovina. Tras seccionar longitudinalmente los tramos distales del intestino se puede observar en la mucosa tumefacta y edematosa el relieve de unos pliegues de aspecto circunvolvoide que persisten incluso tras traccionar

2. INTRODUCCIÓN

el intestino (Fig 10). Los linfonodos mesentéricos, especialmente yeyunales e ileocecales, aparecen aumentados de tamaño y presentan edema y tumefacción.

En la infección subclínica, el engrosamiento del intestino es menos evidente y los ganglios linfáticos pueden estar ligeramente tumefactos. Cuando la infección se hace más severa, el engrosamiento puede extenderse a zonas más distales del intestino como el duodeno y el recto. Es característica la pérdida de grasa subcutánea y mesentérica, la atrofia muscular y serosa y la presencia de edema subcutáneo, submandibular o ventral. También es frecuente la ascitis y acumulación de líquido en la cavidad torácica y en pericardio (Fecteau, 2020). Como consecuencia de la diseminación bacteriana que ocurre en la fase clínica de la enfermedad se han descrito daños extra intestinales como la atrofia de la grasa de los surcos coronarios y calcificaciones y fibrosis en aorta y endocardio, así como la depleción linfoide del timo (Perez y col., 2000; González y col., 2005). En la enfermedad clínica avanzada pueden observarse microgranulomas en el intersticio hepático. En animales en estado de caquexia y debilidad extrema, se pueden llegar a observar lesiones compatibles con enfisema pulmonar intersticial agudo (Perez y col., 2000). Es frecuente observar tumefacción de la mucosa intestinal, linfangitis y linfangiectasia. Los vasos linfáticos dilatados e inflamados presentan el aspecto de cordones blanquecinos de trayecto sinuoso en la serosa intestinal (Fecteau, 2020).

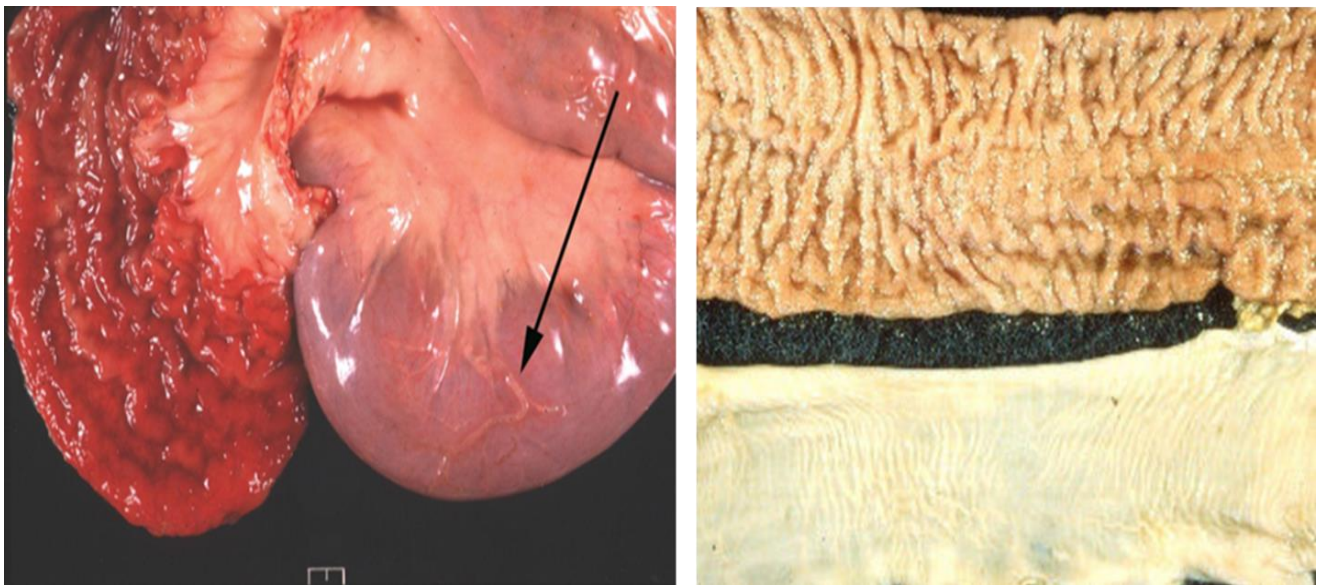


Figura 10. Lesiones macroscópicas de PTB en íleon bovino. A la derecha se aprecia el edema mesentérico y canal linfático mesentérico dilatado (señalado con flecha). A la derecha, en la parte superior, pliegues de aspecto circunvolvoide que persisten tras traccionar el intestino (MT Collins)

2.6.2. Lesiones microscópicas

A nivel histológico, es característica una enteritis y/o linfadenitis granulomatosa de la lámina propia de la mucosa intestinal y de los ganglios linfáticos mesentéricos asociados. El infiltrado inflamatorio está formado por macrófagos, linfocitos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas de Langhans. Tanto en el intestino como en los nódulos linfáticos mesentéricos asociados, la distribución de este infiltrado es variable en función de la severidad de las lesiones. En animales sin presencia de signos clínicos, las lesiones microscópicas se restringen a pequeños granulomas ubicados en el espacio interfolicular de las placas de Peyer o al área cortical y paracortical de los ganglios linfáticos mesentéricos, normalmente en la zona interfolicular y próxima a los senos peritrabeculares. En animales con enfermedad clínica y presencia de signos clínicos evidentes, la inflamación se extiende de manera difusa por la mucosa, observándose afectación de las capas más profundas de la pared intestinal, como la submucosa y la muscular. Como consecuencia de la extensión de la inflamación se produce la dilatación de las vellosidades intestinales, pudiendo llegar a fusionarse y atrofiarse si el infiltrado es abundante, alterando la arquitectura normal del intestino. El aumento del número de granulomas y su extensión en los ganglios linfáticos mesentéricos y hacia la zona medular, también altera la estructura de la pared intestinal. Además de un aumento de la inflamación, se observa un mayor número de bacilos ácido alcohol resistentes (Acid fast bacilli; AFB) cuando se emplea la tinción ZN. Las lesiones microscópicas se clasifican en focales, multifocales y difusas atendiendo a su extensión y severidad (González y col., 2005). Atendiendo a la composición del infiltrado inflamatorio y cantidad de AFB, las lesiones difusas se subdividen, a su vez, en 3 subcategorías: linfocíticas o paucibacilares, intermedias y multibacilares. En la figura 10 se muestran las diferentes lesiones asociadas a la PTB.

Lesiones focales: Se caracterizan por la presencia de pequeños granulomas bien delimitados, localizados en las fosas interfoliculares de las placas de Peyer y, más frecuentemente, en la corteza de los linfonodos mesentéricos fundamentalmente en los linfonodos ileal y yeyunal. Los granulomas son de pequeño tamaño y están constituidos por un pequeño número de macrófagos (5-30) junto con algunos linfocitos y células de Langhans. Ausencia o escaso número de AFB.

Lesiones multifocales: Leve aumento del número y el tamaño de los granulomas que suelen afectar al ápice de las vellosidades intestinales generando un moderado engrosamiento de las mismas. La mayor parte de los segmentos intestinales no presentan variaciones morfológicas. Los granulomas están formados por un mayor número de macrófagos (15-40) o células de Langhans, rodeados de un infiltrado linfocítico. Presencia moderada de AFB.

2. INTRODUCCIÓN

Lesiones difusas: Se aprecia un importante engrosamiento de amplios tramos de la pared intestinal, el íleon y en menor medida el yeyuno que afectan tanto a áreas de mucosa asociadas a tejido linfoide organizado como a tramos no relacionados con las placas de Peyer. Tanto en los ganglios linfáticos mesentéricos como en el intestino se observa pérdida de la arquitectura histológica normal. Existen 3 subtipos de lesiones difusas:

Lesiones difusas linfocíticas o paucibacilares: El infiltrado presenta un alto número de linfocitos, con algunas células plasmáticas y células de Langhans. Ausencia o bajo número de AFB.

Lesiones difusas intermedias: El infiltrado presenta linfocitos, células plasmáticas, células de Langhans y macrófagos, bien aislados o bien formando granulomas. El número de AFB presente es variable pero siempre menor que en el caso de las lesiones multibacilares.

Lesiones difusas multibacilares: Presencia de un alto número de macrófagos con una gran carga intracelular de AFB y abundantes células espumosas que generan un infiltrado difuso de la lámina propia del intestino. Las vellosidades intestinales suele aparecer fusionadas y las glándulas intestinales muy separadas debido al infiltrado inflamatorio (González y col., 2005).

No está claro si estas diferentes formas histopatológicas representan estadios secuenciales o divergentes de la PTB (González y col., 2005). Begg y col., observaron, en su estudio longitudinal, que no todos los animales infectados desarrollan formas clínicas de la enfermedad siendo algunos capaces de eliminar la infección (Begg y col., 2018).

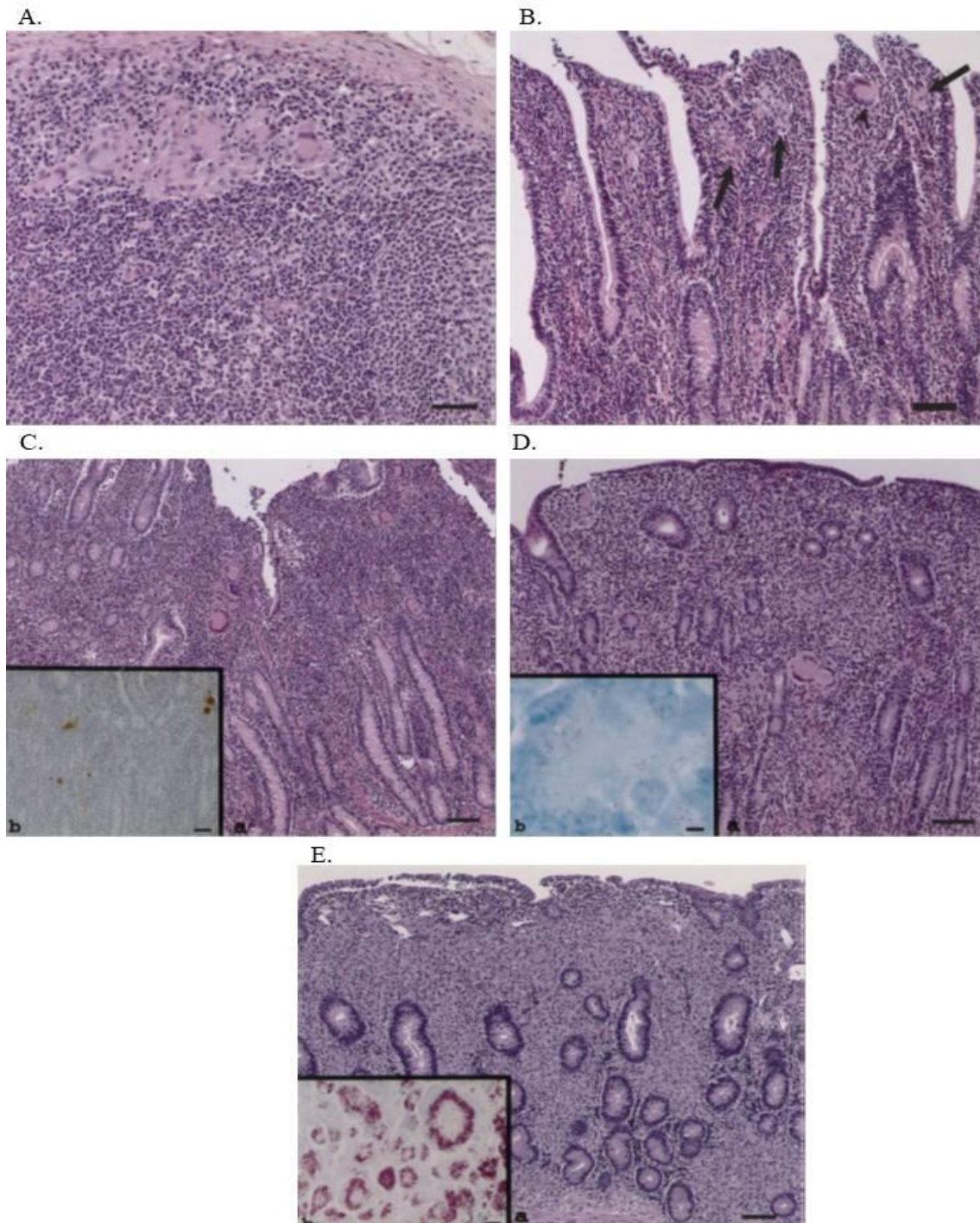


Figura 11. Lesiones microscópicas asociadas a la PTB bovina. (A) Lesión focal. Pequeños granulomas formados por macrófagos y células gigantes localizados en la corteza del ganglio linfático ileal. Tinción hematoxilina- eosina (Hematoxylin eosin; HE). Bar, 50 μ m (B) Lesiones multifocales en íleon. Macrófagos y células gigantes rodeados de linfocitos en el ápice de vellosidades intestinales. Tinción HE. Bar, 80 μ m. (C) Lesión difusa linfocítica en íleon. Marcado engrosamiento de la mucosa intestinal por la presencia de infiltrado formado fundamentalmente por linfocitos. También se observan algunos macrófagos y células gigantes aisladas. Tinción HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro se muestra la detección por inmunohistoquímica de macrófagos y células gigantes; anti-lisozima. Bar, 60 μ m. (D) Lesión difusa intermedia en íleon. Atrofia de las vellosidades intestinales y separación de las glándulas a causa de la presencia de infiltrado rico en linfocitos y macrófagos. Tinción HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro se observan AFB presentes en el interior de células gigantes. Tinción ZN. Bar, 6 μ m. (E) Lesión difusa multibacilar en yeyuno. Infiltrado inflamatorio en yeyuno formado fundamentalmente por macrófagos provocando fusión de las vellosidades y separación de las glándulas intestinales. Tinción HE. Bar, 100 μ m. En el recuadro se observa con más detalle el infiltrado pudiendo observarse células de Langhans con gran cantidad de AFB en su interior. Tinción ZN. Bar, 10 μ m. (González y col., 2005)

2. INTRODUCCIÓN

2.6.3. Signos clínicos

Los signos clínicos de la PTB son inespecíficos. Las formas en las que se presenta la enfermedad se han dividido de acuerdo a la presencia o ausencia de signos clínicos, y a la severidad de los mismos en silente, subclínica, clínica y clínica avanzada.

Forma silente. Los animales no manifiestan signos clínicos y es característica de terneras y novillas, aunque, ocasionalmente, también se ha descrito en ganado adulto (Fecteau, 2020).

Forma subclínica. La mayoría de los animales presentan niveles bajos y no detectables de MAP en las heces. Además, puede apreciarse una cierta disminución en la producción láctea, de la eficacia reproductiva y una mayor predisposición al desarrollo de mastitis en comparación con animales no infectados (Fecteau, 2020).

Forma clínica. Suele aparecer tras varios años de infección por MAP. En vacuno lechero los signos clínicos suelen aparecer entre los 2 y los 6 años tras la infección, normalmente tras el parto, en la primera o segunda lactación de las hembras. Los signos clínicos característicos son la pérdida de peso progresiva, diarrea y la disminución de la producción láctea (Fecteau, 2020).

Forma clínica avanzada. El paso de la forma clínica a la clínica avanzada puede darse de manera muy rápida, en tan solo unas semanas, entrando los animales en un estado de letargo, debilidad y emaciación. Es característica de esta fase la presencia de edema submandibular por la hipoproteinememia derivada de la malabsorción, además de la presencia de diarrea profusa y caquexia (Figura 12). Es posible que el animal muera a causa de la deshidratación y la caquexia que tiene lugar, aunque lo más frecuente es que el animal sea sacrificado antes, debido a la reducción de la producción láctea y a la pérdida de peso que tienen lugar (Fecteau, 2020).



Figura 12. Vacas frisonas en estadios avanzados de la PTB. Se observa una marcada pérdida de peso y reducción de la masa muscular (izquierda), así como edema submandibular (derecha) (MT Collins).

En los rebaños de bovino infectados se suele observar una baja proporción de animales con signos clínicos, en torno al 1-10% (Merkal y col., 1975; Sherman, 1985). De hecho, por cada animal con signos clínicos, puede haber 25 animales subclínicos en el rebaño (Whitlock & Buergelt, 1996).

2.7. Diagnóstico

La observación de lesiones macroscópicas y signos clínicos típicos de la PTB como la pérdida de peso o la diarrea, es la forma clásica de establecer un diagnóstico a nivel de rebaño pero resulta insuficiente para detectar animales con infección subclínica. La confirmación del diagnóstico de PTB en animales con signos clínicos se realiza mediante test serológicos e inmunológicos (métodos indirectos) y mediante la detección de MAP en las heces por microscopia, cultivo bacteriológico o PCR (métodos directos). Otros métodos indirectos, además del ELISA, serían el AGID, el test de fijación del complemento (Complement fixation; CF) y el test de liberación de IFN- γ . También se puede realizar un diagnóstico postmortem mediante la detección de las lesiones características de la enfermedad en muestras de intestino y lifonodos asociados, con la demostración de la presencia de AFB en cortes de las lesiones o mediante cultivo y PCR de muestras de tejido. Para la detección de las formas subclínicas, se debe recurrir a técnicas de detección de la respuesta celular como el test de liberación del IFN- γ o la prueba de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado, ya que en estos casos, tanto los anticuerpos producidos por el hospedador como la carga bacteriana son difícilmente detectables por los métodos anteriormente descritos. La prueba serológica más utilizada habitualmente para el diagnóstico de PTB en el ganado bovino es el ELISA.

La elección del test diagnóstico en cada caso viene determinada por los recursos económicos y el grado de sensibilidad y especificidad requerido para la detección de MAP, y si se va a realizar a nivel individual o de rebaño. En el caso del diagnóstico a nivel de rebaño, las técnicas de diagnóstico de elección son el ELISA y la PCR fecal y de tanque. La recomendación de la OIE es la repetición de muestreos mediante ELISA y PCR fecal durante varios años (OIE, 2018). En la tabla VII se muestra la capacidad de detección de MAP de los diferentes test diagnósticos en función de la presencia o ausencia de signos clínicos.

2. INTRODUCCIÓN

Tabla VII. Potencial de los test diagnósticos para la detección de MAP en función de la presencia o ausencia de signos clínicos asociados a la PTB. Adaptado de Abendaño, 2016.

Test diagnóstico	Enfermedad silente	Casos subclínicos	Casos clínicos y clínicos avanzados
Observación de signos clínicos	No	No	Sí
Cultivo bacteriológico	No	Ocasionalmente	Sí
PCR	No	Ocasionalmente	Sí
Tinción Ziehl Nielsen	No	Ocasionalmente	Sí
IFN- γ	Ocasionalmente	Sí	Ocasionalmente
ELISA	No	Ocasionalmente	Sí
Análisis histológico	No	Ocasionalmente	Sí

2.7.1. Métodos directos de detección del patógeno

2.7.1.1. Histopatología

Consiste en el examen por microscopía de cortes de la mucosa intestinal y de los ganglios linfáticos para la detección de las lesiones características así como para comprobación de la presencia de AFB mediante tinción ZN. Es, por lo tanto, necesario recoger múltiples muestras de la pared intestinal y de los ganglios linfáticos mesentéricos en formol al 10% que son posteriormente procesados para llevar a cabo el examen histológico.

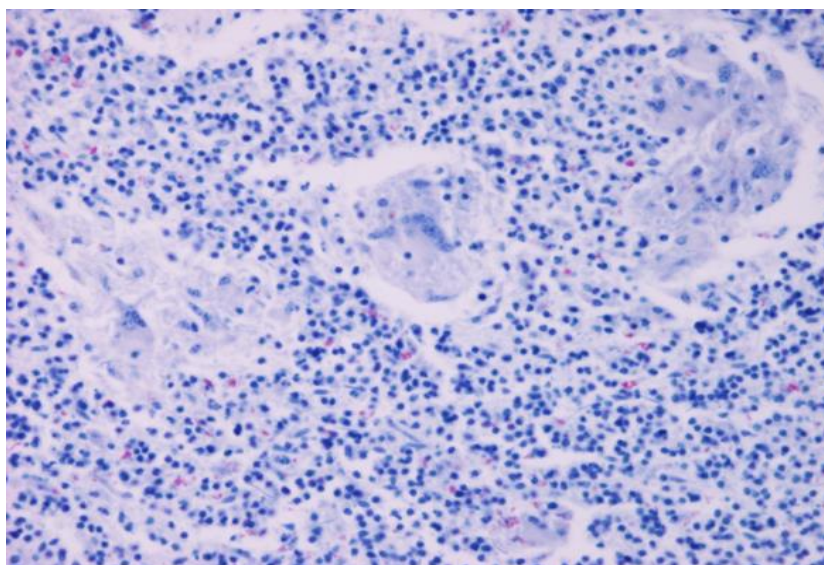


Figura 13. Tinción ZN de tejido intestinal de un animal con lesiones difusas multibacilares. MAP se tiñe de un color rosado intenso en contraste con el resto de la preparación que se observa en tonos azules (Vázquez, 2014a)

2.7.1.1. Bacteriología (microscopía)

Consiste en el examen por microscopía de muestras fecales o de frotis de la mucosa afectada y cortes superficiales de los ganglios linfáticos para comprobar la presencia de AFB con la morfología característica de MAP mediante tinción ZN. No obstante, no se puede olvidar que los AFB no están presentes en todos los casos. De acuerdo a la OIE (2018): "Se puede diagnosticar la PTB de modo preliminar si se encuentran agregados (tres o más microorganismos) de AFB pequeños (0,5–1,5 μm) y fuertemente teñidos. La presencia de AFB aislados en ausencia de

agregados sería un resultado dudoso”. La desventaja de esta prueba es que no permite la diferenciación con otras especies de micobacterias y sólo en una pequeña proporción de casos se puede establecer un diagnóstico positivo mediante el examen microscópico de una muestra fecal única (OIE, 2018).

2.7.1.2. Bacteriología (cultivo)

El cultivo bacteriológico de muestras de heces se considera la técnica de referencia para el diagnóstico de la PTB en animales vivos. Un resultado positivo a cultivo proporciona información que ningún otro test diagnóstico puede aportar: la presencia de bacteria viva y viable en la muestra. Aunque el cultivo es técnicamente difícil y su realización requiere tiempo es capaz de detectar el 70% de los casos con presencia de signos clínicos de PTB frente a 23-29% de animales infectados sin signos clínicos (Nielsen & Toft, 2008). Como contrapartida, presenta los inconvenientes del coste económico y del tiempo necesario para obtener resultados (18 a 20 semanas para confirmar un resultado negativo). El cultivo de MAP se realiza normalmente en medios 7H9 y Herrold suplementados con OADC y micobactina. (Whittington, 2020). En los últimos años, la aparición de sistemas de cultivo líquido automatizado ha permitido reducir los tiempos de detección (4-7 semanas). Sin embargo, es necesaria la confirmación mediante técnicas moleculares tras el aislamiento bacteriológico (Whittington, 2020).

2.7.1.3. PCR

La PCR es una técnica rápida que permite la detección de DNA de MAP en diferentes tipos de muestras (heces, tejido, leche, sangre y muestras ambientales). La PCR puede ir dirigida a diferentes dianas genéticas de MAP siendo las más frecuentes la IS900 (Collins y col., 1989) y la f57 (Vansnick y col., 2004). El uso de genes que se encuentran en una sola copia en el genoma de MAP, como es el caso de la secuencia f57, ha permitido el desarrollo de PCRs cuantitativas (Quantitative PCR; qPCR) que permiten determinar el número de copias de genoma de MAP para cada muestra. La sensibilidad de la PCR en animales infectados es del 91-100% con un límite de detección de 10^3 unidades formadoras de colonias (Colony forming unit; CFU) (Khare y col., 2004). La sensibilidad de la PCR en animales subclínicos es comparable a la del cultivo bacteriológico (Heuvelink y col., 2017).

2.7.2. Métodos indirectos

2.7.2.1. ELISA

El ELISA es una técnica indirecta de diagnóstico de la PTB que detecta anticuerpos anti-MAP en muestras de plasma o suero, aunque también se han desarrollado ELISAs para la detección

2. INTRODUCCIÓN

de anticuerpos anti-MAP en muestras de leche (Nielsen & Toft, 2008). Es una técnica rápida y barata, por lo que su uso está muy extendido. La sensibilidad del ELISA es comparable a la de la prueba de CF en los casos clínicos, pero mayor a la de la CF en portadores asintomáticos. En el ganado bovino la sensibilidad del ELISA se sitúa entre 50-87% en el caso de los animales con signos clínicos, en torno al 24-94% en los animales excretores de MAP pero sin presencia de signos clínicos y en el 7-22% en los animales con enfermedad silente. Mediante el ELISA se detecta en torno al 30–40% del ganado bovino identificado como infectado mediante el cultivo de heces en medios sólidos (Whitlock y col., 2000). De manera parecida a lo que ocurre con el cultivo bacteriológico, la sensibilidad del ELISA depende del nivel de excreción de MAP en las heces y de la edad del animal. Un estudio llevado a cabo en Australia demostró que la sensibilidad real del ELISA en el ganado bovino de 2-, 3- y 4- años de edad fue del 1,2%, 8,9% y 11,6%, respectivamente, pero permaneció entre el 20 y 30% en los grupos de más edad (Jubb y col., 2004). Se ha calculado que, de manera global, la sensibilidad real de ELISA para todos los grupos de edad es de un 15% (Whitlock y col., 2000; Jubb y col., 2004). La especificidad, entre el 40 y el 100 %, puede verse reducida por la presencia de otras micobacterias ambientales frente a las que el animal también produce anticuerpos. Sin embargo, este problema se ha solucionado con la adición de una etapa de absorción en la que los sueros analizados se diluyen en un tampón con antígeno soluble de *Mycobacterium phlei*. De esta manera se eliminan los anticuerpos que provocan reacciones cruzadas inespecíficas (Milner y col., 1987). Hay que tener en cuenta también, que el resultado positivo de una muestra a ELISA no implica necesariamente la presencia de infección, sino de exposición al patógeno y desarrollo de respuesta inmune.

2.7.2.2. CF

La técnica de CF es una prueba inmunológica que se puede usar para detectar la presencia de anticuerpos anti-MAP en muestras de suero en función de si se produce la fijación del complemento. La CF funciona bien en animales con signos clínicos, pero no tiene suficiente especificidad en la población general con fines de control (OIE, 2018).

2.7.2.3. AGID

La AGID es útil para la confirmación de la enfermedad en ganado bovino, ovino o caprino con enfermedad clínica. Esta técnica ofrece una sensibilidad y una especificidad ligeramente más altas que las obtenidas con los ELISA (Gwozdz y col., 2000; Sergeant y col., 2003). La especificidad y la sensibilidad observadas con la AGID medidas respecto a los resultados de la histología fueron del 99–100% (IC del 95%) y del 38–56% (IC del 95%), respectivamente (Hope y col., 2000). La recomendación de la OIE es la utilización del AGID en ganado ovino y caprino

(OIE, 2018). En la tabla VIII, se muestra un resumen de las técnicas de diagnóstico de la PTB y su uso en función de los objetivos perseguidos.

Tabla VIII. Test diagnósticos de la PTB en función de su objetivo (OIE, 2018) .

Método	Objetivo					
	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	Estado inmunológico de animales o rebaños después de la vacunación
Identificación del agente¹						
Histopatología*	+	-	+	+++	-	-
ZN de heces	-	-	-	+	-	-
Cultivo	-	+	+	+++	+	-
PCR	+++	+++	+	++	+	-
Detección de la respuesta inmune²						
AGID**	++	+	+	++	+++	+++
ELISA	+++	+++	+++	+	+++	+++
Ensayo IFN- γ	-	-	+	-	-	+++
DTH	-	-	+	-	-	+++

+++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; - = no adecuado para este propósito; * = solo puede utilizarse post-mortem; ** = apropiado para ser utilizado en ovejas y cabras. Prueba de hipersensibilidad retardada (Delayed-type hypersensitivity; DTH)

1 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica. 2 Se recomienda una combinación de pruebas serológicas de la lista

2.7.3. Nuevas técnicas diagnósticas

El estudio de la expresión génica y el perfil proteico en sangre, tejido y macrófagos de animales infectados por MAP supone una prometedora fuente de biomarcadores con aplicaciones diagnósticas. Los biomarcadores detectados pueden abarcar todo el espectro de la enfermedad, desde las manifestaciones más tempranas hasta las más severas pudiendo ser utilizados para la predicción, el diagnóstico y el pronóstico de la misma (van den Esker & Koets, 2019). Las nuevas tecnologías “ómicas” como la secuenciación de RNA (RNA sequencing; RNA-Seq) o la proteómica permiten realizar un estudio de la enfermedad a un nivel celular y molecular global. En lo referente a la PTB, se han llevado a cabo estudios de RNA-Seq en tejido intestinal (Hempel y col., 2016;

2. INTRODUCCIÓN

Liang y col., 2016), en macrófagos infectados (Casey y col., 2015; Marino y col., 2017; Gupta y col., 2019; Ariel y col., 2020; Bao y col., 2022), en sangre (Malvisi y col., 2020), a nivel de las glándulas salivares de animales infectados por MAP (Mallikarjunappa y col., 2018a) y en placas de Peyer (Facciuolo y col., 2020). Recientemente, Ibeagha-Awemu y col., han llevado a cabo un estudio transcriptómico que analiza la expresión diferencial de genes en diferentes puntos del intestino (yeyuno e íleon) así como en los linfonodos mesentéricos de animales infectados y controles (Ibeagha-Awemu y col., 2021) (Tabla IX). En el caso de la PTB, algunos estudios han propuesto ciertos biomarcadores como posibles alternativas al IFN- γ para el diagnóstico de animales subclínicos como algunos microRNAs, proteínas citoquinas (You y col., 2012; De Buck y col., 2014; Shaughnessy y col., 2020) (Tabla X).

Tabla IX: Análisis de RNA-Seq llevados a cabo en diferentes muestras de ganado bovino

Muestra	Condición	N	Referencia
ICV	Control	5	Hempel y col., 2016
	Subclínico	5	
	Clínico	5	
	Infectado	5	Liang y col., 2016
	No infectado	5	
Macrófagos	Control	7	Casey y col., 2015
	2h post-infección	7	
	6h post-infección	7	
	Control	68	Marino y col., 2017
	2h post-infección	68	
	6h post-infección	68	
	24h post-infección	68	
	Control	3	Gupta y col., 2019
	6h post-infección	3	
	Infectado	6	Ariel y col., 2020
No infectado	6		
Control	6	Bao y col., 2022	
6h post-infección	6		
Glándulas salivares	Infectado	18	Mallikarjunappa y col., 2018
	No infectado	6	
Sangre	Infectado	5	Malvisi y col., 2020
	No infectado	5	
Placas de Peyer	Infectado	10	Facciuolo y col., 2020
	No infectado	5	
Yeyuno e íleon	Infectado	4	Ibeagha-Awemu y col., 2021
	No infectado	3	

Tabla X. Biomarcadores inmunológicos, genéticos y proteicos desregulados en respuesta a la infección por MAP. Adaptado de (Wright y col., 2020)

Tipo de biomarcador	Muestra		Biomarcadores	Referencias
Marcadores inmunológicos	Tejido intestinal	↑	TRAF-1, IL-8, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-12, TGF- β , IL-1 α , IL-1, IL-6	Lee y col., 2001; Smeed y col., 2007
		↓	IL-18	
	Plasma y MDMs	↑	IFN- γ , Osteopontona	Dudemaine y col., 2014
		↓	IL-4	
	PBMCs+tejido intestinal+linfonodos	↑	IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-2, IL-10, IL-4, IL-2R	Coussens y col., 2004; Tanaka y col., 2005
		↓	IL-16, IL-18	
Sangre periférica	↑↓	TGF- β	Buza y col., 2003	
	↓	TNF- α , RANTES, MC1		
Proteínas/ Péptidos	Suero bovino	↑	VDBP, thransthyretin, RBP, alpha-2 glycoprotein, SERPINA3, cathelicidin, VDBP precursor, leucinerich alpha-2-glycoprotein	Seth y col., 2009
		↑↓	Fetuin, serine proteinase inhibitor, alpha-1-B glycoprotein, alpha-1 acid glycoprotein	
	Plasma bovino	↑	Transferrin, gelsolin /, actin binding protein, C1r, C3, AOC3, thrombin	You y col., 2012
	↓	COAFXIII, FCG		
Genes	Sangre periférica	↑	KLRB1, MPO, LTF, SERPINE1, S100A8/9, TFRC, GBP6, PIGR, IL-10, CXCR3, CD14, ELANE, CHI3L1, HP, HGF, MMP9, DEFB1, DEFB10, TIMP1, PIP5K1C, IRF5, IRF7, CORO1A	Park y col., 2016, 2017, 2018
		↓	IL17F, IL17F, IL22, IL26, HMGB1, IRF4	
	MDMs, PBMCs y WBCs	↑	TGFB, TSP1, BCL2L1, TGF, IL6, MMP12, MT1A/B/E/F/H/I, 17A-HYDROXYLASE, CD40L, CRF, CRFR1, EP2, FSG-R, IL1, IL10, IL12, IL2, IL4, IL5, IFNG, MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP15, MMP16, MMP19, MMP23, PAI1/2, SCC, SPARC, TGFB, TIMP1, TIMP2, TIMP2, V3	
	↓	SFK, ADRB, cAMPPK, VTAP, TNFB, DQB, IA6, MAPK2K5, MEK5B, CD38, GIMAP6, SCD-1, 24DHCR, LDLR		
mi RNA	Sangre periférica	↑	miR-6517, miR-7857, miR-24-1, miR-24-2, miR-378c	Malvisi y col., 2016
		↓	miR-19b, miR-19b-2, miR-1271, miR-100, miR-301a, miR-32a	
	Tejido intestinal	↑	miR-146b, miR-1247, miR-196b, miR-184, miR-202	Liang y col., 2016
		↓	miR-137, miR-105a, miR-433, miR-133b	

En los últimos años se ha desarrollado la PCR digital (Droplet digital PCR; ddPCR), una tecnología muy sensible capaz de realizar la cuantificación absoluta del DNA de la bacteria al estar basada en la división de la muestra en microgotas y su cuantificación mediante el método de Poisson. De acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida por cada microgota, se calcula el número de copias de DNA en la muestra original. La ddPCR es un sistema preciso y robusto,

2. INTRODUCCIÓN

reproducibile y presenta mayor resistencia a inhibidores que la PCR convencional (Ricchi y col., 2017). Además la ddPCR también resulta útil para la validación de otros test y biomarcadores, tal y como se ha demostrado en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* (Devonshire y col., 2016).

La aplicación de las tecnologías emergentes al diagnóstico de la PTB permitirá la detección de animales subclínicos paliando la falta de sensibilidad de las técnicas de diagnóstico disponibles actualmente. En la tala IX se resumen las técnicas diagnósticas habitualmente utilizadas y las técnicas emergentes que podrían dar respuesta a la falta de sensibilidad de los test tradicionales.

Tabla XI. Técnicas diagnósticas de la PTB tradicionales y nuevas. Adaptada de (Britton y col., 2016)

	Test diagnósticos	Detección directa de MAP	Detección indirecta de MAP	Estadio de la infección
Técnicas disponibles	Cultivo	X		2,3*
	PCR	X		2,3*
	ELISA		X	2,3*
	Ensayo de IFN- γ		X	1*
Técnicas emergentes	ddPCR	X		No determinado
	ELISA de biomarcadores proteínas (Transcriptómica y Proteómica)		X	No determinado
	RT-qPCR basada en biomarcadores mRNAs (RNA-Seq)		X	No determinado

*De acuerdo a los descrito por Whitlock (Whitlock y col., 2000)

2.8. Inmunopatogenia

En enfermedades provocadas por micobacterias como la tuberculosis o la lepra, se han descrito asociaciones entre la respuesta inmune y las lesiones observadas (Yamamura y col., 1991; Orme y col., 1993). De igual modo, diversos estudios han propuesto el espectro inmunopatogénico de la PTB (Clarke, 1997; Bastida & Juste, 2011; Vázquez y col., 2013). En la figura 15 se muestra el modelo propuesto por Bastida y Juste en 2011. Según este modelo, la respuesta inmune celular de tipo Th1, con predominio de células CD4+ y secreción de IFN- γ , tendrían lugar en animales subclínicos y se asociaría con presencia de lesiones focales o multifocales. Tras mantenerse una respuesta pro-inflamatoria a lo largo de los años, dirigida fundamentalmente a reclutar linfocitos y macrófagos al sitio de infección, los granulomas aumentarían en tamaño y número llegando a producir daño tisular. Es en este momento cuando la respuesta Th1 comienza a decaer, se produce diseminación bacteriana e inicio de una respuesta inmune de tipo Th2 con producción de anticuerpos que estaría asociada con las lesiones difusas y con la aparición de signos clínicos característicos de la enfermedad. Según el modelo de Bastida y Juste, alrededor del 46% del ganado bovino en una granja infectada no presentarían ningún tipo de lesión, el 19% presentarían lesiones de tipo focal, el 17% presentaría lesiones multifocales y tan solo el 19% de los animales

desarrollarían lesiones difusas que conducirían a la aparición de signos clínicos y a la muerte del animal (Bastida & Juste, 2011).

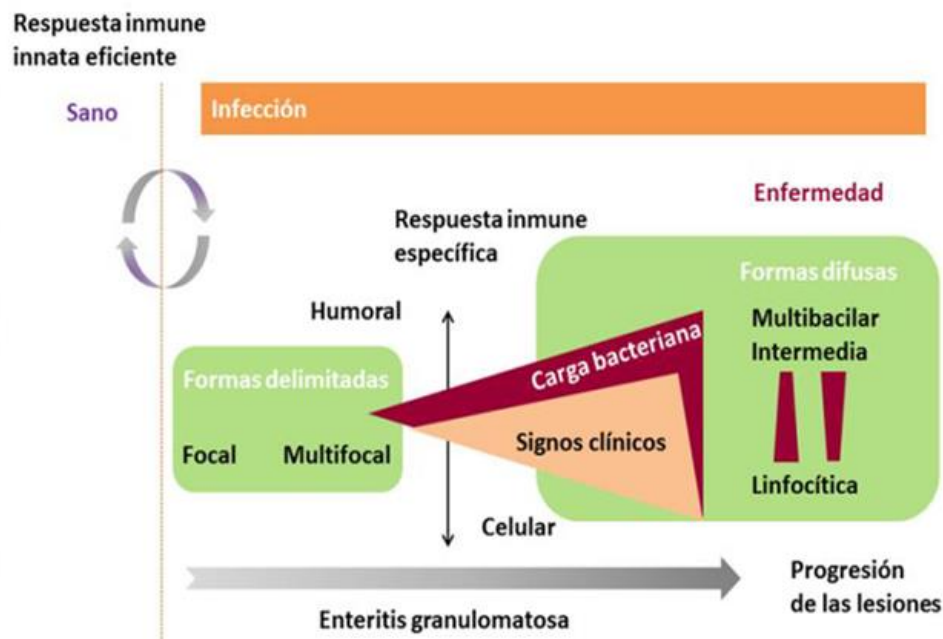


Figura 14. Representación esquemática de las diferentes formas lesionales de la PTB de acuerdo al modelo propuesto por Bastida y Juste (Bastida & Juste, 2011)

En 2014 Vázquez y col., combinaron datos histopatológicos con variables microbiológicas e inmunológicas tanto de base celular como humoral (ELISA, cultivo bacteriológico, PCR y análisis histopatológico) de 1031 vacas sacrificadas en matadero para establecer dos formas inmunopatológicas: latentes y patentes. De este modo, las formas latentes se definen como aquellos casos que presentan lesiones focales en los que la carga bacteriana y los niveles de anticuerpos son bajos mientras que la respuesta dirigida al reclutamiento celular al sitio de infección es alta. Por el contrario, en las formas patentes se observaría un incremento significativo de la carga bacteriana en tejidos y niveles de anticuerpos en suero fácilmente detectables. Estas formas patentes, incluirían las lesiones multifocales y difusas descritas por González y col., (2005)(P. Vazquez, 2014).

2.9. Tratamiento y medidas de control

2.9.1. Tratamiento

Los agentes antimicrobianos que se han utilizado en el tratamiento de la PTB son agentes antimicobacterianos como la isoniazida, rifampicina, clofazimina y antibióticos aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina, gentamicina y amikacina) (Fecteau & Whitlock, 2011). Dichos fármacos se han utilizado de manera individual y en diferentes combinaciones para el tratamiento de la PTB en infecciones naturales. (Slocombe, 1982; Hoffsis & Streeter, 1990).

2. INTRODUCCIÓN

Isoniacida: La isoniacida inhibe la síntesis de los ácidos micólicos de la pared celular de las micobacterias. La isoniazida fue uno de los primeros antimicrobianos utilizado en el tratamiento de la PTB tanto en infecciones naturales como experimentales. Diversos estudios demuestran que, pese a que el tratamiento de la PTB con isoniacida puede hacer remitir los signos clínicos de la enfermedad, no cura la infección por MAP (Baldwin, 1976; Hoffsis & Streeter, 1990)

Rifampicina: La rifampicina es un antibiótico de amplio espectro que puede tener efecto bactericida o bacteriostático en función de la dosis utilizada. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos en las bacterias mediante su unión a la polimerasa de RNA dependiente de DNA. Se recomienda su uso en combinación con otros agentes antimicrobianos para favorecer la sinergia entre dichos fármacos y para reducir la aparición de resistencias (Fecteau & Whitlock, 2011).

Clofazimina: La clofazimina se una al DNA bacteriano inhibiendo la replicación de la bacteria. Este fármaco se acumula en tejido graso y en los macrófagos del sistema reticuloendotelial, presentando una buena actividad frente a patógenos intracelulares como MAP. Al igual que la isoniazida, reduce la severidad de los signos clínicos pero no cura la infección causada por MAP. Además, tras la finalización del tratamiento se observa reaparición de los síntomas entre los 7 y los 14 días (Fecteau & Whitlock, 2011; Merkal & Larsen, 1973).

Aminoglucósidos: Los aminoglucósidos son antimicrobianos con efecto bactericida cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica mediante acción directa sobre los ribosomas. Los antibióticos aminoglucósidos se utilizan, al igual que los fármacos descritos anteriormente, en combinación con otros agentes antimicrobianos (Larsen y col., 1950; Eidus & Konst, 1964)

El estudio más completo llevado a cabo acerca del efecto *in vitro* de antibióticos frente a MAP se publicó en 2009 y analizaba el potencial de 11 antimicrobianos frente a MAP (Krishnan y col., 2009). En él se demostró que los macrólidos eran los antibióticos con mejor efecto *in vitro* y que la mayoría de los fármacos usados en tratamientos de tuberculosis o lepra no eran efectivos frente a MAP (Fig. 14).

Drug	Common usage	Percentage MAP strains		
		Susceptible	Intermediate	Resistant
Azithromycin	broad spectrum	100	0	0
Clarithromycin	broad spectrum, anti MAC	100	0	0
Amikacin	broad spectrum	83.3	16.7	0
Ciprofloxacin	broad spectrum	55.5	5.5	39
Levofloxacin	broad spectrum	50	5.5	44.4
Rifampicin	broad spectrum, anti TB	44.4	50	5.6
Rifabutin	anti mycobacterial	38.8	44.4	16.7
Ethambutol	anti TB	27.8	66.7	5.5
Isoniazid	anti TB	0	0	100
Dapsone	anti leprosy	0	0	100
Clofazimine	anti leprosy	5.5	16.7	77.8

Figura 15. Perfiles de susceptibilidad de 18 aislados de MAP de origen humano y animal frente a diferentes agentes antimicrobianos (<https://Johnes.Org>)

Greenstein y col., propusieron que drogas antiinflamatorias utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, eran capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de MAP (Greenstein y col., 2007). Entre estos fármacos encontramos el metotrexato, azatioprina, rapamicina, 6-mercaptopurina, ciclosporina A, ácido 5 aminosalicílico o tacrolimus (Greenstein y col., 2007; Sung & Collins, 2008; Krishnan y col., 2009). Sin embargo, la utilización de estas drogas en animales destinados a consumo humano resulta cuestionable, desde el punto de vista de salud pública. Actualmente, la sustancia quimioproléctica mejor evaluada frente a la PTB es la Monensina. La Monensina es un ionóforo cuya administración diaria en ganado bovino infectado por MAP, reduce la carga fecal de MAP, las lesiones histopatológicas y disminuye la positividad a ELISA en leche (Greenstein y col., 2009). No obstante, el uso de la Monensina como aditivo en la dieta del ganado bovino está prohibido en la Unión Europea desde 2006 (Reglamento CE N° 1831/2003, artículo 11). Recientemente, Pavić ha llevado a cabo un estudio en el que compara la eficacia de híbridos de primaquinas, un tipo de fármaco antipalúdico, como agentes antimicobacterianos y ha establecido que estos fármacos tenían una mayor eficacia en el tratamiento de MAP que el ciprofloxacino (Pavić y col., 2018).

También se han llevado a cabo tratamientos de la PTB con sustancias no farmacológicas como probióticos del tipo *Dietzia* susp. Su aplicación en animales adultos con signos clínicos de la enfermedad, consiguió disminuir la respuesta humoral anti-MAP, alargar la vida productiva de los animales y reducir los signos clínicos (Click, 2011). Otras sustancias naturales que presentan capacidad inhibitoria del crecimiento de MAP *in vitro* son el aceite de naranja (Crandall y col., 2012), el carvacol y el trans-cinamaldehído que son compuestos principales del aceite esencial de orégano y canela, respectivamente (Wong y col., 2008).

En cualquier caso, el tratamiento farmacológico de la PTB no se considera viable debido a que son tratamientos largos, costosos y no totalmente efectivos, apareciendo recidivas tras la

2. INTRODUCCIÓN

finalización del mismo. Pese a que el uso de antimicrobianos no está permitido de manera generalizada para el tratamiento de la PTB, en casos de animales de un valor especial (sementales o animales de alto valor como reproductores, mascotas, animales participantes en competiciones deportivas...) se permite el tratamiento antibiótico siempre que su leche no vaya a ser destinada a consumo humano (Fecteau & Whitlock, 2011).

Dada la ineficacia de los tratamientos antimicrobianos actuales para la curación de la infección por MAP, se hace evidente la necesidad de profundizar en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, máxime cuando la asociación de MAP con la enfermedad de Crohn podría suponer un problema de salud pública..

2.9.2. Medidas de control

En la década de 1920 se instauraron en Francia los primeros programas de control de la PTB y, a partir de ese momento, se han implantado en diversos países programas de control tanto oficiales como voluntarios (Benedictus y col., 2008). Recientemente se ha publicado una revisión acerca de los programas de control de la PTB en 48 países en la que se observa que 22 de los 48 países encuestados tenían en marcha programas de control de la PTB en el momento de la encuesta (Whittington y col., 2019). Los motivos para la instauración de dichos programas incluían una mejora de la salud animal, la reducción de los costes de producción, garantizar las transacciones comerciales (tanto a nivel regional como internacional), el bienestar animal y la preocupación por la salud pública especialmente si se confirma que MAP es un factor causal de la enfermedad de Crohn. Por el contrario, aquellos países que no disponían de programas de control de la enfermedad lo justificaban por la falta de recursos económicos, el control prioritario de otras enfermedades sobre la PTB, la falta de infraestructura y recursos, la menor importancia de la PTB respecto a otros problemas de salud y la falta de test diagnósticos (Donat y col., 2020).

Los programas de control de la PTB generalmente incluyen diversas medidas y herramientas entre las que destacan la aplicación de medidas higiénico-sanitarias en las explotaciones, la identificación de animales infectados y su sacrificio (“test and cull”, desvieje de animales infectados), y la vacunación. Pese a que la vacunación con vacunas inactivadas resulta muy eficaz tanto reduciendo la presencia de MAP en heces y tejidos de animales infectados como incrementando la producción láctea y la vida productiva de los animales en granjas con presencia de MAP (Juste y col., 2009; Alonso-Hearn y col., 2012), el uso de estas vacunas en ganado bovino no está permitida en algunos países debido a su posible interferencia con las técnicas de diagnóstico utilizadas en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina (Garrido y col., 2013). Para

resolver este problema algunos autores han propuesto alternativas a los antígenos utilizados tradicionalmente en los test de intradermorreacción para el diagnóstico de la infección con *Mycobacterium bovis* o nuevas vías de vacunación (Arrazuria y col., 2020; Middleton y col., 2021). Sin embargo, actualmente la vacunación no es una opción viable en la gran mayoría de los países.

El control de la PTB está basado en la eliminación de animales infectados y en la adopción de medidas higiénico-sanitarias en las explotaciones. Algunos factores que limitan el éxito de los programas de control basados en estas medidas son la falta de cumplimiento de los protocolos de manejo de los animales, la baja sensibilidad de los test diagnósticos utilizados y la adquisición de animales infectados que puedan introducir MAP en la explotación (Barkema y col., 2018). La falta de sensibilidad de las técnicas disponibles supone una limitación para la detección de las infecciones subclínicas, obligando a realizar test periódicos con el consiguiente coste económico. Respecto a las medidas higiénico-sanitarias, es prioritario centrarse en los animales más jóvenes del rebaño por ser estos especialmente vulnerables a la infección. Las medidas deben encaminarse a la reducción de la carga ambiental de MAP y evitar el contacto con agua y alimentos. En la tabla XII se muestran las medidas de prevención más utilizadas en las explotaciones tanto en adultos como en neonatos.

Tabla XII. Medidas higiénico-sanitarias utilizadas en el control de la PTB en las explotaciones (Vázquez, 2014a)

Medidas Higiénico-Sanitarias	
GENERALES	<ul style="list-style-type: none"> • Instauración de protocolos periódicos de limpieza y desinfección de las instalaciones • Adecuado manejo de los purines • Separación de animales con sintomatología clínica • Evaluación del estatus sanitario de los animales que se incorporan al rebaño
NEONATOS	<ul style="list-style-type: none"> • Separación física de la zona de partos y limpieza exhaustiva de la mismas tras el parto • Separación de las crías de las madres tras el parto • Alojamiento separado para recría y adultos • No recrear animales procedentes de madres eliminadoras de MAP • Pasteurización del calostro o administración de reemplazantes lácteos comerciales

Teniendo en consideración las limitaciones de los programas de control, es importante desarrollar nuevas estrategias para reducir la prevalencia de la PTB. La selección genómica es una práctica habitual en la industria ganadera. Una estrategia ampliamente aceptada para el control de la PTB sería selección genética de animales con una menor susceptibilidad a la infección por MAP y/o una mayor resiliencia a la PTB.

2.10. Factores implicados en resistencia/susceptibilidad a la infección por MAP

La PTB es una enfermedad multifactorial que se produce como resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales y microbianos. Existen numerosos factores implicados en la

2. INTRODUCCIÓN

resistencia-susceptibilidad a la infección por MAP como la especie, raza, edad y componente genético individual de cada animal, la dosis infectiva y el manejo higiénico-sanitario de las explotaciones. La edad de los animales en el momento de la exposición a MAP es un factor decisivo en la PTB. Los animales menores de 6 meses son los más susceptibles a la infección debido al desarrollo incompleto del sistema inmune, la mayor permeabilidad de las placas de Peyer para la absorción de los anticuerpos maternos y la persistencia de la gotera esofágica que permite que la leche contaminada ingerida pase directamente del esófago al abomaso evadiendo los mecanismos defensivos del tracto digestivo (compuestos biliares, pH ácido, enzimas digestivas, mucus, peristaltismo y flora comensal). Por otro lado, la dosis infectiva ingerida por el animal también tiene una gran repercusión en el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito que la dosis infectiva es de, aproximadamente, 10^3 bacterias y que, pese a que los animales adultos (mayores de dos años) son más resistentes que los jóvenes, si se exponen a dosis altas de MAP también son susceptibles de infectarse y desarrollar la enfermedad (Gilmour y col., 1965; Windsor & Whittington, 2010). Si bien es cierto que los factores ambientales tienen una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad, también la especie y la raza son factores a tener en cuenta (Tabla XIII). El ganado bovino es más susceptible a la PTB que el ovino o el caprino y numerosos estudios demuestran que la incidencia de PTB es mayor en razas bovinas de producción láctea que en razas de aptitud cárnica (Pence y col., 2003).

Tabla XIII. Factores genéticos y ambientales que influyen en la susceptibilidad a la infección por MAP (Abendaño, 2016)

Factores Genéticos	Factores Ambientales
<ul style="list-style-type: none">• Efecto especie• Efecto racial• Genes implicados en la respuesta inmune de tipo innata	<ul style="list-style-type: none">• Edad en el momento de exposición• Dosis infectante• Manejo higiénico-sanitario

2.10.1. Susceptibilidad, tolerancia y resistencia genética a la infección por MAP

Frente a una infección con un agente patógeno, cada organismo responde de una manera específica. Mientras hay animales que desarrollan signos clínicos de la enfermedad, otros permanecen aparentemente sanos y sin signos clínicos. La respuesta a la infección es compleja y pueden darse tres posibilidades a nivel individual: (1) animales susceptibles que progresan a formas severas de la enfermedad porque no son capaces de inducir una respuesta inmune innata efectiva que elimine el patógeno, (2) animales resistentes capaces de eliminar o limitar la bacteria en los estadios iniciales de la infección gracias a una respuesta inmune innata eficaz y (3) animales

tolerantes en los que, si la respuesta inmune innata no es capaz de eliminar a la bacteria, se desarrollan una serie de mecanismos para controlar el daño que pudiera provocar el patógeno.

Tanto la resistencia como la tolerancia son formas de resiliencia a la infección o a la enfermedad, respectivamente. Por lo tanto, la resiliencia incluye mecanismos de resistencia a la infección, tolerancia a la enfermedad y comportamientos intrínsecos que el hospedador utiliza para evitar el contacto con hospedadores infectados o la exposición al patógeno (Sheldon y col., 2020). La resistencia se define como la capacidad del hospedador para prevenir la infección (ej., ausencia de un receptor necesario para la interacción patógeno-hospedador) o para eliminar el patógeno en fases iniciales de la infección mediante una respuesta inmune innata efectiva. Por otro lado, la tolerancia se define como “el conjunto de mecanismos que disminuyen la susceptibilidad del hospedador al daño tisular u otros daños provocados por el patógeno o por la propia respuesta inmune” (Medzhitov y col., 2012). La tolerancia es un fenotipo que confiere ventajas evolutivas por lo que variaciones alélicas asociadas a este fenotipo se seleccionan de manera positiva a lo largo de la evolución (Barreiro & Quintana-Murci, 2010). El conocimiento de los mecanismos asociados a la tolerancia y la resistencia es bastante limitado. Por otro lado, la evitación de patógenos, también conocida como disgusto de patógenos, es un sistema adaptativo que guía el comportamiento para evitar infecciones causadas por virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos, gusanos, artrópodos y parásitos sociales. La evitación es un mecanismo con el que se mantiene la salud limitando la exposición al patógeno mediante comportamientos intrínsecos que reducen el riesgo de infección mediante la elusión del patógeno o de animales infectados. Un ejemplo de evitación sería el evitar contacto con otro animal infectado por su olor, pérdida de pelo o cambios comportamentales (Loehle, 1995; Kavaliers & Choleris, 2018). De manera más global se podría definir la resiliencia como el conjunto de estrategias defensivas complementarias de conductas para evitar al patógeno, tolerancia y resistencia (Fig. 14). De este modo los animales resilientes serían capaces de prevenir la infección y/o minimizar la severidad de la enfermedad (Sheldon y col., 2020). También se ha descrito la posibilidad de que animales tolerantes expuestos al patógeno induzcan inicialmente una respuesta inmune innata eficaz (mecanismos de resistencia) que es modulada correctamente para evitar que llegue a producir daños tisulares. En este caso, los mecanismos de tolerancia incluirían también mecanismos de resistencia.

2. INTRODUCCIÓN

Resiliencia		
Evitación	Tolerancia	Resistencia
		
Limita la exposición a bacterias patógenas	Limita el daño causado por bacterias patógenas	Limita el número de bacterias patógenas
Evita exposición a animales infectados Medidas higiénicas	Protege los tejidos de toxinas Repara el daño	Activa respuesta inmune innata y adaptativa Simula inflamación
Evita patógenos	Tolera patógenos	Elimina patógenos

Figura 16. Estrategias incluidas en la resiliencia: la limitación a la exposición a patógenos, la tolerancia a la enfermedad y/o la resistencia a la infección (Sheldon y col., 2020)

MAP ha desarrollado diversas estrategias para evadir los mecanismos de resistencia del hospedador y poder sobrevivir durante largos periodos de tiempo. En este contexto, los mecanismos de resistencia no son suficientes y la tolerancia es crítica para el control de la inflamación y prevenir la aparición de signos clínicos.

2.10.1.1. Susceptibilidad a la PTB

Tal y como se ha mencionado anteriormente, un animal susceptible es aquel que tras ser infectado progresa a formas severas de la enfermedad porque no es capaz de inducir una respuesta inmune innata efectiva que elimine el patógeno y porque la inducción de una respuesta pro-inflamatoria prolongada acaba generándole graves daños tisulares. Los estudios de asociación genética que se han llevado a cabo hasta el momento, han utilizado diferentes fenotipos para identificar variantes genéticas asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP. En la mayoría de los estudios de asociación llevados a cabo los fenotipos se han basado en los resultados de test diagnósticos pre-mortem como el ELISA, ELISA de tanque, cultivo bacteriológico y PCR fecal. El fenotipo utilizado con mayor frecuencia ha sido el ELISA tanto individual como de tanque (Pant y col., 2010; Verschoor y col., 2010; Pant y col., 2011; van Hulzen y col., 2012; Del Corvo y col., 2017; Gao y col., 2018; Mallikarjunappa y col., 2018b, 2020; McGovern y col., 2019). Sin embargo, tal y como hemos visto en el apartado de diagnóstico la sensibilidad del ELISA es limitada para el diagnóstico de animales subclínicos. Otros autores, han utilizado el resultado de ELISA combinado con el cultivo fecal (Gonda y col., 2007; Koets y col., 2010; Kirkpatrick y col., 2011; Küpper y col., 2014; Pauciullo y col., 2015; Sallam y col., 2017, 2018). Algunos autores han

añadido a la combinación de ELISA y cultivo fecal, la PCR en muestras de sangre y el resultado al test de intradermorreacción llevado a cabo con derivado proteico purificado aviar (Aviar purified protein derivative; PPDa) (Kumar y col., 2019, 2020). En ciertos estudios llevados a cabo con genes candidatos se han utilizado, además del ELISA, test diagnósticos realizados tras la muerte del animal como la PCR, el cultivo de tejidos y los resultados del análisis histopatológico (Ruiz-Larrañaga, y col., 2010a; Ruiz-Larrañaga y col., 2010b; Ruiz-Larrañaga y col., 2011; Vázquez y col., 2014b). También se han llevado a cabo estudios de asociación definiendo el fenotipo únicamente mediante la PCR y el cultivo de tejidos llevado a cabo post-mortem (Settles y col., 2009; Kiser y col., 2017; Kiser y col., 2021). Sin embargo, ningún estudio de asociación de genoma completo ha combinado datos fenotípicos obtenidos mediante ELISA, PCR y cultivo de tejidos, utilizando únicamente resultados de ELISA (McGovern y col., 2019; Sánchez y col., 2020) o de PCR y cultivo de tejido (Kiser, y col., 2017).

Numerosos autores han estimado que la heredabilidad de la susceptibilidad a la infección por MAP se encuentra en valores entre 0,03 y 0,27, (Kirkpatrick y col., 2011; van Hulzen y col., 2012; Küpper y col., 2014; Zare y col., 2014; Kiser y col., 2017; Gao y col., 2018) . Estos estudios están en concordancia con las estimas de heredabilidad calculadas para otras micobacterias como *Mycobacterium lepra* y *Mycobacterium bovis* que presentan unas heredabilidades de 0,199 (Wang y col., 2016) y 0,12 (Ring y col., 2019), respectivamente.

2.10.2.1.1. Estudios de genes candidatos

Los estudios de genes candidatos analizan la asociación entre las variantes alélicas de un gen concreto y un fenotipo. Los genes generalmente se seleccionan en base a la información disponible en la literatura, y a su papel en la patogénesis de la PTB, o de otras enfermedades relacionadas como la enfermedad de Crohn. Los polimorfismos del gen candidato son genotipados y analizados en relación a un fenotipo de PTB en un análisis caso-control. Los genes candidatos que se han estudiado en relación a la infección por MAP incluyen receptores de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptors; PRR), receptores de citoquinas y genes promotores de la eliminación de patógenos intracelulares.

El gen *Dominio de oligomerización de nucleótidos 2* (*Nucleotide oligomerization domain 2*; *NOD2*) codifica un PRR implicado en el reconocimiento de la pared micobacteriana y estimula la transcripción de *NF- κ B* que regula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Girardin y col., 2003; Abbott y col., 2004). Otros PRR asociados a MAP son los receptores TLR que, tras el reconocimiento del patógeno, desencadenan la respuesta inmune innata en el hospedador (Ferwerda

2. INTRODUCCIÓN

y col., 2007; Byun y col., 2012; Park y col., 2020) y el *Dominio de lectina de tipo C que contiene 7A (C-Type Lectin Domain Containing 7A; CLEC7A)* que se expresa en las APC y tras la detección de MAP estimula la secreción de citoquinas por parte de las células fagocíticas mediante su acción conjunta con los TLR2 y TLR4 (Ferwerda y col., 2007).

Por otro lado, las proteínas codificadas por los genes *Proteína del cuerpo nuclear SP110 (SP110 Nuclear Body Protein; SP110)*, *Familia de transportadores de solutos 11 Miembro 1 (Solute Carrier Family 11 Member 1; SLC11A1)* y *Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 1 (Peptidoglycan Recognition Protein 1; PGLYRP1)* inducen la activación de la respuesta inmune innata frente a patógenos intracelulares. Mientras que PGLYRP1 actúa como un PRR que se une al PG de las bacterias Gram+ ejerciendo acción bactericida (Ju y col., 2005), la expresión de SP110 en los macrófagos ha demostrado limitar la replicación bacteriana (Wu y col., 2016). Por otro lado, el SLC11A1 es un transportador de iones que controla la replicación de bacteria intracelular regulando la concentración de iones divalentes en el interior del fagosoma (Govoni & Gros, 1998). Otros genes candidatos estudiados por su asociación con la infección por MAP son la *Subunidad alfa del receptor de interleucina 10 (Interleukin 10 Receptor Subunit Alpha; IL10RA)*, el *Receptor 2 del interferón gamma (Interferon Gamma Receptor 2; IFNGR2)*, la *Subunidad beta 1 y beta 2 del receptor de interleucina 12 (Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 1 y Beta 2; IL12Rβ1/β2)* e el *Receptor de interleucina 23 (Interleukin 23 Receptor; IL23R)* que codifican receptores para las citoquinas IL10, IFN-γ, IL12 e IL23, respectivamente (Hussain y col., 2016; Coussens, 2020;). Otro de los genes candidatos asociados a la infección por MAP es el *Miembro 2 de la familia Wnt (Wnt Family Member 2; WNT2)* que juega un importante papel inmunomodulador regulando la inflamación intestinal y manteniendo la homeostasis tisular (Liu y col., 2012). Finalmente, también se ha estudiado como gen candidato el gen codificante de la *Molécula CD209 (CD209 Molecule; CD209)* que codifica la proteína DC-SIGN permitiendo la unión de las células dendríticas al ManLAM de MAP (Geijtenbeek y col., 2003). En la tabla XI se resumen los resultados de los estudios de asociación genética llevados a cabo con genes candidatos

Tabla XIV. Estudios de genes candidatos asociados a la infección por MAP. Adaptado de Mallikarjunappa y col., 2021

Gen	SNP	Población	Fenotipo	P	Odds ratio	Referencia
<i>NOD2</i>	2197T > C	Holstein, Jersey y Brahman x Angus (n=402)	ELISA, PCR leche, PCR sangre y cultivo fecal	P < 0,0001	2,32 (1,41–3,83)	Pinedo y col., 2009
<i>NOD2</i>	c.*1908C>T	Holstein (n=241)	ELISA, PCR fecal y cultivo fecal	P = 0,04	2,043 (1,22–3,42)	Ruiz-Larrañaga y col., 2010a
<i>NOD2</i>	g.521G>A	Holstein (n=324)	Cultivo fecal	P < 0,01	–	Küpper y col., 2014
<i>SLC11A1</i>	c.1067C > G	Holstein (n=558)	ELISA, PCR fecal y cultivo fecal	P = 0,037	1,484 (1,05–2,01)	Ruiz-Larrañaga y col., 2010c
	c.1157–91A > T			P = 0,024	1,592 (0,01–2,3)	
<i>SP110</i>	c.587A>G	Holstein (n=355)	ELISA y cultivo fecal	P = 0,031	2,7 (1,69–4,54)	Ruiz-Larrañaga y col., 2010b
<i>TLR1</i>	G658A	Crossbreed n=711	PCR sangre	–	3,459	Mucha y col., 2009
<i>TLR2</i>	A2038G	Crossbreed n=711	PCR sangre	–	NA	Mucha y col., 2009
<i>TLR2</i>	1903 T/C	Holstein (n=553)	ELISA y cultivo fecal	P = 0,009	1,7 (1,2–2,8)	Koets y col., 2010
<i>TLR4</i>	892G>Y	Crossbreed n=711	PCR sangre	–	NA	Mucha y col., 2009
	G895A	–	–	–	NA	Mucha y col., 2009
	G1165A	–	–	–	NA	Mucha y col., 2009
	T1167C	–	–	–	NA	Mucha y col., 2009
<i>TLR4</i>	c.-226G>C and	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,095*	1,38 (0,95–2,02)	Sharma y col., 2015
<i>PGLYRP1</i>	c.480G>A	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,05	1,51 (0,99–2,31)	Pant y col., 2011a
<i>IFNGR2</i>	c.1674C>T	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,035	1,51 (1,03–2,22)	Pant y col., 2011b
<i>IL12RB1</i>	c.81T>C	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,0008	1,62 (1,22–2,15)	Pant y col., 2011b
<i>IL12RB2</i>	c.-511A>G	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,0089	1,86 (1,17–2,96)	Pant y col., 2011b
<i>IL23R</i>	c.1417A>C	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,0441	1,57 (1,01–2,43)	Pant y col., 2011b
<i>CLEC7A</i>	c.589A>G	Holstein (n=439)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,008	1,42 (1,09–1,9)	Pant y col., 2014
<i>WNT2</i>	rs43390642: G>T	Holstein (n=324)	ELISA y cultivo fecal	P = 0,013	2 (1,03–4)	Pauciuolo y col., 2015
<i>IL10RA</i>	633C > A	Holstein (n=446)	ELISA suero y ELISA leche	P = 0,002	1,42 (1,06–1,90)	Verschoor y col., 2010
<i>CD209</i>	c.116-18T>C	Holstein (n=772)	ELISA, PCR fecal y cultivo fecal	P = 0,002	–	Vázquez y col., 2014b

*Tendente a afectar al rasgo (P < 0,10)

2. INTRODUCCIÓN

2.10.2.1.2. Estudios de asociación de genoma completo

En los últimos años, se hayan llevado a cabo numerosos estudios de asociación de genoma completo (Genome-wide association study; GWAS) empleando tanto chips de baja (Low density; LD) (Zare y col., 2014), media (Medium density; MD) (Settles y col., 2009; Minozzi y col., 2010; Pant y col., 2010; Kirkpatrick y col., 2011; van Hulzen y col., 2012; Alpay y col., 2014) y alta densidad (High density; HD) (Brito y col., 2018; Gao y col., 2018; Mallikarjunappa y col., 2018b) como genotipado imputado a secuencia completa (Whole genome sequence; WGS) (Kiser y col., 2018; McGovern y col., 2019). Mallikarjunappa y col., partieron de los datos de genotipado de Pant y col., 2010 y los imputaron mediante el software FImpute a datos de genotipado de chip de alta densidad. Gracias a ello, validaron los resultados de Pant e identificaron nuevos genes candidatos como *IL4*, *IL5*, *IL13* y el *Factor regulador del interferón 1 (Interferon Regulatory Factor 1; IRF1)*, poniendo de manifiesto la conveniencia del uso de datos de genotipado de alta densidad e incluso WGS, para el análisis de rasgos poligénicos complejos como la PTB. Si bien es cierto que los análisis de tipo GWAS han permitido identificar una gran cantidad de variantes alélicas asociadas a la PTB, los resultados son variables entre estudios. Esto puede deberse a diferentes fondos genéticos y variabilidad en la prevalencia de la enfermedad entre las poblaciones estudiadas, diferentes tamaños muestrales, diferentes modelos estadísticos utilizados, diferencias en la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico y diferentes definiciones entre casos y controles en los estudios.

Los análisis de tipo GWAS han sido muy útiles a la hora de identificar variantes asociadas a diferentes caracteres y enfermedades y han ayudado a profundizar en mecanismos biológicos desconocidos. Sin embargo, este tipo de análisis no es capaz de identificar variantes causales o funcionales del rasgo estudiado. Aunque son capaces de identificar SNPs asociados con el fenotipo analizado, los estudio GWAS no informan sobre el gen que está regulado por el SNP identificado. Esto es una desventaja de este tipo de estudios, sobre todo porque la mayoría de los SNPs identificados no se encuentran en exones, sino en intrones y regiones intragénicas pudiendo regular a genes que no tienen porque ser adyacentes al SNP identificado. Esto implica que es necesario combinar los resultados de GWAS con datos de expresión génica para tratar de identificar variantes causales. En el caso de la PTB, los estudios GWAS que se han llevado a cabo hasta el momento, han identificado, sobre todo, variantes genéticas y mecanismos asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP. Los loci identificados están distribuidos por todo el genoma y prácticamente se han identificado variantes en todos los cromosomas de *Bos taurus* siendo el cromosoma 23 la región en la que más QTLs se han identificado (137 de 565) (www.animalgenome.org). En la tabla

XV se resumen los QTLs identificados en los estudios de tipo GWAS llevados a cabo para identificar variantes alélicas asociadas a la susceptibilidad a la PTB en ganado bovino.

Tabla XV. Estudios GWAS y número de variantes asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP en bovino

Referencia	Fenotipo	Genotipado	Cromosomas (n° de SNPs identificados)
Settles y col., 2009	Cultivo tejido	MD	Chr.1 (3), Chr.3 (1), Chr.5 (2),1 Chr.7 (1), Chr.8 (1) Chr.9 (4), Chr.16 (2), Chr.21 (1), Chr.23 (1)
Kirkpatrick y col., 2010	ELISA, Cultivo fecal	MD	Chr.2 (2), Chr.3 (1), Chr.4 (2), Chr.5 (1), Chr.6 (2), Chr.7 (2), Chr.9 (2), Chr.10 (1), Chr.13 (5), Chr.14 (1), Chr.15 (2), Chr.16 (4), Chr.17 (3), Chr.18 (1), Chr.20 (4), Chr.21 (4), Chr.22 (1), Chr.23 (2), Chr.25 (2), Chr.26 (5), Chr.29 (3)
Minozzi y col., 2010	ELISA	MD	Chr.8 (1), Chr.9(1), Chr.11 (1), Chr.12 (5), Chr.27 (1)
Pant y col., 2010	ELISA	MD	Chr.1 (1), Chr.5 (7), Chr.6 (2), Chr.7 (5), Chr.10 (4) Chr.11(1),Chr.14 (2)
Minozzi y col., 2012	ELISA, Cultivo tejido	MD	Chr.1 (4), Chr.6 (1), Chr.7 (1), Chr.12 (3), Chr.13 (1) Chr.15(1), Chr.16 (1), Chr.21 (1), Chr.22 (1), Chr.23 (1), Chr.25 (1)
vanHulzen y col., 2012	Elisa leche	MD	Chr.4 (1), Chr.15 (5), Chr.18 (1), Chr.28 (5)
Alpay y col., 2014	ELISA, Cultivo fecal	MD	Chr.2 (40), Chr.6 (10), Chr.7 (9), Chr.8 (8), Chr.15 (14) Chr.17(18), Chr.29 (16)
Zare y col., 2014	ELISA, Cultivo fecal	LD	Chr.1 (3), Chr.3 (7), Chr.5 (1), Chr.6 (2), Chr.7 (1) Chr.10(1), Chr.11 (2), Chr.13 (3), Chr.16 (1), Ch.17 (2), Chro.19 (1), Chr.23 (7)
Kiser y col., 2016	Cultivo tejido	WGS	Chr.3 (1), Chr.8 (2), Chr.10 (1), Chr.12 (2), Chr.14 (1), Chr.16 (4), Chr.21 (1), Chr.22 (8)
Brito y col 2018	ELISA leche	HD	Chr.1 (384), Chr.7 (9), Chr.9 (16), Chr.10 (2), Chr.14 (3) Chr.15 (5), Chr.17 (29), Chr.19 (63), Chr.21 (2), Ch.25 (11), Chr.27 (10)
Gao y col., 2018	ELISA	HD	Chr.1 (1), Chr.2 (2), Chr.3 (1), Chr.6 (1), Chr.7 (5), Chr.8 (1), Chr.11 (2), Chr.13 (2), Chr.16 (1), Chr.18 (2), Chr.20 (1), Chr.22 (1), Chr.23 (4), Chr.24 (1), Chr.27 (1)
Mallikarjunappa y col., 2018b	ELISA	HD	Chr.5 (3), Chr.6 (1), Chr.7 (3), Chr.10 (8), Chr.14 (3), Chr.15 (3), Chr.16 (17), Chr.20 (2), Chr.21 (1)
McGovern y col 2019	ELISA	WGS	Chr.1 (9), Chr.3 (2), Chr.5 (1), Chr.6 (1), Chr.8 (1), Chr.9 (5), Chr.10 (1), Chr.11 (3), Chr.13 (3), Chr.14 (2), Chr.18 (2), Chr.21 (1), Chr.23 (4), Chr.25 (1), Chr.26 (1), Chr.27 (1), Chr.29 (2)

En algunos de estos estudios se han identificado además, genes candidatos asociados a la susceptibilidad a la PTB (Tabla XVI). Estos genes candidatos se localizan en el QTL identificado normalmente en una ventana de aproximadamente 50 Kb a cada lado del SNP asociado.

Tabla XVI. Genes candidatos asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP e estudios GWAS

Referencia	BTA	Genes candidatos
Settles et al., 2009	BTA1	SOD1
	BTA3	FOXJ3, EDN2, CTPS, CITED4, NFYC
	BTA5	TRRAP, ALDH1L2, TAS2R42, MAGOHB, KLRA1, KLRJ1
	BTA7	SPOCK1
	BTA8	STC1
	BTA16	PARP1, POLR1D, PSEN2, CABC1, SCCPDH
	BTA21	BCL2A1, ZFAND6, MESDC2, IL16, MCEE
	BTA23	EEF1E1

2. INTRODUCCIÓN

Referencia	BTA	Genes candidatos
Kirkpatrick et al., 2010	BTA20	PTGER4
Minozzi et al., 2010	BTA9	PRDM1, PREP
	BTA11	E2F6, PQLC3, C2o50, KCNF1, PDIA6, ATP6V1C2, NOL10, ODC1, HPCAL1
	BTA12	GPC6, TYRP2, TGDS, GPR180, SOX21, ABCC4
Pant et al., 2010	BTA1	TUBA3D
	BTA5	CCDC59, TMTC2, FAM113B, AMIGO2, SLC38A4, SLC38A2, SLC38A1, SFRS2IP, ARID2, PRICKLE1, PPHLN1, ZCRB1, YAF2, GXYLT1, TMTC1, OVCH1, ERGIC2, FAR2, TM7SF3, CCDC91, PTHLH, KLHDC5, MRPS35, FGFR10P2, PPFIBP1, ARNTL2, STK38L, MED21, ITPR2
	BTA6	CRMP1, EVC, EVC2, STX18, STK32B, MSX1, CYTL1
	BTA7	IRF1, IL5, IL13, IL4, SSBP2, ATG10, XRCC4
	BTA10	NARG2, ANXA2, FOXB1, ADAM10, GRINL1A, BNIP2, GTF2A2, LIPC, TCF12, MYO1E, CCNB2, RNF111, AQP9, GLDN, SCG3, LYSMD2, TMOD2, TMOD3, LEO1,GNB5, MYO5C, AP4E1, TRPM7, USP50, USP8, GABPB2, HDC, SLC27A2
	BTA11	PRKCE, EPAS1, ATP6V1E2, PIGF, CRIPT, SOCS5, MCFD2, TTC7A, EPCAM, MSH2, KCNK12, MSH6, FBXO11
	BTA14	ANGPT1, RABL4, RSPO2, EIF3E, TTC35, TMEM74, TRHR
Minozzi et al., 2012	BTA1	SSRG, SCL33A1, LDLRAD3, KCNAB1, GMPS, SOD1, HUNK, SFRS15,
	BTA12	CFTR/MRP, ABCC4
	BTA15	LDLRAD3, PAMR1, CACNA1B, COMMD9
vanHulzen et al., 2012	BTA4	DLD, Q28899, LAMB4,Q6Q146, PNPLA8, LOC784335, Q2YDK7, Q17QP5, EPDR1
	BTA15	KCNA4, FSHB, LOC747832, A5PJ77, CK046
	BTA18	A2VDX5, IRX5
	BTA28	ACM3, Q2SX15, ENSBTAG00000018960, ZNF25, ZNF334, LOC534200, ENSBTAG00000013592, BMS1, RET, CSGALNACT, Q5E9S7
Alpay et al., 2014	BTA7	IL12B, SLCO6A1, TIMD4, ITK,
	BTA8	C5
	BTA15	CD44
Zare et al., 2014	BTA3	CCDC17, ZNF 684
	BTA6	TCF19, UBE2K
	BTA17	FAM109A
	BTA23	MHC, UBD, HIVEP1
Kiser et al., 2016	BTA3	BCAR3
	BTA10	FLVCR2, C10H14ORF1
	BTA12	RASA3, MGC134473
	BTA16	MARK1, C16H1orf115, MARC2, CDC42BPA
	BTA22	ITPR1, CNTN4

Referencia	BTA	Genes candidatos
Brito et al., 2018	BTA1	CD86, CASR, ZBTB20, MIR568, ZPLD1, KALRN, LOC101909195, ALCAM, TFG, STXBP5L, ZBTB20, CADM2, LOC529036, ADGRG7, LOC5290363
	BTA7	ENSBTAG00000044325
	BTA9	THBS2, RPS6KA2
	BTA10	SDR39U1, TBC1D21, KHNYN, CBLN3, NYNRIN
	BTA14	ENSBTAG00000047065, ENSBTAG00000045815
	BTA15	ENSBTAG00000024648
	BTA17	TDO2, ENSBTAG00000011063, ENSBTAG00000042385, ASIC5, GLRB, ADGRD1, TTC29, ENSBTAG00000044838
	BTA19	IGF2BP1, CCDC42, MFSD6L, ENSBTAG00000043290, PIK3R5, PIK3R6, RNFT1, NTN1, ENSBTAG00000044065, NOL11, WNT9B
	BTA25	TNRC18, FBXL18, ATP2A1, RABEP2, SH2B1, ENSBTAG00000032122, TUFM, ENSBTAG00000047397, NFATC2IP, ATXN2L
	BTA27	ZMAT4, LOC536257, IDO1, IDO2, ENSBTAG00000044907
Gao et al., 2018	BTA1	RF00100
	BTA2	TAF12, RF00190, RF00405, RF00420, RF00608, TRNAU1AP, RCC1, RF00045, PHACTR4, RF00561, MED18, SESN2, ATP5IF1, DNAJC8, PTAFR, EYA3, XKR8, SMPDL3B, RPA2; THEMIS2, PPP1R8, RF00553, STX12, FAM76A, IFI6, FGR, AHDC1, WASF2, TINAGL1, FABP3, ZCCHC17, SERINC2, SNRNP40, NKAIN1, PUM1, RF00188, SDC3, LAPTM5, MATN1
	BTA6	QDPR, CLRN2, MRFAP1L1, BLOC1S4, KIAA0232, TBC1D14, CCDC96, bta-mir-2453, TADA2B, GRPEL1
	BTA7	RF00001, FNIP1, RF00026, RF00100, CDC42SE2, LYRM7, HINT1, CHSY3, KIAA1024L, ADAMTS19, STK32A, DPYSL3, JAKMIP2, SPINK1, SCGB3A2, C7H5orf46, RF00026, SPINK5, SPINK6, FBXO8, CEP44, RF00003, HPGD, GLRA3, IL4, IL13, RAD50, IL5, IRF1, SLC22A5, SLC22A4, bta-mir-2457, PDLIM4, P4HA2, RF00026, CSF2, IL3, ACSL6, RF00001, FNIP1, STK32A, DPYSL3, JAKMIP2, SPINK1, SCGB3A2, C7H5orf46, RF00026, SPINK5
	BTA11	MALL, MAL, MRPS5, ZNF514, ZNF2, PROM2, FAHD2A, GPAT2, ADRA2B, ASTL, DUSP2, STARD7, TMEM127, CIAO1, SNRNP200, ITPRIPL1, NCAPH, NEURL3, ARID5A, KANSL3, RF00026, FER1L5, LMAN2L, CNNM4, CNNM3, ANKRD23, ANKRD39, SEMA4C, FAM178B, COX5B, ACTR1B, ZAP70, TMEM131, VWA3B
	BTA13	MYO3A, GJD4, FZD8, RF00619, btamir11, GATA5, RBBP8NL, CABLES2, RPS21, btamir2306, LAMA5, ADRM1, OSBPL2, PSMA7, HRH3, MTG2, SS18L1, TAF4, CDH4
	BTA16	PLD5, BECN2, MAP1LC3C, EXO1, WDR64, CHML, KMO, FH, RGS7
	BTA18	CDH11, OPA3, GPR4, EML2, bta-mir-330, GIPR, SNRPD2, QPCTL, SIX5, DMPK, DMWD, RSPH6A, SYMPK, FOXA3, NANOS2, NOVA2, CCDC61, bta-mir-769, PGLYRP1, HIF3A, PPP5C, PNMA8A, CCDC8, CALM3, PTGIR, GNG8, DACT3, PRKD2, bta-mir-2897, FKRP, SLC1A5, AP2S1, ARHGAP35, NPAS1, TMEM160
	BTA20	RF00001, RF00026, PARP8, RF00085
	BTA22	GOLGA4, CTDSPL, bta-mir-2367, bta-mir-26c, VILL, PLCD1, DLEC1; ACAA1, MYD88, OXSR1, SLC22A13, SLC22A14, XYLB
	BTA23	PACSIN1, C23H6orf106, RF00001, SNRPC, RF00066, RF00156, UHRF1BP1, TAF11, ANKS1A, TCP11, SCUBE3, ZNF76, DEF6, PPAR, FANCE, RPL10A, TEAD3, TULP1, RCAN2, CYP39A1, RF00026, SLC25A27, PLA2G7, ANKRD66, MEP1A, ADGRF5, ADGRF1, TNFRSF21, CD2AP, MIC1, POU5F1, TCF19, CCHCR1, PSORS1C2, CDSN, C6orf15, RF00026, SFTA2, RF00026, VARS2, GTF2H4, DDR1, FLOT1, TUBB, NRM, MDC1, PPP1R18, DHX16, C23H6orf136, ATAT1, MRPS18B, PPP1R10, ABCF1, bta-mir-2378, PRR3, GNL1, TRIM39-RPP21, BOLANC1, JSP.1, BOLA, TRIM26, TRIM15, TRIM10, TRIM40, TRIM31, CARMIL1
	BTA27	TOP2B, RF00001, RARB

2. INTRODUCCIÓN

Referencia	BTA	Genes candidatos
Mallikarjunappa et al., 2018	BTA5	CCDC91, PTHLH, FAR2, MANSC, REP15, PPFIBP1, ERGIC2, KLHDC5, MANSC4, MRPS35, ARNTL2, STK38L, MED21, TM7SF3, FGFR1OP2, ASUN, ITPR2
	BTA6	PAPSS1, DKK2, SGMS2, CYP2U1, HADH, LEF1
	BTA7	NLRP3, IFI47, OR2B11, TRIM52, GNB2L1, TRIM41, OR2C3, TRIM7, OR2G2, OR2V2, BTNL9, COX7B, OR2G3
	BTA10	GTF2A2, BNIP2, GCNT3, FAM81A, MYO1E, FOXB1, CCNB2, RNF111, ANXA2, FAM63B, NARG2, RORA, ADAM10, AQP9, ALDH1A2, POLR2M, CYP19A1, AP4E1, GLDN, DMXL2, SPPL2A, TRPM7, SCG3, USP50, USP8, LYSMD2, TMOD2, GABPB1, HDC, TMOD3, LEO1, SLC27A2, MAPK6, TBPL2, TBPL2, ATG14, FBXO34, KTN1, DLGAP5, LGALS3, MAPK11P1L, SOCS4, WDHD1, GCH1, SAMD4A, PELI2, MIR2292, CGRRF1, GMFB, CNIH, CDKN3
	BTA14	SAMD12, MIR2489, EXT1, TNFRSF11B, MED30, COLEC10, MAL2, EIF3H, UTP23, RAD21, AARD, TRPS1
	BTA15	HTR3B, USP28, HTR3A, CLDN25, ZW10, ZBTB16, TMPRSS5, DRD2, RBM7, REXO2, TTC12, NCAM1, NXPE4
	BTA16	TNNT2, LAD1, TNNI1, CSRP1, IPO9, TIMM17A, SHISA4, MIR2320, TPRG1L, MIR551A, ARHGEF16, PRDM16, TNFRSF18, TNFRSF4, DNAJC16, CASP9, CELA2A, AGMAT, CTRC, EFHD2, PLEKHM2, SLC25A34, TMEM82, FBLIM1, SPEN, TMEM51, ZBTB17, KAZN, SAMD11, NOC2L, KLHL17, C16H1orf170, HES4, ISG15, AGRN, RNF223, C16H1orf159, ACAP3, SCNN1D, PUSL1, CPSF3L, GLTPD1, MIR200B, C16H1orf233, MIR200A, MIR429, AURKAIP1, CCNL2, MRPL20, ANKRD65, SDF4, B3GALT6, FAM132A, UBE2J2, DVL1, MXRA8, TMEM88B, VWA1, ATAD3A, PRAMEF12, CYB5R1, ADIPOR1, KLHL12, RABIF, ZBTB37, PDPN, KDM5B, C16H1orf158, PRDM2, PRDX6, RABGAP1L, SLC9C2, ANKRD45, KLHL20, CENPL, DARS2, SERPINC1
	BTA20	HCN1, EMB, MRPS30, PARP8, SNX18, HSPB3, ESM1, GZMK, ARL15, GZMA, CDC20B, GPX8, MIR449A, MCIDAS, CCNO, DHX29, PPAP2A, SLC38A9, NDUFS4
	BTA21	PACS2, CRIP1, C21H14orf80, BRF1, BTBD6, NUDT14, JAG2, GPR132, CDCA4, C21H14orf79, AHNAK2, PLD4, KIAA0284, ZBTB42, SIVA1, ADSSL1, INF2, TMEM179, NRAC
	McGovern et al., 2019	BTA1
BTA3		DNAJC6
BTA9		ZDHHC14
BTA10		SNX1
BTA11		NPAS2, RNF149, RFX8, TACR1
BTA13		XKR7, SLA2
BTA14		HAS2, CPA6
BTA18		TEX101, ENSBTAG00000040392
BTA23		F13A1, CDYL
BTA26	PRKG1	

2.10.1.2. Resistencia a la infección por MAP

Los animales resistentes a la infección por MAP, son aquellos que son capaces de eliminar o limitar la bacteria en los estadios iniciales de la infección gracias a una respuesta inmune innata eficaz o porque no presenten un receptor necesario para el establecimiento de la infección. Mientras un animal con un resultado positivo a un test diagnóstico estará muy probablemente infectado, un animal puede dar resultado falso negativo por no haber estado expuesto a MAP o por ser realmente

resistente. Por ello, no existen muchos estudios que hayan identificado variantes asociadas a la resistencia a la infección. Sánchez y col., llevaron a cabo un estudio multiraza (Frisona y Normanda) con datos de genotipado imputado a WGS (Sanchez y col., 2020). En este estudio los animales se diagnosticaron mediante dos ELISAs con un intervalo de 8 meses entre ambos y PCR de heces. De este modo, los animales se clasificaron como controles, casos sin signos clínicos y casos con signos clínicos. Tanto los casos como los controles procedían de los mismos rebaños para asegurar igual exposición a la bacteria.

Tabla XVII. QTLs asociadas a la resistencia a la PTB en un estudio multiraza. Los fenotipos se definen como 0 (animales control; negativos a ELISA y PCR y sin signos clínicos), 1 (animales infectados sin signos clínicos) y 2 (animales infectados con signos clínicos) Adaptado de Sánchez y col., 2020.

Raza	Fenotipo	BTA	Nº de variantes significativas	$-\log_{10}(P)$	SNP ID	Efecto	Gen Candidato
Normanda	0/1	23	7	6,4	rs134517431	— 0,17	<i>BOLA-DRB2</i>
Normanda	0/1	23	1	6,4	rs110031509	— 0,15	<i>NOTCH4</i>
Normanda	0/1	23	7	7,0	rs208517124	— 0,17	<i>TRIM15</i>
Normanda	0/1	23	25	6,9	rs108942026	— 0,17	—
Holstein	0/1	12	268	9,4	rs378812903	— 0,16	—
Holstein	0/1	12	281	10,8	rs43161232	— 0,19	—
Holstein	0/1	12	144	8,5	rs43047348	— 0,15	—
Holstein	0/1	12	6	7,7	rs43104474	— 0,18	—
Holstein	0/1	12	215	8,5	rs378568583	— 0,14	—
Holstein	0/1	12	6	7,5	rs379488452	— 0,14	<i>UBAC2</i>
Holstein	0/1	13	20	18,5	rs109570209	— 0,34	—
Holstein	0/1	23	39	7,1	rs210372926	— 0,11	<i>PKHD1</i>
Holstein	0/1	23	360	8,8	rs209183236	— 0,12	<i>ELOVL5</i>
Holstein	0/1	23	114	8,2	rs470365293	— 0,17	<i>ENSBTAG00000023541</i>
Holstein	0/1	23	13	7,4	rs109539043	— 0,13	<i>IER3</i>
Holstein	0/1/2	12	31	6,9	rs110051821	— 0,21	—
Holstein	0/1/2	12	267	8,7	rs41667085	— 0,28	<i>ABCC4</i>
Holstein	0/1/2	12	3	6,7	rs382007737	— 0,25	—
Holstein	0/1/2	12	125	7,4	rs463644618	— 0,56	—
Holstein	0/1/2	12	65	7,0	rs383583316	— 0,17	—
Holstein	0/1/2	13	20	38,1	rs109570209	— 0,71	—
Holstein	0/1/2	23	456	8,9	rs210655104	— 0,24	—
Holstein	0/1/2	23	345	9,0	rs470365293	— 0,26	<i>ENSBTAG00000023541</i>
Holstein	0/1/2	23	9	7,4	rs209284762	— 0,21	—

Con esta aproximación se identificaron un total de 2827 polimorfismos de nucleótido único (Single nucleotide polymorphism; SNP) asociados a la resistencia distribuidos en 20 loci de rasgos cuantitativos (Quantitative trait locus; QTLs). Para confirmar que las variantes identificadas estaban realmente asociadas al carácter estudiado y que esta asociación no se debía al desequilibrio de ligamiento, las variantes con un efecto más significativo se analizaron con un GWAS condicional en el que cada una de estas variantes se incluía como efecto fijo en el modelo. De las 10 variantes incluidas en el análisis condicional para el BTA 23, dos se localizaban en regiones intrónicas de los genes *ELOVL5* y *ENSBTAG00000023541* y una en la región 3' del gen *IER3*, por lo que estos genes

2. INTRODUCCIÓN

podrían considerarse genes candidatos asociados a la resistencia a la infección por MAP. Sin embargo, el punto de corte establecidos para determinar la significación de las variantes fue muy laxo $P < 10^{-6}$ y la corrección por múltiples positivos llevada a cabo no incluyó el número de SNPs analizados en total (7 millones). En la tabla XIII se muestran los resultados de este estudio.

2.10.1.3. Tolerancia a la PTB

Tal y como se ha descrito anteriormente los animales tolerantes son aquellos capaces de activar una serie de mecanismos dirigidos a controlar el daño tisular provocado por el patógeno, si su respuesta inmune no es capaz de eliminar a la bacteria. No obstante, la tolerancia a la enfermedad no debe ser confundida con la tolerancia inmunológica, definida como la ausencia de respuesta frente a antígenos propios.

En el caso de la PTB, el único estudio de tolerancia reportado hasta la fecha se llevó a cabo vacas frisonas con datos de genotipado imputado a WGS (Zanella y col., 2011). En este estudio la tolerancia se definió como la aptitud física del animal a una determinada intensidad de infección mediante el cálculo de un índice de tolerancia basado en los resultados obtenidos en el cultivo de muestras de heces y tejidos para cada animal. La intensidad de la infección se determinó mediante el cultivo de MAP a partir de 4 muestras de tejidos (íleon, válvula ileocecal y dos linfonodos ileocecales) y la aptitud física, a partir de los resultados del cultivo de 4 muestras de heces para cada animal. Para el cálculo de la aptitud física, el pico o valor máximo (CFUs) de los cuatro cultivos de heces se dividió entre el valor medio. Para el cálculo de la intensidad de la infección, el pico o valor máximo (CFUs) de los cuatro cultivos de tejidos se dividió entre el valor medio. El índice de tolerancia corresponde al ratio entre la aptitud física y la intensidad de infección. Tras realizar el GWAS se identificaron 5 SNPs asociados a la tolerancia, que se muestran en la tabla XIV.

Tabla XVIII. Variantes genéticas asociadas a la tolerancia identificadas mediante un fenotipo cuantitativo de tolerancia. Basado en Zanella y col., 2011.

SNP	BTA	Posición (pb)	P
ss61512613:A>G	6	51 851 115	2.99×10^{-5}
ss61530518:A>G	6	51 772 056	3.00×10^{-5}
rs41748405:A>C	15	21 254 061	1.12×10^{-7}
ss86284768:A>G	1	120 575 774	3.31×10^{-5}
ss61469568:A>G	2	64 266 247	3.32×10^{-5}

2.10.2. Estudios de variantes alélicas reguladoras

Tal y como se ha explicado anteriormente, los análisis de asociación de tipo GWAS son capaces de identificar variantes alélicas asociadas a la infección, pero estos polimorfismos no son necesariamente variantes reguladoras o causales de la misma. Para determinar si una variante es causal debe asociarse con cambios en la expresión génica que a su vez produzcan cambios en la respuesta del animal durante la infección, traduciéndose en un cambio en el fenotipo.

Un locus de expresión de rasgo cuantitativo (expression quantitative trait loci; eQTL) es un polimorfismo generalmente localizado en las regiones reguladoras de genes cuya expresión controlan en función del alelo presentado. Los eQTLs localizados a una distancia igual o menor a 1Mb del punto de inicio de transcripción del gen regulado, *cis*-eQTLs, pueden regular la transcripción del mismo, la estabilidad del RNAm producido y procesos de splicing de dicho RNAm (Wittkopp, 2005; Westra & Franke, 2014). De esta manera, los *cis*-eQTLs pueden modificar los niveles de expresión génica provocando cambios en el fenotipo. La identificación de este tipo de variantes tiene un interés especial por ser responsables de cambios directos en el fenotipo pudiendo suponer variantes causales de una mayor susceptibilidad/resistencia/tolerancia a la PTB.

Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se produce la modificación del fenotipo puede variar, existiendo diferentes procesos: causalidad, pleiotropía o ligamiento. En la figura 17 se representa la asociación entre la expresión génica y el fenotipo mediante el genotipo; a la izquierda (a) se observa un modelo de causalidad donde las diferencias en el fenotipo está causada por una única variante alélica (AA, Aa, aa) que afecta a la transcripción génica. A la derecha de la figura (b), se muestran las tres posibilidades que explicarían la asociación observada entre un carácter y la expresión génica a través del genotipo. Mientras que en la causalidad una única variante tiene un efecto directo sobre la transcripción y ésta, a su vez, sobre el fenotipo, en la pleiotropía una variante puede ejercer efectos directos tanto en el fenotipo como en la transcripción. Por otra parte, en el ligamiento, existen 2 variables: una afectando directamente a la transcripción y otra al fenotipo, heredándose ambas variables de manera conjunta (Zhu y col., 2016).

2. INTRODUCCIÓN

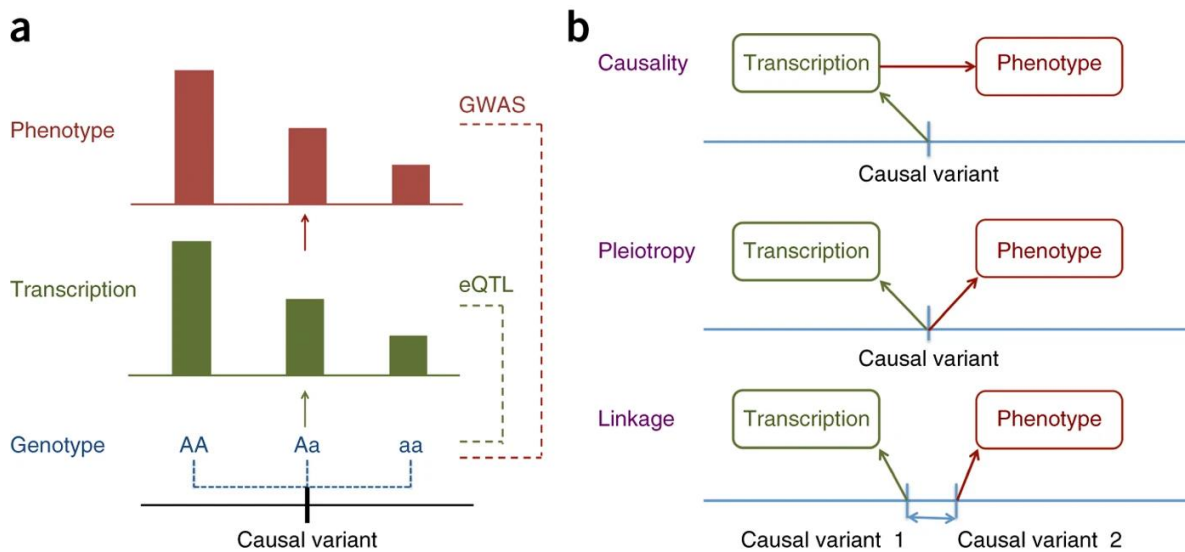


Figura 17. Representación esquemática del efecto de *cis*-eQTLs en la transcripción génica y fenotipo del animal. A la izquierda (a) se representa la relación entre genotipo, transcripción y fenotipo señalando el tipo de estudio empleado en cada caso. A la derecha (b) representación esquemática de los posibles efectos de los *cis*-eQTLs en transcripción y fenotipo: causalidad, pleiotropía y ligamiento (Zhu y col., 2016)

En el caso de la PTB, existen muy pocos análisis de este tipo (Aryngazyev y col., 2020; Kiser y col., 2021). En el estudio de Aringazyev y col. se parte de 3 regiones polimórficas previamente descritas en la bibliografía como asociadas a la PTB: un intrón y una región promotora del gen *SLC11A1* y un intrón del gen *NOD2/CARD15* (Aryngazyev y col., 2020). Dichas regiones fueron analizadas mediante varias herramientas bioinformáticas para la detección de puntos de unión de factores de transcripción (binding sites for transcription factors; TFBS). Posteriormente los TFBS identificados fueron analizados mediante ensayos *in vitro* de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic Mobility Shift Assays; EMSA). El ensayo EMSA no mostró ningún cambio significativo asociado a los alelos analizados, por lo que no se pudo demostrar la capacidad reguladora de los SNPs estudiados.

Por otro lado, Kiser y col., estudiaron una región de 235 kilo bases (Kb) localizada en el BTA3 cercana al gen de la *Endotelina 2* (*Endothelin 2*; *EDN2*) que se había asociado previamente con la infección por MAP (Kiser y col., 2021). El objetivo era identificar variantes causales de la susceptibilidad a la infección por MAP en vacas de raza frisona (N= 221) y Jersey (N= 51). Los animales se clasificaron en casos y controles en función de los resultados de PCR y cultivo de tejidos. Tras el control de calidad de los datos de genotipado llevado a cabo con un array diseñado para la zona objeto de estudio, se analizaron 44 SNPs para la población de vacas frisonas y 53 para las vacas Jersey. El análisis de asociación llevado a cabo identificó 24 SNPs significativos en la población de vacas frisonas y 13 en la población Jersey, siendo seleccionados para análisis posterior los 18 SNPs más significativos asociados a la infección en ambas razas. Los 18 SNPs fueron

analizados mediante EMSA para determinar si tenían relación con proteínas de unión nucleares en el linfonodo ileocecal, ya que estas proteínas controlan la producción de mRNA en la célula. Las variantes alélicas de 2 de los 18 SNPs mostraron diferencias significativas en la afinidad por dichas proteínas.

Estos estudios suponen los primeros intentos por identificar variantes causales de la enfermedad o eQTLs con consecuencias directas sobre el fenotipo. Sin embargo, ninguno emplea un enfoque global para la localización de variantes causales a lo largo de todo el genoma.

2.10.3. Programas de selección genética

Los programas de selección genética son un conjunto de actuaciones destinadas a conservar y/o mejorar las características fenotípicas y/o genotípicas deseadas en la raza objetivo. Tradicionalmente, los programas de selección han estado dirigidos a la mejora productiva de los animales sin tener muy en cuenta otros parámetros como los sanitarios o de bienestar animal. Recientemente, se ha demostrado que la selección de animales por parámetros productivos sin tener en cuenta parámetros sanitarios incrementa la incidencia de problemas de salud como mastitis, retención de membranas placentarias o problemas gastrointestinales (Aleri y col., 2016). La causa de esta relación antagonista podría explicarse por el hecho de que una vaca altamente productiva estaría sometida a un mayor estrés metabólico, lo que conduciría a la inmunosupresión del animal y al aumento de la susceptibilidad a enfermedades. De hecho, es difícil encontrar animales con alto potencial de producción y buenos parámetros para el recuento de células somáticas, días abiertos o fertilidad. Por ello, lo ideal a la hora de seleccionar animales, sería buscar un equilibrio entre los caracteres productivos y los sanitarios y seleccionar aquellos animales con altos índices de selección para ambos tipos de caracteres. Bo (Bo, 2009) estableció que los objetivos de los programas de selección de ganado bovino deberían tener en cuenta una serie de características: incremento del beneficio económico (mayor producción láctea), reducción de costes (mayor fertilidad, menor incidencia de enfermedades y menor tasa de sacrificios), facilidad de manejo (selección por temperamento, velocidad de ordeño) y ventajas en la venta del producto final (bienestar animal, ética e intereses de los consumidores). Puesto que solo los animales en buen estado de salud son capaces de ser altamente productivos y vivir más tiempo, los programas de selección se están centrando en mejorar los rasgos funcionales (Rauw y col., 1998; Zwald y col., 2010). El desafío radica en equilibrar altos niveles de producción y fertilidad con parámetros sanitarios y de longevidad en la selección genómica (Egger-Danner y col., 2014).

2. INTRODUCCIÓN

En el Reino Unido, la inclusión de la resistencia a la infección por *Mycobacterium bovis* entre los objetivos de los programas de selección, ha demostrado tener un efecto favorable en la longevidad y en el rendimiento económico de los animales. El 20% de su índice de selección, el índice de vida útil (Profit lifetime index; PLI) está representado por parámetros sanitarios y de fertilidad (Banos y col., 2017). Tsairidou y col., determinaron que en un plazo de 5 generaciones y, aplicando una presión selectiva del 50%, se podría reducir significativamente el riesgo epidémico relativo de la tuberculosis bovina a niveles inferiores al 0,1 (Tsairidou y col., 2018). La mejora genética basada la inclusión de marcadores genéticos de resistencia a enfermedades es un proceso a medio-largo plazo pero sus resultados son acumulativos y permanentes a través de generaciones pudiendo conducir a la erradicación de enfermedades.

En España, la Confederación de Asociaciones de Frisona Española (CONAFE) lleva a cabo un programa de mejora genética de la raza frisona en el que incluye diversos parámetros tanto productivos como funcionales. El objetivo de este programa es obtener animales con una alta capacidad de producción y una baja incidencia de enfermedades y problemas reproductivos. Para lograr estos objetivos es necesario definir criterios de selección a partir de los datos disponibles. El criterio de selección oficial de CONAFE es el índice combinado (ICO), que se utiliza para ordenar a los animales en función de la capacidad de éstos de transmitir a su descendencia una mejor combinación de caracteres, para mejorar la rentabilidad futura de las ganaderías. El ICO se establece teniendo en cuenta: la influencia de cada carácter en la rentabilidad, la respuesta genética que se puede obtener de ellos y los criterios y necesidades de los ganaderos. Dentro de este índice se incluyen parámetros productivos que suponen el 49% del mismo: Kilogramos de leche, kilogramos de grasa y kilogramos de proteína producidos. El 51% restante del peso porcentual del ICO incluye rasgos morfológicos como el índice de pies y patas (IPP) y el índice de conformación de la ubre (ICU), caracteres reproductivos como el número de días abiertos y parámetros sanitarios y funcionales como el recuento de células somáticas, la longevidad y el índice de salud podal (ISP).

En lo que respecta a la PTB, en 2020 establecimos una correlación positiva entre un mayor riesgo de progresión a PTB clínica y la mayoría de los rasgos productivos incluidos en el ICO en el programa de mejora de la raza frisona en España, confirmando que la selección basada en parámetros productivos penalizaría la salud de los animales, haciéndolos más susceptibles a la PTB (Canive y col., 2020). Sin embargo, la selección de caracteres productivos no tiene por qué ir en detrimento de los parámetros sanitarios. Brito y col., calcularon la correlación entre la resistencia a la PTB y diferentes rasgos productivos en Canadá, demostrando una correlación positiva entre parámetros productivos y sanitarios (Brito y col., 2018), lo que indica que es posible una selección

conjunta para obtener animales más productivos y, a su vez, más sanos y resistentes a diferentes enfermedades, incluida la PTB.

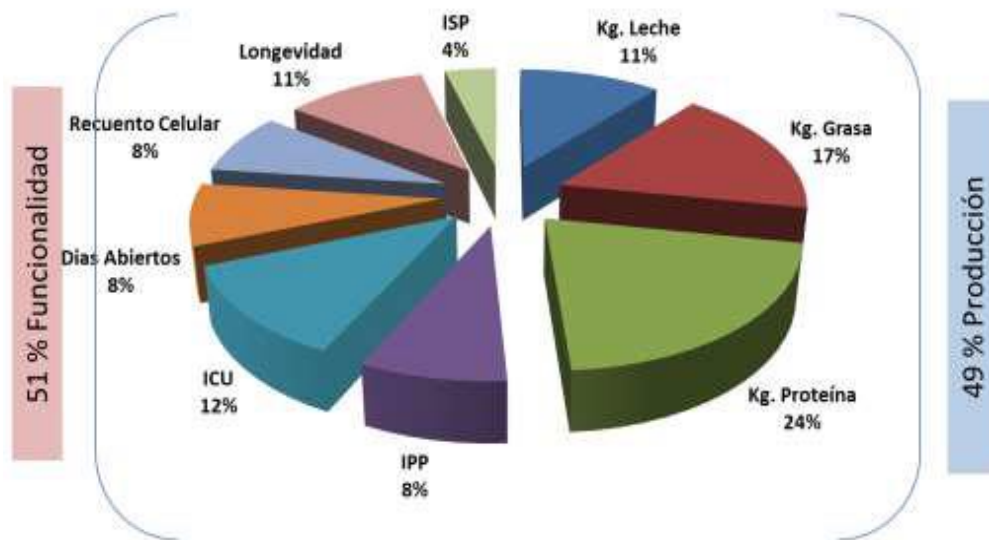


Figura 18. Pesos porcentuales de cada carácter en el ICO del programa de mejora genética de la raza frisona de CONAFE. El 49% del ICO está relacionado con parámetros productivos mientras que el 51% restante se basa en criterios de funcionalidad. ISP: Índice de salud podal; ICU: Índice compuesto de la ubre; IPP: Índice de patas y pies (CONAFE, 2019).

3. MARCO TEÓRICO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

3. MARCO TEÓRICO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La PTB es una enteritis granulomatosa crónica causada por MAP que afecta a rumiantes tanto domésticos como silvestres, compromete la salud y el bienestar animal y supone un importante problema económico y social. Además, la asociación de MAP con la enfermedad de Crohn y otras enfermedades en humanos la convierte en un patógeno potencialmente zoonótico. El control de la PTB se basa principalmente en la aplicación de medidas higiénico-sanitarias en las explotaciones y en la detección y el sacrificio de los animales infectados. Sin embargo, la eficacia de estas estrategias de control están fuertemente condicionadas por la disponibilidad de recursos económicos y humanos en las explotaciones ganaderas y por la falta de sensibilidad de los test diagnósticos para detectar animales subclínicos, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas herramientas que permitan la detección de animales subclínicos y un diagnóstico temprano de la infección. El desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva, como el RNA-Seq, ofrece nuevas posibilidades para conocer la interacción MAP-hospedador a un nivel más completo y para identificar biomarcadores que puedan ser utilizados en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, agentes terapéuticos y vacunas. En esta Tesis Doctoral, hemos utilizado el análisis transcriptómico por RNA-Seq para la identificación de genes diferencialmente expresados en animales con distintas lesiones asociadas a la PTB bovina en relación a animales sin infectar. Este trabajo es el primero en describir los cambios transcriptómicos que tienen lugar, de manera simultánea, en sangre periférica y en válvula ileocecal de ganado bovino infectado con MAP en condiciones naturales y con lesiones de diferente severidad (focales o difusas). Consideramos que las proteínas codificadas por los genes diferencialmente expresados podrían ser utilizadas como biomarcadores y permitir el desarrollo de nuevos test diagnósticos capaces de detectar animales subclínicos. Con estos nuevos métodos de diagnóstico basados en biomarcadores sería posible detectar a todos los animales infectados en la explotación, clínicos y subclínicos, lo que permitiría una posible certificación referente al status sanitario de las explotaciones en cuanto a PTB. Esto sería deseable de cara a ofrecer productos seguros al consumidor, obtener una posición privilegiada para la venta de productos de origen animal o disponer de un listado de ganaderías libres de PTB donde poder adquirir animales sanos para la cría.

Una de las ventajas que presenta la tecnología RNA-Seq es que la información obtenida puede combinarse con datos de genotipado para, mediante un enfoque genómico-transcriptómico, identificar variantes alélicas reguladoras y a la vez causales. Aunque los análisis de asociación de tipo GWAS han identificado polimorfismos asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP,

3. MARCO TEÓRICO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

los genes sobre los que estas variantes ejercen sus efectos son desconocidos y tan solo se han descrito algunas mutaciones funcionales para la PTB. La identificación de variantes alélicas asociadas a cambios de expresión de genes causales de la PTB tendría un gran potencial desde el punto de vista de la selección genómica porque permitiría seleccionar animales naturalmente menos susceptibles a la infección. Este es un enfoque muy novedoso y del que no existen estudios previos en el campo de la PTB.

Explorar la base genética de la enfermedad es necesario para una mejor comprensión de la misma y para la identificación de las variantes genéticas causales y asociadas a la PTB. Si bien las variantes causales de la enfermedad tienen un impacto directo en el fenotipo de cada animal y probablemente más notable que otras variantes al afectar directamente en la expresión génica, las variantes asociadas a la PTB identificadas mediante análisis GWAS también tienen su importancia, no solo para ser aplicadas en estrategias de mejora genética, si no para el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la enfermedad. Se sabe que la susceptibilidad a la infección por MAP es un rasgo complejo de carácter poligénico, es decir, que la susceptibilidad estaría controlada por un alto número de genes. Una condición fundamental de los análisis GWAS es disponer del mayor volumen posible de genotipos de animales así como una correcta definición del fenotipo en el mayor número posible de animales. Actualmente, es posible imputar a partir de los datos de genotipado la secuencia completa lo que permite llevar a cabo un análisis de asociación genética más completo. El volumen de datos empleado en estos estudios requiere de plataformas e infraestructuras bioinformáticas que permitan análisis de big-data y los análisis son complejos. Hasta la fecha, en los estudios GWAS la susceptibilidad a la infección por MAP se ha establecido en función de la positividad a los test diagnósticos utilizados, siendo la combinación de varios de ellos la mejor opción para definir casos y controles. En la presente Tesis Doctoral se han realizado estudios de asociación genética empleando los genotipos de una población de frisonas españolas (N= 983) y los resultados combinados de ELISA, PCR y cultivo de tejidos. También se han analizado las asociaciones de estos genotipos con los resultados del análisis histopatológico de los animales estudiados, algo que no se había realizado anteriormente. Además, en los estudios GWAS que se incluyen en la presente Tesis Doctoral, se han utilizado datos de genotipado imputados a secuencia completa ampliando el número de variantes analizadas respecto a estudios anteriormente realizados con chips. Únicamente tres estudios de los publicados hasta el momento, han utilizado datos de WGS y ninguno de ellos ha combinado test diagnósticos premortem y postmortem ni se ha centrado en el estudio de la base genética asociada a las distintas formas lesionales en las que se manifiesta la PTB.

3. MARCO TEÓRICO Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La mayoría de los estudios GWAS realizados hasta la fecha se han centrado en la identificación de variantes alélicas asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP, mientras que, solo un estudio, ha tratado de identificar variantes asociadas a la resistencia a la infección por MAP. Esto se debe a que mientras que animales con resultado positivo a los test diagnósticos son, con gran seguridad, animales infectados, los animales con resultado negativo podrían ser falsos negativos debidos a la baja sensibilidad de las técnicas de diagnóstico o por la falta de exposición a MAP. Dicho de otro modo, un resultado diagnóstico negativo no implica resistencia a la enfermedad. Aunque la susceptibilidad a la infección por MAP ha sido ampliamente estudiada, el conocimiento de la genética subyacente a la resistencia a la infección y la tolerancia a la enfermedad y de los mecanismos moleculares y celulares que controlan ambas formas de resiliencia en los animales asintomáticos es limitado. En la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de la tolerancia a la PTB mediante el uso de datos de genotipado a secuencia completa y una combinación de test diagnósticos con los que se confirma que el animal se ha infectado (PCR y cultivo de tejidos positivos) pero no ha desarrollado lesiones asociadas a la enfermedad por lo que ha sido capaz de tolerar la presencia del patógeno sin que esto le cause daño tisular remarcable.

En esta Tesis Doctoral hemos tratado de identificar marcadores genéticos que puedan ser utilizados en los programas de mejora para la selección de animales más tolerantes a la PTB y menos susceptibles a la infección por MAP. La aplicación de esta estrategia se traduciría en la disponibilidad de una herramienta preventiva, complementaria a las medidas de control ya existentes, para reducir el impacto económico de la enfermedad. La selección de estos animales beneficiaría especialmente a aquellas áreas geográficas con una alta prevalencia de la enfermedad y donde la vacunación no está permitida. Además, la mejora genética en cuanto a la tolerancia a la PTB podría conducir a mejoras simultáneas en la tolerancia a otras enfermedades y en una mejora en la longevidad, lo que repercutiría en una mayor productividad al ser capaces de aumentar el número de lactaciones por animal y reducir el reemplazo de animales. Los mecanismos asociados a tolerancia a enfermedades parecen ser inespecíficos, por lo que la selección de animales más tolerantes a la PTB también podría generar tolerancia a otros agentes estresantes y enfermedades lo que se traduciría, a su vez, en una disminución en el uso de antibióticos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Análisis transcriptómico mediante RNA-Seq para la identificación de genes diferencialmente expresados en sangre y tejido intestinal de animales con diferentes lesiones asociadas a la PTB en relación a animales sin lesiones

4.1.1. Animales seleccionados y diagnóstico de PTB

Se seleccionaron 14 vacas frisonas de una granja asturiana con una prevalencia de PTB del 6.29%. Los animales fueron analizados mediante ELISA, PCR y cultivo fecal anualmente durante el periodo 2016-2019 y, en el momento del sacrificio, fueron testados mediante PCR y cultivo bacteriológico de tejidos para la detección de MAP (Blanco-Vázquez y col., 2020). Para el ELISA se recogió sangre de la vena coccígea de los animales en tubos Vacutainer® de 4,5ml con activador de coágulo (Vacuette, Kresmunster, Austria). Los tubos se centrifugaron a 2500g durante 20 minutos y se conservaron a -20°C hasta el momento de realizar el ELISA. Las muestras de suero se analizaron mediante el *Mycobacterium paratuberculosis* antibody test kit (IDDEXX, Oofddorp, Países Bajos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la PCR fecal se aisló DNA genómico de las muestras de heces con el kit MagMax total nucleic acid isolation kit (Thermofisher scientific, Lissieu, Francia) y para la detección de DNA de MAP se utilizó el LSI VetMax Triplex real-time PCR (Thermofisher scientific, Lissieu, Francia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit permite la identificación de las secuencias IS900 y F57 de MAP. Adicionalmente, también se llevó a cabo una PCR cuantitativa con las muestras positivas a la primera PCR. En este caso, se utilizó el kit ParaTB Kuant-VK (Vacunek, Bizkaia, España) que utiliza una sonda marcada TaqMan para la detección de la secuencia f57 de MAP. Para el cultivo bacteriológico se emplearon homogeneizados de 2 gr de tejido de las diferentes secciones intestinales (válvula ileocecal, linfonodos ileocecales y linfonodo yeyunal distal) por un lado y de heces por otro, y tras un proceso de descontaminación con 38 ml de hexadecilpiridinio monohidrato a una concentración de 0,75% (Sigma, St Louis, MO), se homogenizaron en un digestor (Stomacher®, Seward, Reino Unido). Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se traspasaron 15 ml de la solución a un tubo limpio y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente para que sedimentase. Unos 200 µl de la suspensión se cultivaron por duplicado en medios Herrold (HEYM; Becton Dickinson, Sparks, MD) y Lowenstein-Jensen (LJ; Difco, Detroit, MI) ambos suplementados con micobactina J a razón de 2 mg/l (Allied Monitor, Fayette, MO). El cultivo se consideró positivo si se observaba crecimiento en cualquiera de los 4 tubos y, aquellas muestras con 0 CFUs en los 4 medios fueron consideradas negativas. La carga bacteriana de las muestras positivas se clasificó en función del número de CFUs observadas pudiendo ser baja (<10

4. MATERIAL Y MÉTODOS

CFUs), media (10-50 CFUs) o alta (>50 CFUs). También se llevó a cabo al análisis histopatológico de diferentes secciones del intestino (válvula ileocecal, yeyuno distal, linfonodos ileocecales y linfonodo yeyunal distal). Las muestras fueron recogidas asépticamente y conservadas en formalina en las 24 horas posteriores a su llegada al laboratorio, fueron fijadas en un buffer de formalina al 10% durante 72 horas, deshidratadas con diluciones de alcohol y xilol y embebidas en parafina para posteriormente, ser cortadas en secciones de 4 μm . Estos cortes se tiñeron mediante tinciones HE y ZN y fueron analizados por microscopía. De acuerdo a la localización, extensión, el tipo de células inflamatorias observadas y al número de micobacterias, las lesiones se clasificaron en focales o difusas (linfocíticas, intermedias y multibacilares) (González y col., 2005). Para el análisis RNA-Seq se seleccionaron 3 animales negativos a todos los test y sin lesiones histopatológicas visibles, 6 animales con lesiones focales y 5 animales con lesiones difusas.

4.1.2. Extracción de RNA y preparación de librerías

En el momento del sacrificio, se recogieron muestras de sangre periférica de la vena coccígea de los animales en tubos PAXgene Blood RNA tubes 2.5ml (Qiagen, Hilden, Alemania) y se extrajo el RNA de las muestras con el kit PAXgene blood RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). Por otro lado, para la extracción de RNA de tejido intestinal, se recogieron 150-200 mg de válvula ileocecal en RNA later (Sigma, St Louis, MO, US). La purificación del RNA se llevó a cabo con el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y el DNA genómico residual se eliminó con DNase digestion RNase-free DNase I Amplification grade (Invitrogen, España). La concentración y calidad del RNA extraído se analizó con el Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). Todas las muestras presentaron un valor de integridad del RNA de 7 o superior. Aproximadamente 250ng de RNA fueron utilizados para la creación de las librerías mediante el Illumina NEBNext Ultra Directional RNA Library preparation kit (Illumina Inc, CA, US). La calidad de las librerías fue comprobada con el Agilent Bioanalyzer y el Agilent high sensitivity DNA chip (Agilent, California, US) para confirmar que el tamaño de los fragmentos de las librerías era de 200-250 pares de bases (pb).

4.1.3. Secuenciación del RNA y análisis bioinformático

Las librerías de RNA-Seq se secuenciaron en formato single-end 1x75 utilizando el secuenciador Illumina NextSeq500 (Illumina Inc, CA, US) en la unidad de genómica del Parque Científico de Madrid. Las lecturas en bruto se clasificaron por su longitud (mínimo 60 pb) y por el número de bases no identificadas (máximo 5%) con Prinseq-lite (Schmieder & Edwards, 2011). A continuación, las lecturas se mapearon en el genoma de *Bos taurus* (Bos_taurus.UMD3.1. versión 87) con Tophat (Trapnell y col., 2009). A partir de los alineamientos obtenidos, se generó un

transcriptoma para cada animal empleando Cufflinks (Trapnell y col., 2012). Los transcriptomas se fusionaron en un único transcriptoma mediante Cuffmerge (Trapnell y col., 2012) proporcionando así, una base para determinar los niveles de expresión de genes y transcritos para cada animal. A partir del transcriptoma generado y de las lecturas mapeadas, se calcularon los niveles de expresión génica para cada animal, así como los valores de P y valores de P corregidos (False discovery rate; FDR) (Benjamini & Hochberg, 1995) entre las distintas condiciones empleando Cuffdiff (Trapnell y col., 2012). Aquellos genes que presentaron un valor de FDR $\leq 0,05$ se consideraron diferencialmente expresados en relación al grupo control. En la figura 19 se muestra el flujo de trabajo seguido para el análisis de la expresión diferencial de genes.

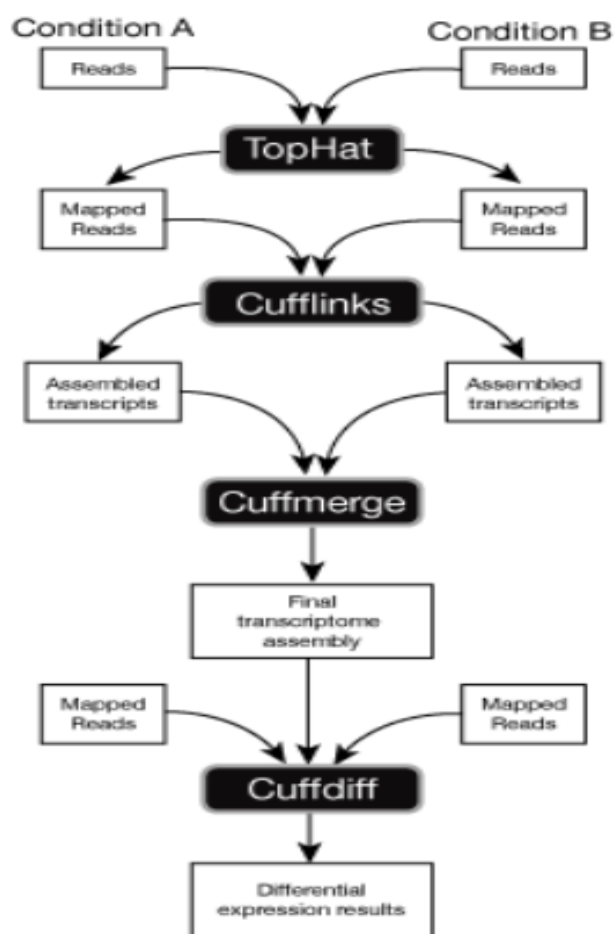


Figura 19. Flujo de trabajo seguido para el análisis de la expresión diferencial de genes (Trapnell y col., 2012)

4.1.4 Análisis metabólico y de ontologías génicas

Para la identificación de ontologías génicas (Gene ontology; GO) y rutas metabólicas enriquecidas, se analizaron los genes diferencialmente expresados para cada comparación con GSeq R Bioconductor (Rivals y col., 2007; Young y col., 2010). Las GOs identificadas se clasificaron en 3 categorías: procesos biológicos (BP; biological process), funciones moleculares (MF; molecular function) y componentes celulares (CC; celular component). Aquellas GOs que

4. MATERIAL Y MÉTODOS

presentaron un valor de P corregido $\leq 0,05$ fueron consideradas como significativas. De manera complementaria se llevó a cabo un análisis de rutas metabólicas enriquecidas utilizando la herramienta online STRING v11.0 (Szklarczyk y col., 2019).

4.1.5. Análisis de asociación proteína-proteína

Los genes con expresión diferencial ($\log_2\text{fold} < -2$ y > 2), se analizaron empleando la base de datos STRING v10.5 (Szklarczyk y col., 2017). La unidad de asociación básica de esta base de datos es la asociación funcional como es el caso de proteínas que contribuyen a la misma función específica. Solo las interacciones funcionales con un elevado nivel de confianza ($> 0,7$) se incluyeron en las redes de asociación proteína-proteína.

4.1.6. RT-qPCR

Para la validación de los resultados de RNA-Seq se seleccionaron 8 de los genes diferencialmente expresados. Cuatro genes diferencialmente expresados en sangre: *Miembro 13 de la subfamilia A de casetes de unión a ATP (ATP Binding Cassette Subfamily A Member 13 ; ABCA13)*, *Desmina (Desmin; DES)*, *Ligando de quimioquina C-X-C 10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10 ; CXCL10/IL10)* y *Ligando de quimioquina C-X-C 8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 ; CXCL8/IL8)* y 4 en válvula ileocecal : *Intelectina 2 (Intelectin 2; ITLN2)*, *Proteína de unión a ácidos grasos 6 (Fatty Acid Binding Protein 6; FABP6)*, *Proteína de choque térmico de la familia A, miembro 6 (Heat Shock Protein Family A Member 6; HSPA6)*. Se partió de los RNAs extraídos descritos en el punto IV.1.2. Para la conversión de 25 ng de RNA a DNA complementario (Complementary DNA; cDNA) se utilizó el RT2 First Strand Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Germany). Posteriormente, se llevó a cabo una RT-qPCR mediante el RT2 qPCR Primer Assays con RT² SYBR® Green Mastermix (Qiagen, Hilden, Alemania) y 1 μl de cDNA. Como gen de referencia se utilizó el *Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; GAPDH)* que se expresa de manera constitutiva en PB e ICV. Se determinó la eficacia de amplificación de cada gen y para el cálculo de cuantificación de la expresión se utilizó el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ integrado en el LightCycler® 480 Software (Roche, Basilea, Suiza).

4.1.7. Inmunohistoquímica

Tras realizar el análisis por RNA-Seq, el precursor de la ITLN2 fue el gen que apareció sobreexpresado en muestras de ICV de animales infectados respecto a los controles. En colaboración con el departamento de Sanidad Animal del SERIDA, la validación de la sobreexpresión de la ITLN2 en ICV se realizó mediante inmunohistoquímica empleando el kit

Avidin-Biotin basado en peroxidasa (Vector Laboratories, CA, US). La validación se llevó a cabo en secciones de ICV de 20 vacas frisonas procedentes de 3 granjas localizadas en el Principado de Asturias con edades comprendidas entre los 0,81 a 10,89 años. Se tomaron muestras de ICV de estos animales en el momento del sacrificio que fueron fijados en un buffer de formalina al 10%, y conservados en parafina hasta su utilización. Posteriormente, los cortes de ICV fueron desparafinizados, hidratados e incubados en metanol con 3% de agua oxigenada durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, lavados con agua durante 10 minutos más. Los cortes se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-ITLN2 (Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA), posteriormente se lavaron con solución salina tamponada (Tris buffered saline; TBS) y se incubaron con un anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG de conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluidos en una proporción 1:200. Las muestras se incubaron con el reactivo VECTASTAIN Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incubaron durante 5 minutos con 3,3-diaminobencidina tetrahidroclorhidrato (DAB, Sigma, St Louis, MO, US) y se lavaron con TBS. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, montados y analizados por microscopía óptica.

4.2. Identificación y validación de SNPs reguladores de la expresión génica y asociados a susceptibilidad a la infección por MAP

4.2.1. Selección de animales y diagnóstico de PTB

Se partió de los resultados de RNA-Seq de PB e ICV de 14 vacas frisonas tal y como se ha descrito en el punto IV.1.1. Los animales procedían de una granja asturiana con una prevalencia de la enfermedad de 6.29%. El diagnóstico de PTB para cada animal se llevó a cabo mediante el análisis histopatológico de tejidos intestinales, ELISA, PCR y cultivo fecal tal y como se ha descrito en el punto IV.1.1. (Blanco-Vázquez y col., 2020). Todos los animales eran adultos, mayores de 24 meses. Por otro lado, para el análisis de validación (estudio caso-control) se utilizó una población de 983 vacas frisonas procedentes de 8 regiones del noreste de España ((País Vasco (N= 415, 42,21%), Cataluña (N= 220, 22,38%), Navarra (N= 204, 20,75%), Cantabria (N= 70, 7,12%), Aragón (N= 38, 3,87%), Castilla y León (N= 25, 2,54%), La Rioja (N= 7, 0,71%) y Asturias (N= 4, 0,41%)) que, al momento del sacrificio, fueron caracterizadas para la PTB mediante ELISA, PCR y cultivo de tejidos y análisis histopatológico (Vázquez y col., 2014a). La media de edad de este grupo de animales fue de 5,5 años.

4.2.2. Análisis bioinformático

Los archivos de alineamientos obtenidos del análisis por RNA-Seq descrito en el punto 4.1.3 se utilizaron para cuantificar las lecturas para cada muestra utilizando el software RSubread

4. MATERIAL Y MÉTODOS

(Liao y col., 2013). Las lecturas obtenidas se normalizaron usando DESeq2 (Love y col., 2014), obteniendo lecturas de un total de 24616 genes.

4.2.3. Genotipado

Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena coccígea de los 14 animales incluidos en el estudio en tubos Vacutainer® con EDTA (BD Vacutainer system, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Las muestras se centrifugaron a 2500×g durante 20 minutos a 4°C. El DNA se extrajo del pellet celular utilizando el QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany. El DNA purificado se genotipó con el EuroG MD BeadChip de Illumina en el laboratorio de genética molecular de CONAFE empleándose el software Infinium™ iScan para la asignación de alelos (Illumina, San Diego, CA, US). El genotipado de los 983 animales incluidos en el estudio caso-control de validación se llevó a cabo con el mismo método.

4.2.4. Análisis de cis-eQTL

Para analizar las asociaciones entre las lecturas normalizadas de expresión génica y los SNPs obtenidos del genotipado se utilizó el programa Matrix eQTL 2.2 (Shabalin, 2012) que emplea un modelo de mínimos cuadrados donde la hipótesis nula es la no asociación entre el SNP y los niveles de expresión génica. Matrix eQTL 2.2 permite aplicar un análisis de regresión lineal para la identificación de *cis*-eQTLs. Los datos con los que se trabaja son la matriz del genotipo y la matriz de expresión génica. Los *cis*-eQTLs se identificaron seleccionando aquellas variantes localizadas a una distancia de 1Mb del sitio de inicio de transcripción del gen regulado (Transcription start site; TSS). Cada línea de las matrices contiene información de un único SNP y de un único gen para cada animal. Ambas matrices se dividen en bloques de 10.000 variables y, para cada par de bloques, Matrix eQTL 2.2 calcula la matriz de correlación y establece si el valor absoluto de cada correlación supera el umbral predefinido, establecido en el valor de 1. El software calcula los valores de P para aquellas asociaciones SNP-número de lecturas basándose en que su correlación supere el umbral. Finalmente, el programa aplica la corrección de múltiples positivos al valor de P (Benjamini & Hochberg, 1995) y considera significativos aquellas asociaciones que presentan una FDR $\leq 0,05$.

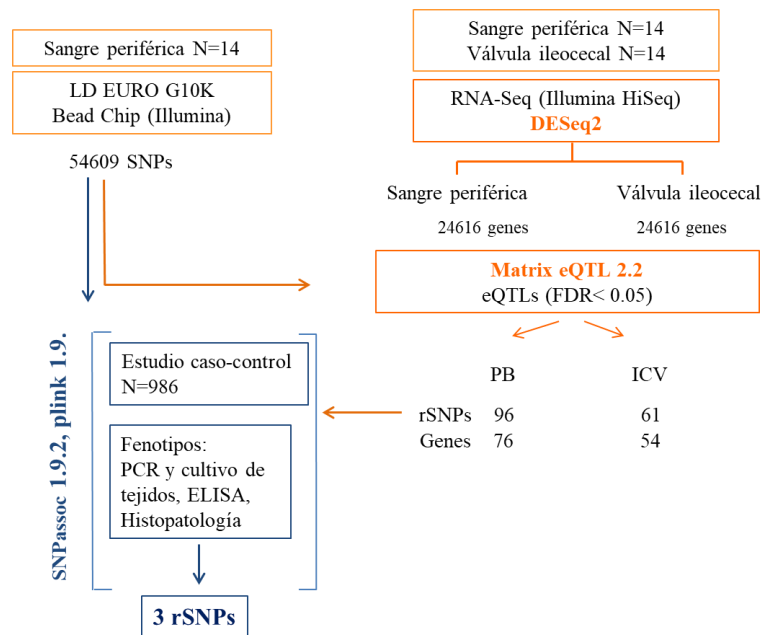


Figura 20. Flujo de trabajo para la identificación de las variantes reguladoras (cis-eQTLs) asociadas a la infección por MAP partiendo de los datos de RNA-Seq y de genotipado

4.2.5. Validación de *cis*-eQTLs identificados mediante estudio de asociación genética dirigida

Para la validación de los *cis*-eQTLs identificados se empleó una población de 983 vacas frisonas sacrificadas en dos mataderos del País Vasco en un periodo de 2 años. Estos animales fueron caracterizados previamente mediante ELISA, PCR y cultivo de tejidos y análisis histopatológico de lesiones intestinales (Vázquez y col., 2014a). La asociación entre los fenotipos y las variantes alélicas de los rSNPs se realizó mediante un análisis de regresión logística con la función `WGassociation` del programa `SNPassoc 1.9.2` bajo cinco modelos genéticos diferentes: dominante, codominante, sobredominante, recesivo y aditivo (González y col., 2007). Se consideraron los resultados de los test diagnósticos como variables, pudiendo ser éstas binarias (resultado positivo o negativo al test diagnóstico) o continuas (densidad óptica del ELISA o grados de severidad de las lesiones histopatológicas). Los genotipos de los *cis*-eQTLs se incluyeron en el análisis como variables explicativas y la edad de los animales fue incluida como covariable. Los valores de P obtenidos en este análisis fueron corregidos por múltiples positivos mediante la corrección de Bonferroni considerándose significativos aquellos resultados con un valor de P corregido $\leq 0,05$.

4.2.6. Validación del *cis*-eQTL asociado a la expresión del gen *MECOM* mediante ELISA

Para la validación del rSNP del gen *MECOM*, se realizó un ELISA comercial cuantitativo de tipo sándwich de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MyBiosource, San Diego, US). La sensibilidad del ELISA era de 1ng/ml y sus límites de detección 3.12 ng/ml a 100 ng/ml. Se seleccionaron muestras de plasma de animales con las distintas variantes alélicas del rSNP del gen

4. MATERIAL Y MÉTODOS

MECOM (CC, TC, TT) de la población de 983 vacas frisonas. Se analizaron muestras de 36 animales: 12 con genotipo CC, 13 con genotipo TC y 11 con genotipo TT. Se añadieron 50 µl de los standards y de las muestras por duplicado en la placa del ELISA. A continuación, se añadieron 100 µl del anticuerpo conjugado con peroxidasa. Tras 60 minutos a 37°C, se lavó la placa 4 veces con 350 µl de la solución de lavado y se añadieron 50 µl de 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidina. Pasados 15 min a 37°C en oscuridad, se añadieron 50 µl de la solución stop a cada pocillo y se midió la densidad óptica (Optical density; OD) en un lector de ELISAs Multiskan a 450nm (ThermoFisher Scientific, US). El cálculo final de las concentraciones se llevó a cabo haciendo la media de los duplicados de muestras y estándares y restando el valor del blanco. A partir de las ODs de los estándares y sus concentraciones, se generó una curva patrón. Los niveles de *MECOM* en cada muestra se calcularon a partir de la curva. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un t-test (GraphPad Prism 8, San Diego, California). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P \leq 0,05$.

4.2.7. Validación del *cis*-eQTL asociado a la expresión del gen *MECOM* mediante ensayos *ex vivo* de macrófagos purificados de animales con las distintas variantes alélicas de este *cis*-eQTL

Se extrajeron 15 ml de sangre periférica de 16 vacas frisonas negativas a ELISA y PCR de heces procedentes de una explotación del País Vasco, en tubos Vacutainer® con heparina de litio (BD Vacutainer system, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). De estos 16 animales, 8 presentaban genotipo TT y 8, genotipo TC para el rs43744169. La sangre se diluyó en una proporción 1:2 con solución salina Hank (Hank's balanced salt solution; HBSS) y se traspasó a tubos Leucosep (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) con 15ml de Ficoll-Paque (1.084 g/cm³) (GE Healthcare Bio-science, Uppsala, Suecia). Los tubos se centrifugaron a 800g durante 15 minutos sin freno. La banda de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) de cada muestra se recogió con una pipeta Pasteur de la interfase, se transfirió a tubos de 50ml y se lavó 3 veces con HBSS mediante centrifugación a 400g durante 10 min para eliminar plaquetas y otros residuos. Las PBMCs obtenidas se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 100U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomycin (Lonza, Spain) y se sembraron a una densidad de 1×10^6 PBMC/ml en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Después de 2 horas de incubación a 37°C en estufa con 5% de CO₂, se eliminaron las células no adheridas al fondo de la placa. Las células adheridas, monocitos, se incubaron durante 7 días en una estufa a 37°C con 5% de CO₂ para favorecer la diferenciación de monocitos a macrófagos. Los macrófagos se infectaron por duplicado con la cepa

4. MATERIAL Y MÉTODOS

de referencia K10 de MAP a una multiplicidad de infección 1:10 (célula:bacteria). A las 2 horas p.i., se retiró el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con HBSS para eliminar la bacteria extracelular. Para cada animal, dos pocillos infectados se lisaron en ese momento y otros dos se lavaron y cultivaron en medio fresco durante 7 días más a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar ambos tiempos de infección, se eliminaron los sobrenadantes y las células se lisaron con 0,5 ml de Tritón X-100 (Sigma Aldrich) al 0,1% en agua estéril. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente los lisados (0,5ml) se inocularon en tubos indicadores de crecimiento de micobacterias (Mycobacteria Growth indicator tubes; MGIT) (Becton Dickinson, Sparks, MD, US). Cada tubo MGIT se suplementó con 800 µl de suplemento de OADC (BBL MGIT OADC growth supplement, Becton Dickinson, Sparks, MD, US) con 2 µg/ml de micobactina (Allied Monitor Inc, Fayette, US) y una mezcla de antibióticos compuesta por polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina (BBL MGIT PANTA antibiotic mix, Becton Dickinson, Sparks, MD, US). Los tubos se incubaron a 37 ± 2 °C durante 42 días en el Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, US). El indicador de positividad utilizado fue el tiempo de detección (Time to detection; TTD) que es el tiempo expresado en días/horas que se tardó en detectar el crecimiento bacteriano en cada tubo. Las CFUs para cada muestra se calcularon mediante una ecuación matemática obtenida a partir de los TTD de diluciones seriadas de la cepa usada en la infección. Para obtener la ecuación matemática, se preparó una suspensión de la cepa K10 utilizada para la infección a una concentración McFarland= 1 (3×10^8 CFUs/ml) y se prepararon 7 diluciones decimales sucesivas. De cada dilución, se tomaron 100 µl que se inocularon por duplicado en tubos MGIT suplementados tal y como se ha descrito anteriormente. Para generar la curva patrón el TTD de cada tubo en días se relacionó con el \log_{10} de las CFUs estimadas que estaban presentes en cada dilución mediante análisis de regresión no lineal (GraphPad Prism 9, GraphPad Software, San Diego, US). De este modo se obtuvo una ecuación que permitió estimar el logaritmo de las CFUs presentes en cada muestra con un 95% de intervalo de confianza (Abendaño y col., 2012). El ratio de CFUs entre las 2 horas y los 7 días de infección se obtuvo dividiendo el logaritmo de las CFUs a día 7 respecto al logaritmo de las CFUs a las 2h. Este valor se utilizó para calcular el índice de supervivencia de MAP en los macrófagos infectados mediante la raíz cuadrada del producto ($\log_{10} \text{CFUs}_{7d} / \log_{10} \text{CFUs}_{2h}$) $\times 100$. Altos valores de índice de supervivencia de MAP indica una mayor susceptibilidad del hospedador a la infección por MAP. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con un t test (GraphPad Prism 9, San Diego, CA, US) entre grupos en el que las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de $P \leq 0,05$.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3. Identificación y validación de SNPs asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP/tolerancia a la PTB empleando GWAS

4.3.1. Animales y diagnóstico de PTB

La población utilizada en este estudio constaba en 983 vacas frisonas procedentes de varias explotaciones localizadas en 8 regiones del norte de España: País Vasco (N= 415, 42,21%), Navarra (N= 204, 20,75%), Cataluña (N= 220, 22,38%), La Rioja (N= 7, 0,71%), Asturias (N= 4, 0,41%), Castilla-León (N= 25, 2,54%), Cantabria (N= 70, 7,12%) y Aragón (N= 38, 3,87%). Todos los animales seleccionados para el estudio eran mayores de 2 años (5,6 años de media) y se procedió a la recogida de muestras (sangre periférica y tejido intestinal) en el momento del sacrificio, en 2 mataderos del País Vasco entre marzo del 2007 y mayo del 2010 (Vázquez y col., 2014a). El diagnóstico de PTB se llevó a cabo mediante ELISA para la detección de anticuerpos anti-MAP en plasma y PCR y cultivo de tejidos para la detección de MAP en tejidos (Vázquez y col., 2014a). Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular en tubos Vacutainer® de 10ml con EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer system, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) por duplicado para llevar a cabo el ELISA y el genotipado. Las muestras de tejido se tomaron de la mucosa intestinal, válvula ileocecal, íleo distal y del linfonodo yeyunal caudal y linfonodo ileal. Se prepararon dos mezclas de tejido, por un lado se prepararon dos alícuotas con la mezcla de ICV e íleo distal y, por otro se preparó dos alícuotas de una mezcla de los linfonodos yeyunal caudal e ileal. Una alícuota de cada tipo se utilizó para llevar a cabo la PCR mediante la amplificación de la secuencia IS900 de MAP (Adiapure-Adiavet; Adiage, Saint Brieuc, France). La otra alícuota se utilizó para realizar el cultivo bacteriológico en medios Lowenstein-Jensen y Herrold suplementados con 2mg/l de micobactina J (Allied Monitor, Fayette, MO, USA). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis histopatológico de los tejidos. Estos fueron recogidos asépticamente y conservados en formalina en las 24 horas posteriores a su llegada al laboratorio. Las muestras fueron fijadas en un buffer de formalina al 10% durante 72 horas, deshidratadas con diluciones de alcohol y xilol y fijadas en parafina para posteriormente, ser cortadas en secciones de 4 µm. Los cortes se tiñeron con HE y ZN y fueron analizados por microscopía óptica. De acuerdo a la localización, extensión de las lesiones y del infiltrado inflamatorio, las muestras se clasificaron como sin lesión, focales, multifocales o difusas (linfocíticas, intermedias y multibacilares) (González y col., 2005).

4.3.2. Selección de animales

Para cada estudio GWAS se seleccionó un grupo de animales casos y controles en función del fenotipo necesario. En el primer estudio, llevado a cabo con los fenotipos de ELISA, PCR y

cultivo de tejidos, se incluyeron todos los animales (983). Se consideró cada fenotipo de manera individual y diferentes combinaciones de los fenotipos individuales, así como el valor de OD del ELISA, siendo los animales controles negativos a todos los test diagnósticos. Para el segundo GWAS llevado a cabo con los resultados del análisis histopatológico se seleccionaron 813 animales: 371 animales con lesiones focales, 33 con lesiones multifocales, 36 con lesiones difusas y 373 animales sin lesión (controles). Por último, para la definición del fenotipo de tolerancia, se seleccionaron aquellos animales (N= 24) que presentaban resultado positivo de PCR y cultivo de tejidos (infectados) y que no presentaban lesiones histopatológicas asociadas a la PTB. Los animales control para este estudio eran negativos a PCR y cultivo de tejidos y con lesiones focales en tejido intestinal y linfonodos asociados (n=277).

4.3.3. Genotipado e imputación de los datos a WGS

Se extrajo sangre periférica de los 983 animales sacrificados en matadero entre 2007 y 2010 al momento del sacrificio y se llevó a cabo la extracción del DNA genómico y genotipado mediante el chip Bovine Euro G MD tal y como se ha explicado en el punto IV.2.3. Los genotipos individuales fueron imputados al Bovine HD Bead Chip mediante Eagle 2.4 (Loh y col., 2016) y minimac 4 (Das y col., 2016) utilizando un panel de referencia de 1278 animales del Run 7.0 del proyecto 1000 Bull Genome (Hayes & Daetwyler, 2019). Posteriormente, los genotipos se imputaron a secuencia completa utilizando un panel de referencia de 2333 animales del Run 6.0 del proyecto 1000 Bull Genome (Hayes & Daetwyler, 2019). En total, se obtuvo información de 33.77 millones de SNPs. Todos los SNPs pasaron un control de calidad de tasa de genotipado > 80% y aquellos con una frecuencia del alelo menor inferior (Minor allele frequency; MAF) al 1% fueron eliminados, reteniéndose tras este filtro 13.881.067 SNPs.

4.3.4. Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad

Los componentes de la varianza, errores estándar y la estima de la heredabilidad (h^2) para cada fenotipo se calcularon con el programa GCTA 1.93.2 (Yang, y col., 2011a) de acuerdo a la siguiente fórmula $h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_e^2}$, donde σ_G^2 es la varianza genética y σ_e^2 la varianza residual. Los componentes de la varianza se obtuvieron mediante el método de máxima verosimilitud restringida basada en la relación genómica (genomic-relatedness-based restricted maximum-likelihood) y, con esos datos, se calculó la estima de la heredabilidad. Esta aproximación calcula la proporción de varianza fenotípica explicada por los SNPs utilizando una matriz de relaciones genómicas. El concepto tras este método es ajustar todos los SNPs como efectos aleatorios simultáneamente en un modelo lineal mixto para estimar la varianza explicada por todos los SNPs.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.5. GWAS

Los genotipos imputados y los fenotipos definidos en los puntos IV.3.2. y IV.3.3., se analizaron en estudios de asociación caso-control empleando un modelo lineal mixto con el software GCTA que ajusta los efectos de todos los SNPs como efectos aleatorios (Yang, y col., 2011a). El modelo se ajusta a la siguiente ecuación $y = a + bx + g + e$, donde y es el fenotipo, a es la media, b es el efecto aditivo del SNP testado para la asociación, x es el SNP codificado como 0,1 y 2, g es el efecto poligénico y e es el error residual. La edad de los animales al sacrificio se incluyó como covariable en el análisis. Tras el GWAS los SNPs con un valor de R^2 para la imputación inferior al 70% fueron eliminados y se ajustó el valor de P mediante FDR (Benjamini & Hochberg, 1995). Se consideraron dos valores de P: moderado (entre 5×10^{-5} y 5×10^{-7}) y fuerte (inferior a 5×10^{-7}) de acuerdo con el Wellcome Trust Case Control Consortium. También se calcularon el factor de inflación (λ) y los gráficos de cuartiles para determinar si existía estratificación de la población. Valores de λ superiores a 1,2 sugieren estratificación de la población, mientras que valores cercanos a 1 sugieren una estructura adecuada. Finalmente, se calculó el Odds Ratio (OR) de los SNPs significativos y su intervalo de confianza del 95% mediante un análisis de regresión logística con la función `WGassociation` del software `SNPassoc 1.9.2` (González y col., 2007).

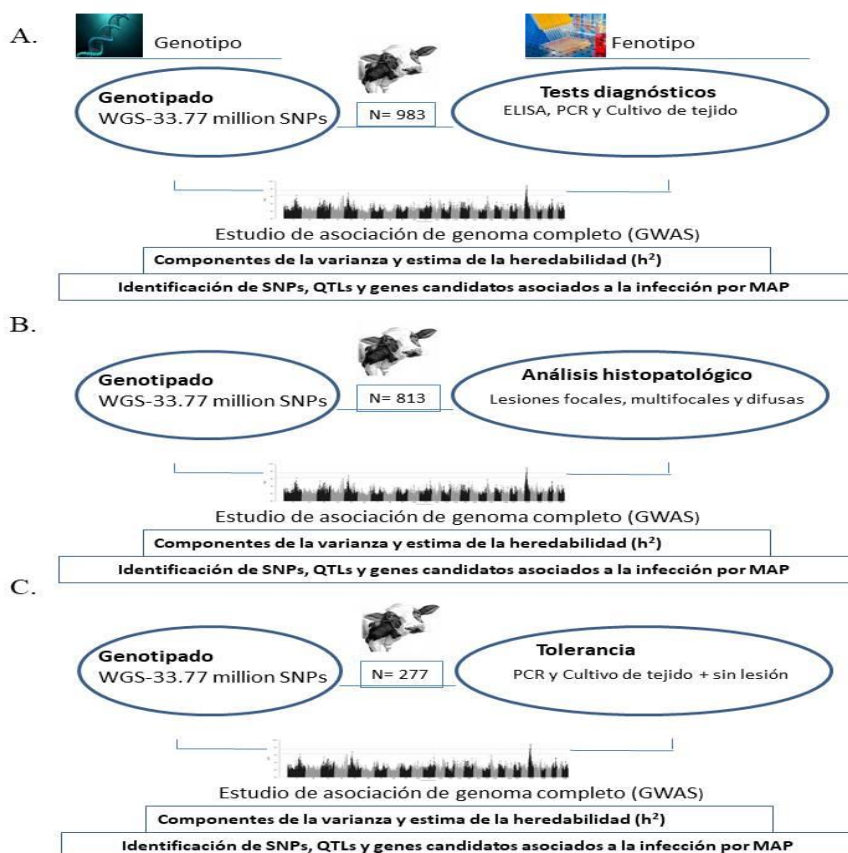


Figura 21. Flujos de trabajo de los estudios de asociación de genoma completo. Estos estudios se llevaron a cabo con (A) la combinación de ELISA, PCR y Cultivo de tejidos, (B) lesión histopatológica y (C) fenotipo de tolerancia definido en función de la presencia de la bacteria y ausencia de lesión histopatológica

4.3.6. Identificación de SNPs, QTLs y genes candidatos

La localización de los SNPs significativos se realizó con biomaRt 2.44.1 (Durinck y col., 2009) usando como referencia el genoma ARS-UCD1.2 de *Bos taurus*. La distribución genómica de los SNPs se llevó a cabo con el Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). Los QTLs se definieron en función de los SNPs con una fuerte asociación con el fenotipo ($P < 5 \times 10^{-7}$). El inicio y el fin de cada QTL se establecieron a 500.000 pares de bases de los SNPs significativos más alejados del SNP con el valor de P más bajo. Los QTLs que presentaban alguna región solapada con otros QTL se fusionaron considerándoles un único QTL. La identificación de los genes candidatos se llevó a cabo usando Ensembl (www.ensembl.org). Se seleccionaron los genes localizados en el propio QTL y en un rango de 50.000 pares de bases desde el inicio y el final de cada QTL. Tanto los QTLs como los genes identificados se contrastaron con la base de datos Animal Genome (www.animalgenome.org) para confirmar si algunos de ellos habían sido previamente descritos para otras enfermedades en vacuno. También se buscaron coincidencias con genes candidatos asociados a la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal (GWAS catalog; www.ebi.ac.uk) y en bases de datos de genes implicados en inmunidad innata humana (www.innatedb.com)

4.3.7. Cuantificación de colesterol en muestras de plasma de animales con diferentes lesiones asociadas a la PTB

Tras el análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes candidatos identificados mediante el análisis de asociación genética de los animales con lesiones difusas en el estudio 3, se observó un enriquecimiento de la ruta del colesterol (bta04979). Para la validación funcional de dicha ruta se procedió a la cuantificación de colesterol en muestras de plasma de animales con diferentes tipos de lesiones, utilizando el kit enzimático Cholesterol Quantitation kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St Louis, US). La concentración del colesterol en las muestras se determina mediante un ensayo enzimático en el que las esterasas del colesterol hidrolizan los ésteres de colesterol a colesterol resultando en un producto colorimétrico proporcional al colesterol presente en la muestra. Se seleccionaron muestras de plasma de animales pertenecientes a la población de 983 animales sacrificados en mataderos sin lesiones (N= 474) y con lesiones focales (N= 350), multifocales (N= 32) y difusas (N= 26). Dos microlitros de plasma de cada animal se llevaron a un volumen total de 50 μ l con el buffer incluido en el kit. Se añadieron 50 μ l de la mezcla de reacción de colesterol y se agitó la placa con suavidad incubándola en oscuridad a 37°C durante 60 minutos. Tras la incubación la absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de ELISA Multiskan (ThermoFisher Scientific, US). La concentración de colesterol presente

4. MATERIAL Y MÉTODOS

en las muestras se calculó aplicando la ecuación de la curva patrón obtenida a partir de los valores de OD de diluciones seriadas del estándar de colesterol incluido en el kit. Tanto las muestras como los estándares se analizaron por duplicado y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un t-test para la comparación entre grupos (GraphPad Prism 8, San Diego, California). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P \leq 0,05$.

4.3.8. EBV y validación cruzada de las predicciones genómicas

En el estudio 5, el modelo de predicción lineal (Genomic Best linear unbiased prediction; GBLUP) (VanRaden & Sullivan, 2010) integrado en el software GCTA 1.93.2 se utilizó para estimar los valores de selección estimados (estimated breeding value; EBV) debidos al efecto de los SNPs que mostraban una asociación significativa con la tolerancia a la PTB. Los EBVs se estimaron para cada animal de manera individual y su precisión fue validada en una población de validación independiente compuesta por 200 animales, 90 de los cuales presentaban un resultado positivo a cultivo de tejidos sin lesiones histopatológicas (casos) y 190 animales con lesiones histopatológicas asociadas a la PTB (controles). En la validación cruzada los fenotipos fueron enmascarados para el 20% de los animales de la población de validación y, los fenotipos y genotipos de los animales restantes (80%) se usaron para calcular los EBVs de los individuos del grupo enmascarado. Se realizaron 5 iteraciones de manera que el fenotipo de cada animal de la población de validación, fue enmascarado al menos una vez. La capacidad de cada modelo para predecir el fenotipo de tolerancia se evaluó mediante la determinación del área bajo la curva (Area under curve; AUC) para cada una de las 5 iteraciones mediante el paquete de R: ROCR (Sing y col., 2005). La habilidad del modelo se determinó mediante el cálculo de la media de la AUC y su desviación estándar para las 5 iteraciones. El AUC presenta valores de 0,5 si la predicción de los cambios se debe a efectos aleatorios, mientras que si el modelo presenta una capacidad predictiva perfecta para el fenotipo el AUC tendría valor de 1.0 (Kirkwood & Sterne, 2010).

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se han planteado las siguientes hipótesis:

ESTUDIO 1: La infección provocada por MAP produciría cambios significativos en los mRNA expresados en muestras de sangre y tejido intestinal de animales con distintas lesiones asociadas a la PTB en comparación con los niveles observados en animales sin lesiones. Las proteínas para las que codifiquen estos mRNAs diferencialmente expresados, podrían constituir nuevos biomarcadores útiles para el diagnóstico de animales subclínicos difícilmente detectables con las técnicas de diagnóstico tradicionales.

ESTUDIO 2: La integración de datos de genotipado y expresión génica permitiría la identificación de variantes reguladoras de la expresión génica y causales de la PTB.

ESTUDIO 3: La utilización de datos de secuenciación a genoma completo junto con combinaciones de métodos diagnósticos ante y post-mortem en análisis de asociación genética permitiría mejorar las estimas de la heredabilidad para la susceptibilidad genética a la infección por MAP.

ESTUDIO 4: La inclusión de los resultados del análisis histopatológico de muestras de tejido de animales infectados junto con datos de secuenciación imputados a genoma completo en un análisis GWAS podría ayudar a definir la base genética subyacente a cada forma lesional.

ESTUDIO 5: La definición de un fenotipo de tolerancia para la PTB integrando datos de carga bacteriana junto con el análisis histológico de las lesiones asociadas permitiría determinar la existencia de una base genética subyacente a la tolerancia a la PTB.

OBJETIVOS

- OBJETIVO 1- Análisis transcriptómico (RNA-Seq) para la identificación de genes diferencialmente expresados en sangre y válvula ileocecal de animales con diferentes lesiones asociadas a la PTB.
- OBJETIVO 2 – Identificación y validación de SNPs reguladores de la expresión génica asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP en ganado frisón empleando un análisis combinado genómico-transcriptómico.
- OBJETIVO 3 - Identificación y validación de SNPs asociados a la susceptibilidad a la infección, a las distintas formas lesionales así como a la tolerancia a la PTB en ganado frisón empleando análisis de asociación del genoma completo (GWAS).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. El análisis RNA-Seq de ICV y PB en ganado frisón infectado con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identificó desregulación de la vía de señalización CXCL8/IL8

En los últimos años se han llevado a cabo varios estudios de RNA-Seq con el objetivo de profundizar en la respuesta inmune del hospedador a la infección por MAP. Nuestro estudio fue el primer estudio de RNA-Seq en el que se analizaban los genes diferencialmente expresados en PB e ICV en animales con diferentes tipos de lesiones en relación a animales controles sin lesiones y negativos a test diagnósticos de PTB. El análisis transcriptómico de la respuesta del hospedador frente a MAP nos permitió profundizar en el conocimiento de la interacción MAP-hospedador e identificar los mecanismos implicados en el establecimiento y progresión de la infección. El análisis de los genes diferencialmente expresados permitió la identificación de biomarcadores asociados a las diferentes formas lesionales que, posteriormente, demostraron ser de ayuda en el diagnóstico de la PTB (Blanco-Vázquez y col., 2020, 2021, 2022).

6.1.1. RNA-Seq

Se prepararon librerías de RNA-Seq a partir de la PB y la ICV de 14 animales para cada categoría: animales controles sin lesión (N= 3), animales con lesiones focales (N= 6) y animales con lesiones difusas (N= 5). Se extrajo RNA y se prepararon las correspondientes librerías de RNA-Seq por duplicado de cinco de las 14 vacas (ID 2, 6, 8, 11, 12) para comprobar la reproducibilidad del análisis de RNA-Seq, no obteniéndose diferencias significativas entre las réplicas. Tras la secuenciación de todas las librerías se obtuvo una media de 22,31 millones de lecturas brutas por librería con una puntuación de calidad Phred > 30, que es el valor en el que la probabilidad de que la base sea correctamente asignada es del 99,99% en la secuenciación de nueva generación (Next generation sequencing; NGS). Tras filtrar las lecturas en función del control de calidad, del tamaño mínimo de 75 pb de cada lectura y por el porcentaje de bases ambiguas inferior al 5%, se obtuvo una media de 21,44 millones de lecturas. Tras el alineamiento de las lecturas filtradas con el genoma de referencia de *Bos taurus* se obtuvo una media de 19,96 millones de lecturas mapeadas. De las lecturas mapeadas, una media del 5% se mapearon en múltiples localizaciones del genoma y fueron excluidas para el análisis de la expresión génica. El análisis de las lecturas individuales de las librerías de las muestras de PB reveló que el 57% de las lecturas se alineaban con exones, el 28% con intrones, el 3% con regiones intergénicas, el 2% con regiones 5' y el 10% con regiones 3'. En las muestras de ICV, los intrones representaban el 24% de las lecturas, los exones el 63%, el 2% de las lecturas correspondían a regiones intergénicas, el 1% a regiones 5' y el 10% a regiones 3'.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.2. Análisis de expresión diferencial

El número de genes diferencialmente expresados identificados fue mayor en ICV que en PB y en animales con lesiones difusas que en animales con lesiones focales. Se identificaron un total de 109 y 207 genes diferencialmente expresados en muestras de PB de los animales con lesiones focales y con lesiones difusas en relación a los animales control, respectivamente. Además, 51 de estos genes diferencialmente expresados eran comunes en las muestras de sangre independientemente del tipo de lesión. Respecto a la ICV, se identificaron 3189 y 4727 genes diferencialmente expresados en muestras de animales con lesiones focales y difusas en relación a los animales control, respectivamente. Se detectaron 2557 genes diferencialmente expresados en ICV comunes a los dos tipos de lesiones analizados. Finalmente, 19 genes estaban diferencialmente expresados en muestras de animales con lesiones focales independientemente del tipo de muestra analizado (PB o ICV). De manera similar, se observó que 89 genes estaban diferencialmente expresados en ICV y PB de los animales con lesiones difusas en relación al grupo control.

Genes diferencialmente expresados en muestras de PB de animales con lesiones focales

De los 109 genes diferencialmente expresados en muestras de sangre de animales con lesiones focales, 21 aparecían sobre-expresados. Los cinco genes más sobre-expresados en PB de los animales con lesiones focales respecto a los controles fueron *ABCA13*, el *receptor leucocitario similar a la inmunoglobulina, miembro de la subfamilia A 6 (Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6; LOC618416)* y tres genes codificantes de proteínas que no han sido caracterizadas (*ENSBTAG00000039691*, *ENSBTAG00000039086*, *ENSBTAG00000000930*). Los cinco genes más infra-expresados en muestras de sangre de los animales con lesiones focales respecto a los controles fueron el *ligando de quimioquina C-C L14 (C-C motif chemokine ligand 14; CCL14)*, *proteína de unión al ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3; IGF2BP3)*, *Osteoglicina (Osteoglycin; OGN)*, *Glucógeno fosforilasa asociada al músculo (Glycogen phosphorylase muscle associated; PYGM)* y *Precursor del antígeno CD5 (CD5 antigen-like precursor; CD5L)*.

Genes diferencialmente expresados en muestras de PB de animales con lesiones difusas

En las muestras de PB de animales con lesiones difusas se identificaron 207 genes diferencialmente expresados respecto a los controles, de los cuales 48 se encontraban sobre-expresados y 159 infra-expresados. Los 5 genes con mayores niveles de expresión en estas muestras fueron el *canal de dos poros 3 (Two pore channel 3; TPC3)*, la *creatina quinasa tipo M (Creatine kinase M-type; CKM)*, *DES*, la *cadena ligera de miosina 2 (Myosin light chain 2; MYL2)* y el gen

codificante de una proteína no caracterizada (*ENSBTAG00000046611*). Por otro lado, los 5 genes más infra-expresados en este tipo de muestras fueron *Catelicidinas 3 y 4* (*Cathelicidins 3 y 4; CATHL3 y CATHL4*), *Molécula CD177* (*CD177 molecule; CD177*), *CCL14* y *proteína asociada a la resistencia a los medicamentos 4* (*Multidrug resistance-associated protein 4-like; LOC100848700*).

Genes diferencialmente expresados en muestras de ICV de animales con lesiones focales

En las muestras de ICV, se identificaron un total de 3189 genes diferencialmente expresados en muestras de animales con lesiones focales respecto a los controles. De los 3189 genes diferencialmente expresados, 168 aparecían sobre-expresados y 3021 infra-expresados. Los 5 genes más sobre-expresados en muestras de ICV de animales con lesiones focales fueron el *precursor de la ITLN2*, *Colecistoquinina* (*Cholecystokinin; CCK*), *Homeobox B13* (*HOXB13*), *FABP6* y *HSPA6*, mientras que los 5 con menores niveles de expresión fueron *Duodenasa-1 con actividades similares a la tripsina y a la quimotripsina* (*Duodenase-1-like with both trypsin-like and chymotrypsin-like activities*), *candidato a supresor de tumores 5* (*Tumor suppressor candidate 5; TUSC5*), *Acuaporina 8* (*Aquaporin 8; AQP8*) y los genes codificantes de dos proteínas no caracterizadas (*ENSBTAG00000046611*, *ENSBTAG00000047008*). El gen *FABP6* es un transportador de ácidos biliares específico del íleon, y su sobreexpresión en muestras de ICV indica desregulación de la secreción de ácidos biliares en los animales infectados con MAP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hempel y col (Hempel y col., 2016), que establecieron que el gen *FABP6* se encontraba sobre-expresado en los animales con signos clínicos de PTB respecto a los animales control.

Genes diferencialmente expresados en muestras de ICV de animales con lesiones difusas

Por otro lado, de los 4724 genes diferencialmente expresados en muestras de ICV de animales con lesiones difusas, 1473 aparecían sobre-expresados y 3251 infra-expresados respecto a los animales control. Los 5 genes más sobre-expresados en esta comparación fueron *ITLN2*, *HSPA6*, el *miembro 23 de la superfamilia de las inmunoglobulinas* (*Immunoglobulin superfamily member 23; IGSF23*), *Apolipoproteína B* (*Apolipoprotein B ; APOB*) y *Carbamil-fosfato sintasa 1* (*Carbamoyl-phosphate synthase 1; CPS1*). Entre los genes diferencialmente expresados en ICV de animales con lesiones difusas, encontramos otros genes que coincidían con los descritos por Hempel y col. cuando comparaban animales con signos clínicos respecto a animales control: *IGSF23* (log₂fold= 5,1), *APOB* (log₂fold= 4,8), *miembro 2 de la familia de transportadores de solutos* (*Solute Carrier Family 10 Member 2; SLC10A2*) (log₂fold= 2,7) y *Metalopeptidasa de la*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

matriz 13 (Matrix Metalloproteinase 13; MMP13) ($\log_2\text{fold}= 2,0$). Aunque no se sabe mucho del papel desempeñado por el gen *ISGF23*, otros miembros de la familia ISGF presentan funciones inmunológicas, incluyendo el reconocimiento de diversas moléculas de la matriz extracelular (Xu & Jin, 2010). Por el contrario los 5 genes con menores niveles de expresión fueron *lisozima C, isoenzima láctea 1 (Lysozyme C milk isozyme 1; LYZI)*, *Adiponectina CIQ (Adiponectin CIQ; ADIPOQ)*, *Isozima intestinal de lisozima C (Lysozyme C intestinal isozyme; LYSB)*, *Miembro 1 de la familia de la acil-CoA sintetasa de cadena media (Acyl-CoA synthetase medium chain family member 1; ACSM1)* y *AQP8*.

Genes diferencialmente expresados en PB de animales con lesiones focales y difusas en relación al grupo control

Se detectaron 51 genes diferencialmente expresados que eran comunes a las muestras de PB independientemente del tipo de lesión. Dos de los genes comunes más sobre-expresados fueron el gen codificante del *Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Oxidized low density lipoprotein receptor; ORL1)* y de la *Proteína 2 de la familia Tweety (Tweety family protein 2; TTYH2)*, mientras que el más infra-expresado resultó ser el *CCL14*.

Genes diferencialmente expresados en ICV de animales con lesiones focales y difusas en relación al grupo control

Se identificaron 2557 genes diferencialmente expresados en muestras de ICV de animales infectados, independientemente del tipo de lesión. El gen más sobre-expresado en ICV de animales con lesiones respecto a los controles fue *ITLN2*; $\log_2\text{fold}= 10,6$ y $6,8$ en animales con lesiones focales y difusas, respectivamente. La *ITLN2* es una lectina extracelular capaz de unirse a *Mycobacterium tuberculosis* y al bacilo de Calmette-Guérin (*Bacillus Calmette-Guérin; BCG*) (Tsuji y col., 2009). Mediante análisis inmunohistoquímico de muestras de ICV se observó que las células de Globet y Paneth de animales infectados aparecían intensamente marcadas con el anticuerpo bovino anti-*ITLN2*. Posteriormente, el potencial de la proteína *ITLN2*, como biomarcador de progresión de la infección por MAP se testó en un mayor número de animales, y se propuso el análisis inmunohistoquímico de la *ITLN2* como un método complementario al análisis histopatológico post-mortem que permite una mejor clasificación de las lesiones, especialmente de las lesiones focales (Blanco Vázquez y col., 2021).

Otro gen sobre-expresado en ICV de las vacas infectadas respecto a las vacas control fue *FABP6*, un transportador de ácidos biliares específico del íleon, indicando desregulación de la

secreción de ácidos biliares en los animales infectados con MAP. En relación al metabolismo de los ácidos biliares, también se observó un descenso en la expresión del *Receptor X farnésico* (*Farnesoid X receptor; FXR*) en ICV de animales infectados respecto a los controles. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hempel y col (Hempel y col., 2016), que establecieron que el gen *FABP6* se encontraba sobre-expresado en los animales con signos clínicos de PTB respecto a los animales control. En muestras de ICV de animales con lesiones respecto a animales control, el gen *HSPA6* aparecía sobre-expresado, mientras que se observó una reducción significativa de la expresión del gen *AQP8* en muestras de ICV de animales con lesiones.

Genes diferencialmente expresados en PB e ICV de animales con lesiones focales versus controles

En muestras de animales con lesiones focales, tanto en PB como ICV, aparecieron infra-expresados los genes codificantes de la *Proteína del marco de lectura alternativo del TCR gamma* (*TCR gamma alternate reading frame protein; TARP*), *Dominio de apolipoproteína L que contiene 1* (*Apolipoprotein L domain containing 1; APOLD1*) y el gen *Duodenasa 1*. Por el contrario, ningún gen apareció sobre-expresado de manera común en muestras de PB e ICV de animales con lesiones focales.

Genes diferencialmente expresados en PB e ICV de animales con lesiones difusas versus controles

En las muestras de animales con lesiones difusas, tanto en PB como en ICV, se observó sobreexpresión de genes implicados en el control de agentes infecciosos: *Factor de transcripción ATF de cremallera básica de leucina 2* (*Basic leucine zipper ATF transcription factor 2; BATF2*) y *CXCL10*. *BATF2* es un gen fundamentalmente expresado en monocitos y macrófagos y tiene un papel central en la activación de los macrófagos regulando la respuesta inflamatoria en las infecciones producidas por micobacterias (Guler y col., 2015, 2019). *BATF2* pertenece a la familia de los factores de transcripción AP1 e interacciona con el factor regulatorio de interferón 1 que interviene en la activación de respuestas pro-inflamatorias. En la tuberculosis en humanos, *BAFT2* ha sido propuesto como biomarcador y potencial diana terapéutica (Guler y col., 2015, 2019). La quimioquina *CXCL10* está implicada en funciones quimiotácticas de los monocitos y los linfocitos T mediante su unión al receptor *Receptor de quimiocinas C-X-C 3* (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 3; CXCR3*). *CXCL10* se expresa fundamentalmente en los linfocitos CD4+ de memoria que producen un patrón de citoquinas características de la respuesta inmune Th1. Varios estudios han propuesto que *CXCL10* podría ser un buen biomarcador de tuberculosis ya que se han detectado niveles significativamente más altos de *CXCL10* en sangre de pacientes con tuberculosis respecto a controles (Wang y col., 2012; Jenum y col., 2016; Wang y col., 2016). En ganado

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bovino, la medida combinada de CXCL10 e IFN- γ ha demostrado mejorar la sensibilidad de la detección de animales con tuberculosis bovina en estadios clínicos (Coad y col., 2019). Los 3 genes más infra-expresados en muestras de PB e ICV de animales con lesiones difusas fueron *Proteína de unión a C4b de tipo alfa (C4b-binding protein alpha-like)*, *Epiregulina (Epiregulin; EREG)* y *CXCL8/IL8*. En nuestro estudio, tanto *EREG* como *CXCL8/IL8* aparecen infra-expresados en PB e ICV de animales con lesiones difusas respecto a los controles. *EREG* pertenece a la familia de los factores de crecimiento epidérmico (Epidermal growth factor; EGF) y, junto con el *Factor de crecimiento similar al EGF de unión a heparina (Heparin Binding EGF Like Growth Factor; HBEGF)*, actúan como estimuladores mitogénicos mediante la unión a receptores EGF (EGFRs). La transactivación de los EGFRs conduce a la fosforilación y activación de MAPK8 que, a su vez, induce apoptosis (Luppi y col., 2007). Sin embargo, esta vía de inducción de apoptosis estaría desactivada en el caso de los animales con lesiones difusas.

Genes diferencialmente expresados en muestras de PB e ICV en animales infectados

Se detectaron cinco genes diferencialmente expresados y comunes a las muestras de PB y ICV, independientemente del tipo de lesión: *CXCL8/IL8*, *APOLD1*, *Proteína 27 inducible por interferón α (Interferon α -inducible protein 27; IFI27)*, *KIAA1324 like (KIAA1324L)* y *ArfGAP con dominio RhoGAP repetición de anquirina y dominio PH 2 (ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2; ARAP2)*. *CXCL8/IL8*, *APOLD1*, *KIAA1324L* y *ARAP2* aparecían infra-expresados en todas las combinaciones. Estudios previos han demostrado que la producción de *CXCL8/IL8* se ve reducida en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Crohn en comparación con individuos sanos y también se ve reducida en macrófagos derivados de monocitos de vacas infectadas con *Mycobacterium bovis* respecto a animales no infectados (Gijbers y col., 2004; Shukla y col., 2017). Dado que *CXCL8/IL8* es una quimioquina responsable del reclutamiento de neutrófilos y de su activación mediante su unión al receptor CXCR3, la disminución en su expresión refleja una incapacidad del reclutamiento y activación de los neutrófilos durante la infección por MAP. Otras funciones biológicas que desempeña *CXCL8/IL8* y que se verían inactivadas en el caso de la infección por MAP serían los procesos exudativos, granulocitofilia, degranulación de los neutrófilos, respuesta respiratoria y movilización del calcio intracelular. La estimulación de la producción de *CXCL8/IL8* depende fundamentalmente de la unión de EGF a los EGFRs que activan la MAPK8 (Itoh y col., 2005). Sin embargo, estos procesos se encontraban infra-expresados en muestras de animales con lesiones focales y difusas en relación a los animales control.

6.1.3. Análisis de GOs

Mientras que en muestras de PB de animales con lesiones focales no se detectó ninguna GO sobre-expresada, en muestras de PB de animales con lesiones difusas se identificaron 11, de las cuales 5 eran BP, 4 eran CC y 2 eran MF. Los 5 BP identificados estaban directamente relacionados con la respuesta inmune: eliminación de células de otros organismos (GO:0031640), respuesta defensiva (GO:0006952, GO:0050832), respuesta inmune (GO:0006955) y regulación positiva de la quimiotaxis de los neutrófilos (GO:0090023).

En muestras de ICV de animales con lesiones focales y de animales con lesiones difusas, se identificaron 83 y 80 GO enriquecidas, respectivamente. En ICV de animales con lesiones focales, las cinco GO más enriquecidas fueron: respuesta celular a estímulos dañinos para el DNA (GO:0006974), transporte de proteínas (GO:0015031), procesos del sistema inmune (GO:0002376), reparación del DNA (GO:0006281) y quimiotaxis de los neutrófilos (GO:0030593). En el caso de los animales con lesiones difusas, 3 de las 5 ontologías génicas más enriquecidas en ICV estaban relacionadas con la respuesta inmune innata (GO:0045087), la respuesta inflamatoria (GO:0006954) y procesos del sistema inmune (GO:0002376). Las GOs relacionadas con la respuesta defensiva (GO:0006952) y la respuesta inmune (GO:0006955) aparecían enriquecidas tanto en PB como en ICV de los animales que presentaban lesiones difusas. Los genes diferencialmente expresados incluidos en la GO:0006952 eran *CXCL8/IL8*, *CXCL10*, *Cathelicidina 6* (*Cathelicidin 6*; *CATHL6*) y *Defensina Beta 4A* (*Defensin Beta 4^a*; *DEFβ4A*). Nuestros resultados revelaron que las quimioquinas *CXCL8/IL8* y *CXCL10* se regulaban de manera antagónicas en animales con lesiones difusas. *CXCL8/IL8* está implicada en la quimiotaxis de los neutrófilos (GO:0030593), la respuesta defensiva (GO:0006952) y la respuesta inmune (GO:0006955). Mientras que *CXCL8/IL8* aparecía infra-expresada en muestras de PB e ICV, *CXCL10* se sobreexpresaba en ambas muestras de animales con lesiones difusas. Estas diferencias de expresión génica sugieren que estas quimioquinas desempeñan papeles diferentes en la infección por MAP. Mientras que *CXCL8/IL8* recluta neutrófilos, basófilos y linfocitos T al punto de infección, *CXCL10* atrae monocitos y linfocitos T mediante su unión con CXCR3. En la infección por MAP, al estar infra-expresada *CXCL8/IL8*, no se reclutan neutrófilos y no se resuelve la infección, mientras que *CXCL10* recluta monocitos y linfocitos T que participan en la formación del granuloma característico de la infección por MAP. Siete de los genes diferencialmente expresados correspondientes a la GO:0006955 aparecían desregulados tanto en PB como en ICV de los animales con lesiones difusas incluyendo *CCL14*, *Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 2* (*Ectonucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 2*; *ENPP2*), *Molécula CD36* (*CD36*

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Molecul; *CD36*), *CXCL8/IL8*, *Complejo mayor de histocompatibilidad bovina II (Bovine Major histocompatibility complex II ; BOLA-DQ β)*, *la cadena pesada del MHC I* y *El ENSBTAG00000040323*. De estos genes, *ENPP2*, *CD36*, *CXCL8/IL8* y el *BOLA-DQ β* se encontraban infra-expresados en PB e ICV de los animales con lesiones difusas respecto a los controles. La expresión reducida del MHC II bovino provoca una disminución de la presentación de antígenos y de la activación de los linfocitos T colaboradores en la infección por MAP (Purdie y col., 2012). Nuestros resultados muestran una reducción en la expresión de los genes *BOLA-DQ β* y *BOLA-DQB* en la PB de los animales con lesiones focales y difusas, respectivamente. En las muestras de ICV de animales con lesiones focales aparecían infra-expresados los siguientes genes *BOLA-DR α* , *BOLA-DMS*, *BOLA3* y *BOLA-DOB*, mientras que en la ICV de los animales con lesiones difusas se sobreexpresaban los genes *BOLA-DR α* , *BOLA-DMB* y *BOLA-DMA* lo que sugiere una activación de los linfocitos T colaboradores, presentación de antígenos y producción de anticuerpos a medida que las lesiones son más severas.

6.1.4. Análisis de rutas metabólicas

Estudios metabolómicos llevados a cabo en los últimos años, han establecido una clara diferencia entre animales infectados y no infectados con MAP en cuanto a metabolismo y balance energético en los estadios iniciales de la infección (De Buck y col., 2014). En nuestro estudio, no identificamos ninguna ruta metabólica enriquecida en muestras de PB, pero identificamos 3 rutas metabólicas enriquecidas en ICV de animales con lesiones focales: biosíntesis de N-glicano (map00510), metabolismo de purinas (map00230) y la ruta de reserva de carbono por folato (map00670). En concordancia con nuestros resultados, cambios en las concentraciones de N-Glicanos, como la manosa, han sido observados en etapas iniciales de la infección por MAP (De Buck y col., 2014). Además, recientemente se ha propuesto que *Mycobacterium tuberculosis* manipula el metabolismo del N-glicano en macrófagos humanos (Hare y col., 2017).

El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes diferencialmente expresados en ICV de animales con lesiones difusas mostró un enriquecimiento de la degradación de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) (map00280) y del metabolismo de purinas (map00230). La degradación de aminoácidos ramificados en estadios avanzados de la infección coincide con los fenómenos de malabsorción e hipoproteïnemia que se dan en las fases avanzadas de la enfermedad (Sweeney, 2011). Nuestro análisis también identificó el metabolismo de las purinas como una ruta enriquecida en ICV de animales con lesiones independientemente del tipo de lesión. De acuerdo con estos resultados, un estudio previo observó un aumento de la concentración de ATP en monocitos bovinos infectados con MAP (Woo y col., 2009). Mediante el software

STRING, observamos que la ruta metabólica de secreción biliar (bta04976) aparecía enriquecida en ICV de animales con lesiones focales. En el caso de la ICV de animales con lesiones difusas, la ruta del colesterol y la ruta de absorción y digestión de vitaminas se encontraban enriquecidas. Johansen y col., demostraron que MAP es capaz de manipular el metabolismo lipídico del hospedador y favorecer la acumulación de colesterol en el interior de los macrófagos infectados, lo que a su vez favorecía la supervivencia intracelular de MAP (Johansen y col., 2019). En concordancia con nuestros resultados, Stabel y col., demostraron que los niveles de la 25-hidroxivitamina D₃ eran significativamente más bajos en vacas con signos clínicos que en animales en estadios subclínicos o no infectados (Stabel y col., 2018). En conjunto, todos los resultados soportan la idea de que, los animales en fases avanzadas de la infección por MAP son incapaces de absorber y metabolizar la vitamina D₃, lo que da lugar a emaciación y caquexia.

6.1.5. Análisis de interacción proteína-proteína

El estudio de la interacción proteína-proteína llevado a cabo utilizando los genes diferencialmente expresados en muestras de PB de animales con lesiones focales detectó una asociación funcional *HBEGF-CXCL8/IL8*. Por otro lado, analizando los genes diferencialmente expresados en PB de animales con lesiones difusas se identificaron 11 asociaciones funcionales y 2 redes de proteínas centradas en *CXCL8/IL8* y en el gen *Cadena alfa 2 del colágeno tipo I (Collagen Type I Alpha 2 Chain; COL1A2)*. *COL1A2* aparecía asociado con el gen de la *proteína ácida y rica en cisteína (Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich; SPARC)*. Lin y col., observaron que la proteína SPARC se sobreexpresaba en monocitos derivados de macrófagos bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* (Lin y col., 2015). SPARC, también conocida como osteonectina, es una proteína que se une al colágeno y que resulta necesaria para el desarrollo de estructuras de tipo granuloma en el curso de infecciones crónicas (Rotta y col., 2008). En nuestro análisis, *SPARC* y *COL1A2* aparecían ambos sobre-expresadas en PB de animales con lesiones difusas, lo que sugiere que la expresión de ambas proteínas sería indicativa de mal pronóstico en los animales infectados con MAP.

Utilizando los genes diferencialmente expresados en muestras de ICV de animales con lesiones focales se detectaron 13 asociaciones funcionales, y una red de proteínas centrada en *CXCL8/IL8*. En muestras de ICV de los animales con lesiones difusas se observó una red centrada en *MAPK8*. *MAPK8* aparecía infra-expresado en ICV de animales con lesiones focales y difusas respecto a los controles ($\log_2\text{fold} = -1.7$ y -2.1 respectivamente). Estos resultados confirman la

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hipótesis de que la infección por MAP impide la activación de la vía MAPK8-CXCL8/IL8, lo que favorece la supervivencia de MAP y su posterior diseminación.

6.1.6. RT-qPCR Log₂fold

La validación de algunos de los genes que presentaban expresión diferencial en el RNA-Seq se realizó mediante RT-qPCR. Para ello se seleccionaron ocho genes diferencialmente expresados, cuatro en sangre (*ABCA13*, *DES*, *CXCL10/IL10* y *CXCL8/IL8*) y cuatro en válvula ileocecal (*ITLN2*, *FABP6*, *HSPA6* y *CXCL10*). Los resultados fueron concordantes entre ambos análisis confirmándose la sobre o infra expresión de cada gen tal y como se puede observar en la figura 14. Los resultados fueron concordantes entre ambos análisis, de tal manera que cuando un gen se encontraba sobre o infraexpresado por RNA-Seq seguía la misma tendencia en el análisis por qRT-PCR (Figura 14). Se observó que la sensibilidad del RNA-seq era mayor que la del qRT-PCR ya que muchos de los genes cuya expresión era estadísticamente significativa entre animales con lesiones respecto a los controles por RNA-Seq no lo era por qRT-PCR. En el caso de las muestras de ICV, el HSPA6 mostró diferencias de expresión significativas por RNA-Seq y qRT-PCR. El CXCL10 se encontraba diferencialmente expresado tanto en PB como en ICV de animales con lesiones difusas y las diferencias de expresión en relación al grupo control fueron significativas tanto por qRT-PCR como por RNA-Seq.

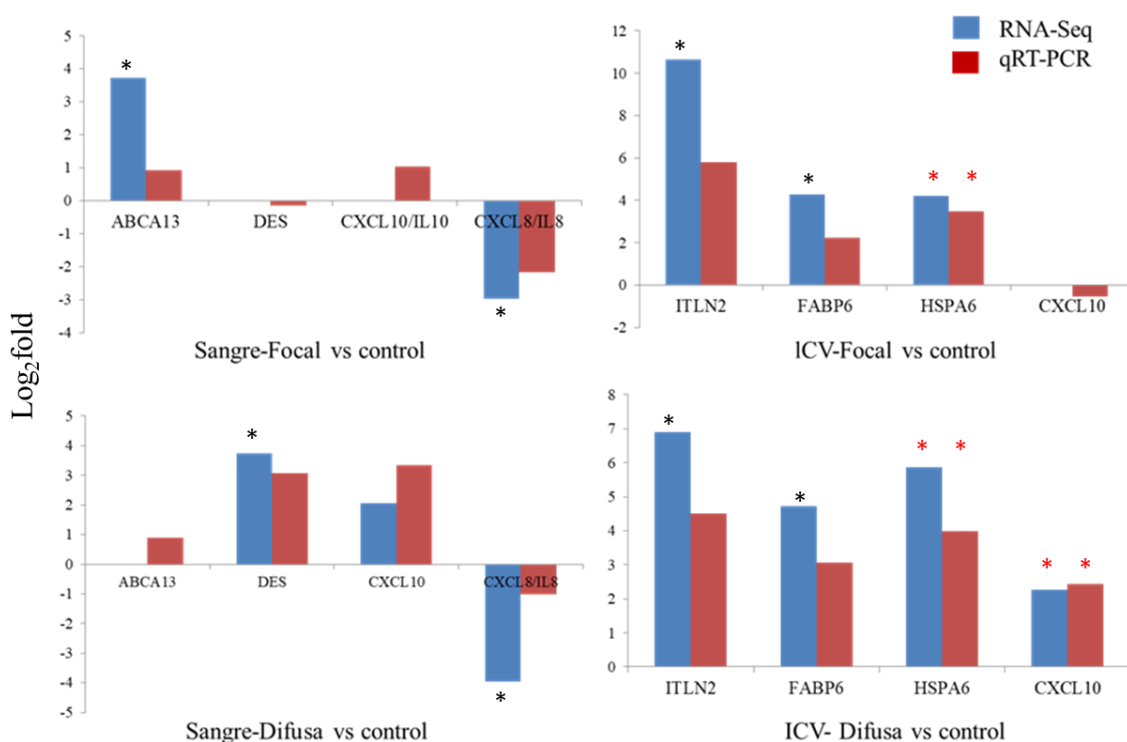


Figura 22. Comparación de los niveles de expresión diferencial (log₂fold) de los genes seleccionados mediante RNA-Seq (azul) y RT-qPCR (rojo).

6.1.7. Aplicaciones de los resultados del análisis RNA-Seq al diagnóstico de la PTB bovina

Nuestro estudio ha permitido identificar genes diferencialmente expresados en PB e ICV de animales infectados y con diversas lesiones asociadas a la PTB versus animales sin lesión. Las proteínas codificadas por estos genes del hospedador, pueden ser utilizadas como biomarcadores con aplicación en el desarrollo de nuevos test diagnósticos, vacunas y agentes terapéuticos. La detección de animales en estadios subclínicos empleando test diagnósticos basados en biomarcadores sobre-expresados en muestras de animales infectados, supondría una mejora en el control de la enfermedad sobre todo porque permitiría identificar a todos los animales infectados en una explotación con o sin clínica de PTB. En colaboración con el departamento de Sanidad Animal del SERIDA, la información proporcionada por nuestro estudio fue posteriormente utilizada para la puesta a punto y validación de ELISAs y nuevos métodos inmunohistoquímicos dirigidos a identificar animales con lesiones focales difícilmente detectables con los métodos tradicionales de diagnóstico de la PTB (Blanco-Vázquez y col., 2020, 2021, 2022). En el primer caso se seleccionaron 2 genes diferencialmente expresados en PB de vacas con lesiones focales, *ABCA13* y *Metalopeptidasa de la matriz 8 (Matrix Metallopeptidase 8; MMP8)*, y 3 genes diferencialmente expresados en PB de animales con lesiones difusas, *Dominio LRAT que contiene 1 (LRAT Domain Containing 1; FAM84A)*, *SPARC* y *DES* (Blanco-Vázquez y col., 2020). El potencial diagnóstico de estos biomarcadores se evaluó utilizando ELISAs comerciales diseñados para su detección en muestras de suero de animales infectados con distintas lesiones (N= 88) y animales no infectados (N= 67). El ELISA basado en el biomarcador *ABCA13* ($\log_2\text{fold}$: 3,7 en PB de animales con lesiones focales) fue el que presentaba una mayor sensibilidad para la detección de animales infectados con lesiones focales (AUC: 0,837, sensibilidad: 79,25% y especificidad: 88,06%) y para la detección de animales con cualquier tipo de lesión (AUC 0,793, sensibilidad 69,41% y especificidad 86,57%). Los ELISAs basados en *SPARC* y *MMP8* fueron los que mostraron mayor capacidad diagnóstica para la detección de animales con lesiones multifocales (AUC: 0,852) y difusas (AUC: 0,831), respectivamente. Estos resultados tan prometedores nos llevaron a solicitar una patente internacional que protegiera el uso del *ABCA13* como método de diagnóstico

Por otro lado, Blanco-Vázquez y col., demostraron la utilidad de la *ITLN2* como bioamarcador de la infección por MAP en muestras de ICV de animales infectados. Se detectó un aumento significativo de la media de células inmunomarcadas con anticuerpos anti-*ITLN2* en cortes de tejido de vacas con lesiones focales ($116,9 \pm 113,9$) respecto a vacas con lesiones multifocales ($108,7 \pm 140,5$), difusas ($76,5 \pm 97,8$) y respecto a vacas control sin lesiones ($41,0 \pm 81,3$), lo que sugiere que la cuantificación de células secretoras de *ITLN2* mediante inmunohistoquímica podría

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

representar una buena herramienta diagnóstica post-mortem que mejoraría la identificación de animales con lesiones focales difícilmente detectables por análisis histopatológico (Blanco Vázquez y col., 2021).

6.2. Identificación de loci asociados con la susceptibilidad a la PTB bovina y con la desregulación de la expresión de los genes *MECOM*, *eEF1A2* y *U1snRNA*

Estudios recientes que han utilizado la tecnología de secuenciación de ARN de nueva generación (RNA-Seq) han permitido comprender mejor los mecanismos moleculares implicados en la respuesta local y sistémica frente a la infección natural por MAP. Aunque los estudios transcriptómicos permiten conocer los genes y los mecanismos implicados en la respuesta a la infección por MAP, no revelan si existe una variación en la respuesta transcripcional entre individuos y cómo esto podría influir en el desencadenamiento o no de la enfermedad. En este estudio, se integraron los datos de expresión génica obtenidos por RNA-Seq y datos de genotipado del chip Euro G10K MD de Illumina, de 14 vacas infectadas por MAP en condiciones naturales utilizando un análisis de regresión lineal. El objetivo principal era identificar *cis*-eQTLs significativamente asociados a cambios en los niveles de expresión génica en muestras de PB y de ICV y su asociación con la susceptibilidad a la infección por MAP. Para comprobar si los *cis*-eQTLs identificados afectaban no sólo a la expresión génica sino también al riesgo de PTB, se realizó un estudio de asociación caso-control utilizando los genotipos de todos los *cis*-eQTLs identificados y los datos fenotípicos de una población de 986 vacas sacrificadas y caracterizadas por PCR, cultivo y análisis histopatológico. Nuestro estudio la primera descripción sobre el papel de los *cis*-eQTLs en la regulación de la transcripción génica y la susceptibilidad a la infección por MAP. La introducción de estas nuevas variantes en los programas de selección asistida por marcadores podría tener un efecto relevante en el control de la PTB, al permitir seleccionar animales menos susceptibles a la infección por MAP.

6.2.1. Identificación de *cis*-eQTLs

Los animales incluidos en este estudio se caracterizaron mediante distintos test diagnósticos de PTB: ELISA, PCR, cultivo bacteriológico y análisis histopatológico tal y como se ha descrito para el estudio de RNA-Seq (Alonso-Hearn y col., 2019). Todos los animales control (N= 4) presentaban resultado negativo para todos los test diagnósticos utilizados. Por otro lado, los animales infectados presentaban diferentes tipos de lesiones: focales (N= 6) y difusas (N= 4). Para el presente estudio se utilizó el número de lecturas de genes procedentes de muestras de PB e ICV de cada animal y el genotipado de los animales obtenido con el chip MD EuroG10K Bead Chip de Illumina. Las lecturas individuales para cada muestra se cuantificaron utilizando el software

RSubread (Liao y col., 2013) y se normalizaron con el software DESeq2 (Love y col., 2014). La edad de los animales se incluyó como covariable en el análisis. En conjunto, el estudio incluye información de 54.609 SNPs y valores de expresión de 24.616 genes de 28 muestras. Se generó una base de datos genómico-transcriptómica integrada que se analizó mediante un modelo de regresión lineal con el software Matrix eQTL 2.2 (Shabalin, 2012).

Tras realizar el análisis de regresión lineal con Matrix eQTL 2.2, se identificaron 192 y 48 *cis*-eQTLs asociados con la expresión de 145 y 43 genes en PB e ICV, respectivamente. Cabe destacar que solo uno de los *cis*-eQTLs identificados en este estudio (rs109604269; $P_{FDR} = 0,011$) había sido previamente asociado a la susceptibilidad a la infección por MAP (Gao y col., 2018). La mayoría de los *cis*-eQTLs identificados se encontraban en regiones intrónicas o intergénicas. El *cis*-eQTL con el valor de P corregido más bajo ($P_{FDR} = 4.593 \times 10^{-14}$) detectado en muestras de PB fue el rs109475758 que aparecía asociado con el gen *Obscurina* (*Obscurin*; OBSC), un gen altamente mutado en diversos tipos de cáncer. El genotipo heterocigoto para el rs109475758 (T/G) dio lugar a un aumento de la expresión del gen *OBSC*, mientras que el genotipo homocigoto dominante (T/T) se correlacionó con niveles bajos de expresión del gen. En muestras de ICV, el *cis*-eQTL más significativo identificado fue el rs41753850 que se asociaba con la expresión del gen *Apolipoproteína A4* (*Apolipoprotein A4*; *APO4*) con un valor de $P_{FDR} = 8,413 \times 10^{-11}$. El gen *APO4* codifica lipoproteínas de alta densidad (High density lipoprotein; HDL) circulantes y desempeña un papel importante en el transporte del colesterol y el metabolismo lipídico. El rs41753850 también aparecía asociado con la expresión del gen *Apolipoproteína C3* (*Apolipoprotein C3*; *APOC3*), con un valor de $P_{FDR} = 0,0031$. *APOC3* desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de los triglicéridos y se ha considerado un componente principal de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (Very low density lipoprotein; VLDL). En nuestro análisis, el genotipo heterocigoto del rs41753850 (C/A) se relacionó con mayores niveles de expresión de *APOA4* y *APOC3*, mientras que el genotipo homocigoto dominante (C/C) se correlacionó con niveles más bajos de expresión de dichos genes.

6.2.2. Estudios de asociación caso-control

Si los niveles de expresión de los genes regulados por los *cis*-eQTLs identificados tenían algún efecto en el riesgo a la PTB, se deberían poder detectar diferencias entre las variantes alélicas de estos *cis*-eQTLs y resultados de test diagnósticos de la PTB. En base a este concepto, llevamos a cabo un estudio de asociación caso-control utilizando los 235 *cis*-eQTLs identificados y datos de test diagnósticos para la PTB de 986 vacas frisonas sacrificadas en mataderos del País Vasco durante un periodo de 3 años. Entre los datos fenotípicos de estos animales se incluían los

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultados de ELISA, PCR y cultivo de tejidos y la presencia o no de lesiones asociadas a la PTB en muestras de tejido intestinal. Las asociaciones se analizaron con la función *WGassociation* de *SNPassoc* 1.9.2 bajo cinco modelos genéticos diferentes (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo) (González y col., 2007), detectándose 3 SNPs significativamente asociados con fenotipos de PTB: rs43744169, rs110345285 y rs109859270. La presencia del alelo menor en el rs43744169 (T/C) estaba asociada con niveles más altos de expresión del gen *MECOM*, con la presencia de lesiones histopatológicas y con resultados positivos de ELISA, PCR y cultivo bacteriológico y con un mayor riesgo de padecer PTB clínica. Para el rs43744169, el OR con un intervalo de confianza (IC) del 95% bajo el modelo genético codominante para los genotipos T/C y C/C fue de 2,71 (IC del 95%: 1,50-4,88) y 5,36 (IC del 95%: 1,99-14,41), respectivamente. Estos resultados indicaron que la proporción de heterocigotos T/C y homocigotos recesivos C/C con un resultado positivo de ELISA, cultivo y PCR fue significativamente mayor en los casos en comparación con las vacas control. Según el modelo dominante, los genotipos T/C y C/C aumentaban el riesgo de PTB; OR = 2,98 (IC 95%: 1,70-5,24). En humanos se han identificado variantes alélicas relacionadas con el gen *MECOM* asociadas con la IBD (Naito y col., 2018). Variantes alélicas que resultan en expresión del gen *MECOM* se han relacionado con diferentes tipos de cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal y la leucemia mieloide aguda (Glass y col., 2013; Fehringer y col., 2016). Estudios previos han demostrado que el gen *MECOM* actúa como un oncogén regulando rutas de señalización que conducen a una mayor proliferación tumoral (Yoshimi & Kurokawa, 2011). Estudios llevados a cabo en líneas celulares han demostrado el papel desempeñado por el *MECOM* en el control transcripcional del proto-oncogén c-Fos, el TGF- β y la ruta proliferativa de la proteína activadora 1 (AP1) (Tanaka y col., 1994). Por otro lado, el *MECOM* se une a las regiones promotoras de la mayoría de los genes implicados en la ruta JAK-STAT (Kiu & Nicholson, 2012). Un exceso de activación de JAK-STAT conduce a diversas patologías inflamatorias y hematopoyéticas. Algunos autores han sugerido que el gen *MECOM* se sobreexpresa en presencia de estímulos inflamatorios incluyendo la presencia de bacterias y que, mutaciones en dicho gen en ratones, aumentarían la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Hood y col., 2016). Otra de las funciones del gen *MECOM* es la de regular la respuesta inflamatoria mediada por el factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (Xu y col., 2012). El NF- $\kappa\beta$ es un factor crítico en la respuesta inmune del intestino frente a patógenos y un promotor de la inflamación asociada a carcinomas en el tracto gastrointestinal (Sun y col., 2014). Nuestros resultados sugieren que la presencia del alelo menor en el *cis*-eQTL regulador de la expresión del gen *MECOM* podría provocar una respuesta pro-inflamatoria exacerbada mediada por NF- $\kappa\beta$ que, al ser mantenida a lo largo del tiempo, agravaría la lesión tisular provocada por la infección por MAP. Esto estaría en

concordancia con los resultados obtenidos por Kiser y col. que identificaron asociaciones entre 7 genes de la ruta del $NF-\kappa\beta$ (*Fosfatasa de doble especificidad 10, Dual Specificity Phosphatase 10 (DUSP10)*; *Inhibidor de la subunidad beta de la quinasa del factor nuclear Kappa B, Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta (IKBKB)*, *Subfamilia de receptores nucleares 4 Grupo A Miembro 1; Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1 (NR4A1)*, *Proteína Kinasa C alfa , Protein Kinase C Alpha (PRKCA)*; *Familia de transportadores de solutos 2 miembro 5, Solute carrier family 2 member 5 (SLC2A5)*; *Factor de crecimiento transformante Beta 2, Transforming Growth Factor Beta 2 (TGFB2)* y *Subunidad reguladora de la fosfoinositida-3-kinasa 1, Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1 (PIK3R1)*) y la infección por MAP en dos poblaciones de vacas frisona mediante cultivo bacteriológico de tejido intestinal (Kiser y col., 2018).

El estudio caso-control identificó un segundo *cis*-eQTL, rs10345285 (T/C), asociado con la expresión del gen *eEF1A2* y con niveles de anticuerpos anti-MAP medidos por ELISA. Concretamente, el genotipo heterocigoto para el *cis*-eQTL-rs10345285 (T/C) se asoció con la mayor expresión de *eEF1A2* en relación a las vacas con el genotipo homocigoto dominante (T/T) ($P_{FDR} = 1,23 \times 10^{-10}$). De acuerdo a los modelos codominante y recesivo, se observaron valores superiores de OD del ELISA asociados con el genotipo homocigoto menos frecuente (C/C) en el rs10345285 (OD= 80) cuando se comparaba con vacas con el genotipo homocigoto dominante (T/T) (OD = 0,29) o con el genotipo heterocigoto (T/C) (OD= 0,26). El *eEF1A2* es un factor implicado en la síntesis de proteínas y con funciones anti-apoptóticas, migratorias y pro-metastásicas en el desarrollo de procesos tumorales (Sun y col., 2014; Liu y col., 2017). Estudios mecanísticos revelaron que las vías de señalización PI3K/Akt / $NF-\kappa\beta$ y JAK/STAT desempeñan un papel importante en la mediación de los efectos del *eEF1A2* (Li y col., 2010). La expresión del gen *eEF1A2* está asociado con la formación de filopodia que desempeñan un papel importante en procesos de migración celular e invasión (Amiri y col., 2007). Altos niveles de expresión del *eEF1A2* se asocian con la severidad y probabilidad de desarrollar metástasis de diferentes cánceres, así como con algunos casos de mieloma múltiple, una neoplasia de células plasmáticas en humanos (Lee & Surh, 2009). Además, *eEF1A2* es capaz de bloquear la apoptosis y favorecer la replicación vírica (Abbas y col., 2015). En este contexto, nuestro estudio sugiere que las vacas infectadas con MAP portadoras del alelo de riesgo para el rs10345285 (C) exhibirían niveles elevados de *eEF1A2* que reducirían su supervivencia respecto a aquellos animales que no lo expresen.

El estudio caso-control también identificó una asociación significativa entre el *cis*-eQTL rs109859270 (C/T) y la presencia de lesiones histopatológicas asociadas a la PTB. El genotipo

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

heterocigoto para el *cis*-eQTL-rs109859270 (C/T) localizado en el BTA8 se asoció con mayores niveles de expresión del *UI* ($P_{FDR} = 0,0068$). Bajo el modelo genético dominante, el OR para los genotipos C/T y T/T respecto al genotipo C/C fue de 1.64 (95% IC, 1.24-2.16), lo que indica que la proporción de animales con una o dos copias del alelo menor era significativamente superior en aquellos animales con presencia de lesiones asociadas a la PTB cuando se comparaban con animales control. El gen *UI* forma parte del complejo spliceosoma que incluye a los *UI*, *U2*, *U4*, *U5* y *U6* *uridyl-rich small nuclear RNPs (snRNPs)* (Nilsen, 2003; Wahl y col., 2009). El *UI* snRNP juega un papel esencial en definir el punto de inicio 5' de splicing. Aparte de sus funciones en el splicing, el *UI*snRNP también protege a los pre-RNA de una terminación y ruptura prematura en sitios de poliadenilación alternativos (Premature cleavage and polyadenylation; PCPA), habiéndose observado este fenómeno en células inmunes, neuronales y cancerígenas activadas (Kaida y col., 2010). Alteraciones en el *UI* pueden provocar defectos en el splicing de los pre-mRNA, los que constituye la causa de numerosas enfermedades (Faustino & Cooper, 2003). Las células de los mamíferos requieren que los niveles de expresión del gen *UI* se mantenga en un rango determinado para prevenir la terminación prematura de los transcritos vía PCPA (Cheng y col., 2017). En macrófagos humanos, la sobreexpresión del *UI* snRNA se asocia con una disfunción de la fusión del autofagosoma-lisosoma (Cheng y col., 2018). Estudios recientes han demostrado que la infección de macrófagos humanos con *Mycobacterium tuberculosis* da lugar a importantes alteraciones de los mecanismos normales de splicing del hospedador (Kalam y col., 2017, 2018). Además, dos genes relacionados con la funcionalidad de los macrófagos: *Gen de diferenciación de monocitos a macrófagos (Monocyte to macrophage differentiation gene; MDM)* y el *Adenosina desaminasa (Adenosine Deaminase; ADA)* sufrirían diferentes procesos de splicing en el íleon de animales infectados con MAP en relación a los animales controles, sugiriendo un posible mecanismo mediante el cual MAP escaparía de la respuesta inmune del hospedador (Liang y col., 2016). Nuestros resultados sugirieron que el genotipo heterocigoto para el rs109859270 (C/T) daría lugar a mayores niveles de expresión del *UI snRNA*, a alteraciones en el proceso de splicing y aumentaría la probabilidad de desarrollar lesiones asociadas a la PTB. Por el contrario, el genotipo homocigoto dominante (C/C) mantendría los niveles de expresión de *UI snRNA* en un rango restringido asociándose con un riesgo de infección más controlado. Aunque nuestro estudio sugiere que la infección con MAP provocaría cambios significativos en los procesos de splicing de los animales infectados, se necesitan estudios mas específicos que permitan comprender las posibles alteraciones de los mecanismos del splicing que tienen lugar tras la infección por MAP.

En general se puede concluir que, la presencia de los alelos menores para el rs43744169 y el rs109859270 aumentó el riesgo de PTB, por lo que la selección en contra de los alelos menores del rs43744169 y el rs109859270 podría reducir el riesgo de PTB.

6.2.3. Validación funcional del *cis*-eQTL-rs43744169

Dado que nuestros resultados indicaban que el *MECOM* juega un papel crítico en la progresión a la PTB clínica y dado que el rs43744169 regulador de este gen se asociaba con un número mayor de fenotipos de PTB que los otros dos *cis*-eQTLs identificados, se decidió priorizar el *cis*-eQTL-rs43744169 para validarlo en ensayos funcionales. Concretamente, el genotipo heterocigoto (T/C) para el *cis*-eQTL-rs43744169 se asoció con mayores niveles de expresión del gen *MECOM* ($P_{\text{FDR}} = 0,00003$). Utilizando un ELISA cuantitativo para la detección del *MECOM* bovino, analizamos los niveles de *MECOM* en muestras de plasma de vacas con lesiones focales y con los tres genotipos para el rs43744169 (T/T, T/C, C/C). El genotipo heterocigoto (T/C) y el homocigoto recesivo (C/C) se asociaron con una expresión significativamente mayor de la proteína *MECOM* (19,60 y 8,62 ng/ml, respectivamente) en comparación con la concentración de *MECOM* en muestras de plasma de vacas con el genotipo homocigoto dominante (T/T, 3,90 ng/ml). Este resultado confirmó que los aumentos de expresión del gen *MECOM* se correlacionaban con niveles más altos de expresión de la proteína.

La asociación entre la susceptibilidad a la infección por MAP y los genotipos del *cis*-eQTL-rs43744169 (T/T y T/C) se confirmó también mediante un ensayo de supervivencia intracelular de MAP en macrófagos derivados de monocitos (MDM). Para este ensayo, se aislaron MDMs de sangre periférica de vacas frisonas no infectadas y con los genotipos *cis*-eQTL-rs43744169 T/T (N= 8) y T/C (N= 8) y se infectaron *in vitro* con una cepa virulenta de MAP (cepa K10). La carga bacteriana (log de formación de colonias, log CFU) a las 2 h y a los 7 días post-infección se calculó tal y como se ha explicado en el punto IV.2.8. Los MDMs de animales con el genotipo dominante T/T fueron capaces de fagocitar mayor cantidad de MAP a las 2 h p.i. ($P = 0,0031$) y también se asociaban con una mayor eliminación de MAP a los 7 días post-infección en comparación con el genotipo heterocigoto T/C ($P = 0,020$). Estos resultados sugieren un efecto significativo del genotipo heterocigoto *cis*-eQTL-rs43744169 sobre la supervivencia bacteriana dentro de los macrófagos y confirman que las variantes alélicas en *cis*-eQTLs modulan la susceptibilidad a la infección por MAP. Además, nuestros resultados demostraron por primera vez que la variación de la respuesta de los macrofagos a la infección y supervivencia intracelular de MAP tiene un componente genético que merece ser explorado en profundidad en estudios posteriores.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3. Identificación de regiones genéticas asociadas a la susceptibilidad a la infección por MAP en ganado bovino utilizando combinaciones de test diagnósticos y datos de genotipo imputado a secuencia completa

El objetivo principal de este estudio fue calcular la varianza y las estimas de h^2 e identificar QTLs y genes candidatos asociados a la infección por MAP en vacas frisonas españolas (N= 983), utilizando combinaciones de resultados de varios test diagnósticos y datos de genotipado imputados a WGS. Este GWAS es único en cuanto a la definición de casos y controles mediante la combinación de diferentes técnicas diagnósticas incluyendo el ELISA para la detección de la respuesta humoral frente a MAP y la PCR y el cultivo para la detección de la bacteria en muestras de tejido intestinal. La combinación de los test diagnósticos en la que los positivos a todos los test eran casos y los negativos a todos los test eran controles (+/-), se utilizó para aumentar la sensibilidad diagnóstica. Además, el tamaño de la población estudiada (N= 983) era mayor que el utilizado en estudios previos llevados a cabo con el EuroG MD BeadChip en el que los casos se definían como positivos a PCR y Cultivo de tejidos (N= 459) y no se incluían resultados de ELISA (Kiser y col., 2017). Aunque existe un estudio previo que combina datos obtenidos de dos GWAS para identificar loci asociados a la infección por MAP en tejidos y a la respuesta humoral a la infección (Minozzi y col., 2012), nuestro estudio es el primero en comparar la genética asociada con combinaciones de resultados de test diagnósticos antemortem y postmortem utilizando WGS.

6.3.1. Animales y diagnóstico de PTB

Los 983 animales empleados en este estudio fueron caracterizados para la PTB mediante test serológicos y microbiológicos: ELISA para la detección de anticuerpos anti-MAP y PCR y cultivo de tejidos para la detección de MAP (Vázquez y col., 2014a). La frecuencia de animales positivos a ELISA, PCR y cultivo en la población de estudio fue de 7,12, 15,26 y 27,62%, respectivamente. Además también se tuvieron en cuenta los valores de OD obtenidos mediante ELISA cuyos valores oscilaban entre 0,028 y 3,108. La media en los animales con resultado negativo de ELISA era de $0,178 \pm 0,16$ y en los animales positivos a ELISA $1,882 \pm 0,80$. MAP se detectó mediante cultivo de tejidos y PCR en la mayoría de los animales positivos al ELISA: 80% y 84%, respectivamente.

6.3.2. Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad

Las 983 vacas incluidas en este estudio se genotiparon con el Bovine MD SNP50 Bead Chip, y los genotipos correspondientes se imputaron a WGS utilizando la población de referencia del proyecto 1.000 Bulls genomes. En total, se identificaron 33,77 millones de SNP por animal en todo el genoma. En la población incluida en nuestro estudio, los componentes de la varianza y las estimas de la heredabilidad calculadas empleando un modelo linear mixto fueron moderadas, entre

0,054 y 0,139 dependiendo del test diagnóstico o combinación de test diagnósticos empleados. Estudios previos estimaron que la susceptibilidad a la infección por MAP es un carácter heredable con estimas de heredabilidad que oscilan entre valores inferiores a 0,01 (Koets y col., 2000) a 0,28 (Küpper y col., 2014). Estos datos son comparables a la heredabilidad moderada estimada para la tuberculosis bovina ($h^2=0,12$) (Ring y col., 2019).

Cuando se consideró el ELISA como un fenotipo binario (positivo/negativo) se obtuvieron estimas de h^2 más altas ($h^2=0,075$) en comparación con las estimaciones de h^2 de la OD del ELISA ($h^2=0,057$). Se observó que la combinación de diversos test diagnósticos incrementaba la estima de heredabilidad, obteniendo los valores de h^2 más elevados cuando se utilizaba la combinación de ELISA-PCR-Cultivo positivo respecto a ELISA-PCR-Cultivo negativo (+/-) ($h^2=0,139$), seguido del cultivo de tejidos ($h^2=0,101$), el ELISA-cultivo de tejidos ($h^2=0,099$), el cultivo de tejidos-PCR de tejidos ($h^2=0,086$) y la PCR de tejidos-ELISA ($h^2=0,081$). A excepción del cultivo de tejido ($h^2=0,101$), la baja heredabilidad obtenida para el resto de los test diagnósticos cuando se analizaban de manera individual puede explicarse por la falta de sensibilidad de estos métodos para la detección de animales en estadios subclínicos de la infección por MAP (falsos negativos). Mientras que las vacas que presentan resultado positivo a ELISA, PCR o cultivo son con total seguridad animales infectados, los animales que presentan un resultado negativo a dichos test pueden suponer falsos negativos, no haber estado expuestos a MAP o ser animales resistentes a la enfermedad. Mientras que un resultado positivo siempre está asociado con la susceptibilidad a la PTB, un resultado negativo no siempre implica resistencia.

6.3.3. Identificación de SNPs significativos mediante GWAS

Para explorar la base genética del hospedador en relación a la infección por MAP, se llevó a cabo un análisis de tipo GWAS utilizando datos de genotipado imputados a secuencia completa y combinaciones de test diagnósticos que presentasen estimas de heredabilidad superiores a 0,08. Los fenotipos que mostraron SNPs con una $h^2 \geq 0,08$ fueron las combinaciones de ELISA-PCR-Cultivo, ELISA-Cultivo y ELISA-PCR. Tras la corrección del valor de P ($P_{FDR} \leq 0,05$) los SNPs se clasificaron como moderadamente asociados a la PTB si presentaban valores de P entre 5×10^{-5} y 5×10^{-7} , y como altamente asociados si el valor de P era inferior a 5×10^{-7} . En las combinaciones fenotípicas estudiadas con h^2 mayor de 0,08, los SNPs más significativos se localizaban en el cromosoma BTA23 y la mayoría de los SNPs altamente asociados se ubicaban en regiones intrónicas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando la combinación ELISA-Cultivo, el análisis reveló 4.309 y 238 SNPs moderada y altamente asociados con esta combinación, respectivamente. Por otro lado, se identificaron 3.440 y 159 SNPs moderada y altamente asociados a la combinación ELISA-PCR-Cultivo (+/-). En esta combinación, los animales se consideraban casos cuando presentaban resultado positivo a todos los test diagnósticos y controles cuando presentaban resultado negativo a todos ellos. Los OR de los SNPs altamente asociados a dicha combinación fueron superiores a 1, lo que indica que los animales portadores del alelo menor presentan mayor probabilidad de resultar positivos a ELISA, PCR y cultivo bacteriológico.

6.3.4. Identificación de QTLs y genes candidatos

En total se identificaron 12 QTLs asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP ($P \leq 5 \times 10^{-7}$) en 8 cromosomas (BTA4, BTA5, BTA11, BTA12, BTA14, BTA23, BTA24 y BTA28). De estos 12 QTLs, 3 localizados en BTA5 y BTA23 aparecían asociados a la infección por MAP en todas las combinaciones de fenotipos analizadas, mientras que los 2 QTLs localizados en los cromosomas BTA11 y BTA28 estaban específicamente asociados con la combinación ELISA-Cultivo y un QTL localizado en el BTA12 estaba específicamente asociado con la combinación ELISA-PCR. Utilizando la combinación ELISA-PCR de tejidos, identificamos el QTL más grande (4,12 Mb) en el BTA5. Utilizando la combinación ELISA-PCR de tejidos, identificamos el QTL más grande (4,12 Mb) en el BTA5. Los 159 SNPs asociados con el fenotipo con mayor h^2 , ELISA-PCR-cultivo de tejidos (+/-), se localizaban en 5 QTLs que se distribuían en los BTA5 y BTA23. El BTA23 albergaba 4 de los 5 QTLs. Los dos QTLs que albergaban el mayor número de SNP significativamente asociados estaban localizados en el BTA23 (15,09-16,86 y 18,81-22,95 Mb).

Se identificaron genes candidatos en todos los QTLs excepto en uno de los QTLs localizados en el BTA4 (108,1-109,2 Kb). Para la combinación de fenotipos de mayor h^2 (ELISA-PCR-Cultivo (+/-)), se detectaron 114 genes candidatos, 25 de los cuales localizados en el BTA23. Los genes candidatos identificados en este estudio son nuevos en el sentido de que no han sido asociados con el riesgo a la PTB anteriormente, aunque algunos de estos genes sí que han sido previamente asociados a la mastitis o a la tuberculosis bovina.

Comparando estos resultados con las bases de datos disponibles (www.animalgenome.org) observamos que los QTLs identificados en los BTA23 (18.81-22.95Mb), BTA24 (45.72-46.72Mb) y BTA12 (67.71-68.71Mb) coincidían con cuatro regiones previamente descritas como asociadas a la susceptibilidad a la PTB: QTL14876, QTL166685, QTL139831 y QTL211947 (Kirkpatrick y col., 2011; Del Corvo y col., 2017; Gao y col., 2018; Sanchez y col., 2020). Nuestros datos confirman

que genes presentes en estas regiones como el *Receptor acoplado a la proteína G de adhesión F1* (*Adhesion G protein-coupled receptor F1*; *ADGRF1*), *Receptor acoplado a la proteína G de adhesión F5* (*Adhesion G protein-coupled receptor F5*; *ADGRF5*), *Miembro de la superfamilia de receptores del TNF 21* (*TNF receptor superfamily member 21*; *TNFRSF21*), *Defensina β 110* (*defensin β 110*; *DEFB110*) y *Defensina β 114* (*defensin β 114*; *DEFB114*) están asociados con la infección por MAP. Estudios previos han demostrado que las defensinas β son moléculas efectoras de mucha importancia en la defensa del hospedador frente a la infección por MAP que son rápidamente movilizadas por el epitelio intestinal (Stolzenberg y col., 1997). *ADGRF1* y *ADGRF5*, también conocidos como *GRP110* y *GRP116*, son receptores de la proteína G que tienen un importante papel regulador en la progresión y el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias en humanos, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de pulmón, el cáncer gástrico, el cáncer de próstata, el glioma y el cáncer colorrectal (Ma y col., 2020). Por otro lado, el *TNFRSF21* es miembro de la familia TNF/TNFR y juega un papel crítico en el reconocimiento de patógenos, la respuesta inmune, la inflamación y la progresión tumoral (Locksley y col., 2001; Strilic y col., 2016). La proteína codificada por este gen activa el factor *NF- κ B* y la *MAPK-8* e induce la apoptosis celular. Fang y col., demostraron que los niveles de *TNFRSF21* aumentaban de manera significativa en leucocitos de sangre periférica de vacas con mastitis lo que subraya su importancia en la regulación de la inflamación en los procesos de mastitis en bovinos (Fang y col., 2017). Aunque el *TNFRSF21* no se ha asociado con el riesgo a PTB, se sabe que otros miembros de la superfamilia de receptores del TNF, como el *TNFRSF18* y el *TNFRSF4*, estimulan la respuesta inmunitaria mediada por células Th1 y se han identificado previamente como genes candidatos asociados a la PTB (Mallikarjunappa y col., 2018b). Más recientemente, el papel del *TNFRSF21* en la regulación de la susceptibilidad a la mastitis se ha descubierto mediante un análisis GWAS y análisis post-transcripcional (Fang y col., 2017). Varios QTLs asociados a la PTB identificados en el presente estudio se localizaban en regiones previamente asociadas a la mastitis: QTL30823, QTL30824, QTL30825, QTL30826, QTL161601 y QTL65863 (Wojdak-Maksymiec y col., 2013; Tiezzil y col., 2015; Fang y col., 2017; Cai y col., 2018; Yang y col., 2019). En la tabla XV se muestran los QTLs identificados en el presente estudio que son coincidentes con los ya descritos para otros caracteres relacionados como los niveles de IgG, la resistencia a garrapatas, la susceptibilidad a la tuberculosis bovina, a la mastitis, a la PTB, la duración de la vida productiva, el índice de células somáticas y la carga de nematodos gastrointestinales.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Otros genes candidatos identificados en el BTA23 (18.81-22.95Mb) incluían genes implicados en procesos de splicing (*U6*), invasión y migración tumoral: *Canal intracelular de cloro 5* (*Chloride Intracellular Channel 5*; *CLIC5*), *Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 4* (*Ectonucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 4*; *ENPP4*) y *Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 5* (*Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 5*; *ENPP5*) y en la regulación del calcio (*Factor nuclear de calcineurina de las células T activadas*, *Calcineurin nuclear factor of activated T cells*; *RCAN2*). Esta región coincidía con QTLs asociados a la infección por *Mycobacterium bovis* en un estudio GWAS multirraza llevado a cabo con ganado Charolés, Limusin y Frisón (BTA23:19.44-22.72Mb) (Ring y col., 2019). En esta región se localiza el gen *RCAN2* que es responsable de la regulación de la calcineurina 2. Se ha descrito que la activación de la calcineurina favorece la supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis* al prevenir la maduración del fagocito, proceso imprescindible para la destrucción de la bacteria intracelular (Trimble & Grinstein, 2007). Nuestros resultados, junto con otros de estudios previos, sugirieron que la regulación de la calcineurina 2 desempeña un papel fundamental en la susceptibilidad tanto a la tuberculosis bovina como a la PTB. Además, un segundo QTL identificado en el BTA23 (18,8-20,9kb) coincidía con otro QTL asociado con la tuberculosis bovina: QTL96552 (Richardson y col., 2016).

Varios de los genes candidatos identificados en otros QTLs eran reguladores transcripcionales: *Caja de horquilla P4* (*Forkhead Box P4*; *FOXP4*), *Factor de transcripción EB* (*Transcription factor EB*; *TFEB*), *LIM/homeoboxproteína* (*LIM/homeoboxprotein*; *LHX6*) y *la Subunidad 20 del complejo mediador* (*Mediator Complex Subunit 20*; *MED20*). El *TFEB* es un regulador de la biogénesis lisosomal, autofagia, exocitosis lisosomal, catabolismo lipídico, metabolismo energético y de la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* (Kim y col., 2017). La autofagia es un proceso de degradación lisosomal intracelular implicado en respuestas inmunes innatas y adaptativas que contribuye a la defensa del animal frente a diferentes patógenos intracelulares. Entre los factores de transcripción implicados en la autofagia, el *TFEB* es crítico para la activación de dicho proceso. En nuestro estudio se identificaron también, diversos genes candidatos potencialmente asociados a la infección por MAP que estaban implicados en procesos de splicing, incluyendo el *U6 spliceosomal RNA* y el *7SKRNA*.

Los genes candidatos identificados en nuestro estudio también fueron contrastados con otras bases de datos de genes asociados con la enfermedad de Crohn, la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer colorrectal. Cinco de los genes candidatos identificados: *TNFRSF21*,

ADGRF1, *FOXP4*, *Cyclina D3* (*Cyclin D3*; *CCND3*) y *Proteína transmembrana 117* (*Transmembrane protein 117*; *TMEM117*), se habían asociado previamente con la enfermedad inflamatoria intestinal (Kakuta y col., 2018). *FOXP4* y *CCND3* también han sido asociados a la enfermedad de Crohn. Un estudio de asociación reciente, ha identificado un locus de riesgo cercano al *TFE3* asociado a la susceptibilidad al cáncer colorrectal (Law y col., 2019).

Utilizando los genes candidatos identificados en nuestro estudio, no se pudo encontrar ninguna ruta metabólica enriquecida asociada a la susceptibilidad a la PTB. Sin embargo, varios de los genes candidatos identificados aparecían en la base de datos Innate DB con importantes funciones de inmunidad innata descritas: *Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1 y 2* (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 y 2*; *TREM1* y *TREM2*), *Receptor desencadenante expresado en células mieloides parecido a 1 y 2* (*Triggering receptor expressed on myeloid cells like 1 y 2*; *TREML1* y *TREML2*), *Regulador de la señalización del FGF de la cubierta 3* (*Canopy FGF signaling regulator 3*; *CNPY3*), *Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2 B'Delta* (*Protein phosphatase 2 regulatory subunit B'Delta*; *PPP2R5D*), *Proteína secretora rica en cistina 3* (*Cystine rich secretory protein 3*; *CRISP3*), *Anoctamina 6* (*Anoctamin 6* (*ANO6*)), *Proteína inhibidora de STAT2 activada* (*Protein inhibitor of activated STAT2*; *PIAS2*), *Proteína de interacción DAB2* (*DAB2 interacting protein*; *BAB2IP*) y *MAPK8*.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4. Identificación de loci asociados con lesiones histológicas de PTB infectado con MAP utilizando datos imputados a secuencia completa

Aunque algunos estudios GWAS previos han identificado loci asociados a la susceptibilidad a la infección por MAP utilizando como fenotipo la presencia de bacteria en el tejido intestinal detectada mediante PCR y cultivo bacteriológico (Kiser y col., 2017; Koets y col., 2000; Minozzi y col., 2010; Canive, y col., 2021), este estudio identifica por primera vez variantes genéticas asociadas con los tipos de lesiones característicos de la PTB. Los animales infectados por MAP presentan varios tipos de lesiones de distinta gravedad, pero hasta ahora no se habían estudiado las asociaciones entre la genética del hospedador y la patología asociada a la infección por MAP y se desconocía si estas lesiones representan etapas secuenciales o resultados divergentes. En este estudio, se exploró la base genética de las lesiones asociadas a la PTB y se estudió la posibilidad de que el examen postmortem de los tejidos intestinales y de los ganglios linfáticos regionales podría mejorar la precisión de la clasificación de los casos y de los controles, proporcionando mayores estimas de h^2 . El objetivo del estudio era analizar la posible asociación entre la genética del hospedador y las lesiones provocadas por la infección por MAP en una población de 813 vacas frisonas, de las cuales 373 no presentaban lesiones, 371 presentaban lesiones focales, 37 presentaban lesiones multifocales y 33 lesiones difusas en tejido intestinal y linfonodos asociados. Para ello, se calcularon los componentes de la varianza y la estima de la h^2 para cada tipo de lesión histopatológica asociada a la PTB. Posteriormente, se identificaron SNPs, QTLs, genes candidatos y vías funcionales significativas.

6.4.1 Componentes de la varianza y estimas de la heredabilidad

Utilizando datos de genotipado a secuencia completa, se calculó la estima de la h^2 para la presencia (440 casos) o ausencia de lesiones (373 controles) asociadas a la PTB en una población de 813 vacas frisonas pero, mediante esta aproximación no se pudo identificar ningún SNP significativamente asociado ($FDR \leq 0,05$). Sin embargo, cuando se clasificaba a los animales en función de la presencia o ausencia de cada tipo específico de lesión (focal, multifocal o difusa), no solo se pudieron identificar SNPs asociados, si no que la heredabilidad alcanzaba valores de 0,189 para la presencia de lesiones difusas, mejorando las estimas de heredabilidad obtenidas para otros métodos diagnósticos, como la combinación de los métodos ELISA-PCR-Cultivo ($h^2 = 0,139$) con los que normalmente se detecta a los animales con lesiones severas de PTB (Canive, y col., 2021). Los animales control no presentaban lesiones en tejido intestinal y presentaban resultado negativo de ELISA, PCR tisular y cultivo en el momento del sacrificio. La frecuencia de animales con lesiones focales, multifocales y difusas dentro de la población de estudio fue de 49.87, 8.13 y

8.80%, respectivamente. Las estimas de heredabilidad obtenidas para la presencia de lesiones focales ($h^2= 0,145$), multifocales ($h^2= 0,075$) y difusas ($h^2= 0,189$), indican que el desarrollo de lesiones presenta un componente genético moderado. Estudios previos indicaron que la susceptibilidad a la infección por MAP es un rasgo heredable, con estimas de h^2 de la susceptibilidad a la infección que van desde $< 0,01$ (Kiser y col., 2017; Koets y col., 2000) hasta 0,2843 (Küpper y col., 2014). Esto es comparable con la heredabilidad moderada ($h^2= 0,12$) estimada para la tuberculosis bovina, aunque las definiciones del fenotipo y los modelos utilizados difieran (Ring y col., 2019). Hay que tener en cuenta que pese a que la heredabilidad de la mastitis clínica en ganado lechero es también moderada ($h^2=0,07-0,11$) (Vallimont y col., 2009), el índice de células somáticas es un parámetro incluido en los programas de selección en varios países, entre ellos España.

6.4.2. Estudios de asociación genética a genoma completo e identificación de SNPS

Para estudiar la base genética subyacente a la presencia de lesiones de PTB en el hospedador, se llevó a cabo un análisis caso-control utilizando datos de genotipado imputado a WGS (tal y como se ha descrito en el estudio anterior) y la presencia o ausencia de lesiones focales, multifocales y difusas como fenotipo. El análisis GWAS no identificó ningún SNP significativamente asociado a las lesiones focales. Esto podría deberse a la falta de discriminación entre animales con lesiones focales y animales sin lesiones, lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevos métodos diagnósticos que permitan identificar con mayor precisión a animales con lesiones focales. En el primer estudio de esta tesis (RNA-Seq), identificamos un biomarcador de progresión de PTB, la ITLN2, cuyos niveles de expresión génica aparecían sobre-expresados en muestras de ICV de animales con lesiones focales y difusas respecto a animales control (Alonso-Hearn y col., 2019). Posteriormente, se ha demostrado mediante análisis inmunohistoquímico de secciones de ICV que la cuantificación de las células secretoras de ITLN2 podría constituir una herramienta complementaria al diagnóstico histopatológico que mejoraría la detección de lesiones focales difíciles de identificar por su pequeño tamaño y número (Blanco Vázquez y col., 2021). Para tratar de demostrar que las lesiones focales están condicionadas por variantes genéticas específicas, se llevaron a cabo 2 GWAS comparando animales con lesiones focales (casos) respecto a animales con lesiones multifocales (controles) y animales con lesiones difusas (controles), respectivamente. Se identificaron 28 y 590 SNPs significativamente asociados ($P_{FDR} \leq 0,05$) a las lesiones multifocales y difusas, pero ninguno asociado al grupo de animales con lesiones focales. Estos resultados indican que, es posible que no exista una base genética que permita discriminar a

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los animales con lesiones focales del resto lo que explicaría por qué esta forma lesional es la más predominante.

En total, se identificaron 129 y 92 SNPs significativamente asociados ($P < 5 \times 10^{-7}$) a las lesiones multifocales y difusas, respectivamente. El hecho de que no se encontraran SNPs coincidentes entre los dos tipos de lesiones indica que cada forma lesional está condicionada por diferentes variantes génicas constituyendo las lesiones multifocales y las difusas resultados de respuestas diferentes a la infección por MAP. Mientras que los SNPs asociados con las lesiones multifocales se localizaron en BTA3, BTA5, BTA11, BTA22, BTA23 y BTA24, los asociados con las lesiones difusas se identificaron en BTA1, BTA3, BTA7, BTA8, BTA13 y BTA23. La mayoría de estos SNPs, al igual que en el estudio anterior, se localizaban en regiones intrónicas, 50 y 51% para lesiones multifocales y difusas respectivamente. En el caso de las lesiones multifocales, el 18 y el 12% de los SNPs identificados se localizaban en regiones 5' y 3' de diversos genes, mientras que en el caso de las lesiones difusas, solo el 2 y el 5% de los SNPs se localizaban en dichas regiones. Todos estos SNPs presentaban valores de $OR > 1$ indicando que los animales con el alelo menor, presentaban un mayor riesgo de desarrollar lesiones multifocales o difusas.

6.4.3. Identificación de QTLs y genes candidatos

Los 129 SNPs significativamente asociados con la presencia de lesiones multifocales ($P \leq 5 \times 10^{-7}$) definieron 13 QTLs localizados en 6 cromosomas: BTA3, BTA5, BTA11, BTA22, BTA23 y BTA24. El BTA5 albergaba 4 de los 13 QTLs. El QTL más grande se encontraba en el BTA12 (2,63-4,93Mb). Nuestros resultados mostraron que el SNP más significativo asociado a las lesiones multifocales (rs438855113) se localizaba en el BTA11 (5,22-6,61 Mb) en una región que se solapaba con algunas regiones previamente descritas como asociadas a la susceptibilidad a la PTB (QTL169911, QTL169912, QTL169913) (McGovern y col., 2019), a la mastitis (QTL5450) (Schulman y col., 2004) y a la resistencia a garrapatas (QTL101152) (Mapholi y col., 2016) de acuerdo con la base de datos cattle QTL database. Otro de los QTLs asociados a las lesiones multifocales y localizado en el BTA5 (27.26-28.35Mb) se superponía con un QTL asociado a la susceptibilidad a la PTB (QTL14844) (Kirkpatrick y col., 2011). Por otro lado, el QTL identificado en el BTA23 (17,32-18,32Mb) se solapaba con varios QTLs asociados a los niveles de IgG (QTL66214, QTL66215, QTL66217, QTL66218, QTL66219, QTL66220, QTL66221, QTL66222 y QTL20493) (Leach y col., 2010). Los genes candidatos de esta región, como *el inhibidor NFkB Epsilon* (*NFkB Inhibitor Epsilon; NFkBIE*), controlan la respuesta a varios patógenos bacterianos y víricos, así como a las vacunas, posiblemente influyendo en la producción de anticuerpos. Los genes candidatos asociados a las lesiones multifocales identificados en este estudio son nuevos en el

sentido de que no habían sido asociados a la PTB con anterioridad, a excepción del gen que codifica la *proteína neuronal de dominio PAS 2* (*Neuronal PAS domain protein 2*; NPAS2), un miembro de la familia de factores de transcripción de hélice-bucle-hélice-PAS. NPAS2 es un componente central del reloj circadiano y un importante regulador de funciones fisiológicas, incluyendo el metabolismo, el sueño, la temperatura corporal, la presión arterial, la función endocrina, inmune, cardiovascular y renal.

Respecto a las lesiones difusas, se identificaron un total de 92 SNPs que definían 9 QTLs localizados en los cromosomas BTA1, BTA3, BTA7, BTA8, BTA13 y BTA23. Uno de los QTLs localizados en el BTA7 (23,79-25,08Mb) se solapaba con un QTL previamente asociado a la susceptibilidad a la PTB (QTL166688) (Gao y col., 2018). Por otro lado, el QTL localizado en el BTA3 (63,43-64,43Mb) también se superponía con los QTL167791 y QTL2489 que se habían asociado previamente a la tuberculosis bovina y a la mastitis clínica, respectivamente (Klungland y col., 2001; Ring y col., 2019). Además, el QTL identificado en el BTA23 (13.56-14.56Mb) se superponía con QTLs asociados a la tuberculosis bovina (QTL96552) (Richardson y col., 2016), a la mastitis clínica (QTL164913) y con los niveles de IgG (QTL66214, QTL66215, QTL66216, QTL66217, QTL66218, QTL66219, QTL66220, QTL66221 y QTL66222) (Fang y col., 2018; Leach y col., 2010). De los genes candidatos detectados en el GWAS de los animales con lesiones difusas, únicamente las *Moléculas de adhesión intracelular específicas de las células dendríticas* (*Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules*; ICAM3) y el CD209 habían sido asociados previamente a la susceptibilidad a la PTB (Juste y col., 2018; Kumar y col., 2020).

6.4.4 Análisis de GO y rutas metabólicas

El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes candidatos asociados a cada tipo de lesión permitió identificar 7 GOs, todos ellos CC, y 1 ruta metabólica significativamente enriquecidas en los animales con lesiones multifocales y difusas respectivamente. Se observó un enriquecimiento significativo de genes candidatos en los animales con lesiones multifocales y difusas relacionados con los filamentos intermedios del citoesqueleto y el metabolismo del colesterol, respectivamente. Nuestros resultados identificaron asociaciones entre la presencia de lesiones multifocales y genes de la familia de los filamentos de queratinas (*Keratin*; *KRT*) (*KRT5*, *KRT7*, *KRT72*, *KRT73*, *KRT74*, *KRT75*, *KRT80*, *KRT81* y *KRT83*) que eran comunes a los 7 CCs identificados. En este contexto cabe subrayar que algunas mutaciones presentes en genes codificantes de *KRTs* se han asociado con la IBD en humanos (Majumdar y col., 2012). La familia de las *KRTs* forman parte de las proteínas del citoesqueleto y son responsables del mantenimiento de la estabilidad y la integridad del epitelio gastrointestinal, proporcionando

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resiliencia frente a diversos estímulos y regulando varias funciones celulares como la proliferación, la migración y la diferenciación celular, así como la respuesta inmune y la inflamatoria (Zhang y col., 2019). En un modelo experimental de granuloma utilizando el pez teleosteo *Piaractus mesopotamicus* infectado con BCG, se observó una mayor tinción por inmunohistoquímica con anticuerpos antiqueratina a los 33 días post-infección cuando las células epitelioides eran más evidentes y los granulomas estaban completamente formados (Manrique y col., 2015). En la forma tuberculoide de la lepra predominan los granulomas epitelioides no calcificados y encapsulados por abundantes linfocitos, mientras que los AFB están ausentes o presentes de manera excepcional (Massone y col., 2015). Se ha demostrado que la presencia de granulomas epitelioides con distribución multifocal en los casos de lepra tuberculoide conduce al control de la replicación de *Mycobacterium leprae* y a la contención de su diseminación (Leal-Calvo y col., 2021). Por lo tanto, nuestros resultados junto con la información disponible en la literatura nos han llevado a plantear la hipótesis de que aquellos animales con lesiones multifocales y variantes genéticas asociadas a genes implicados en queratinización podrían contener la replicación de MAP y su diseminación. Para poder confirmar esta hipótesis es necesario realizar estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos bovinos anti-citoqueratina. Estos estudios dirigidos a cuantificar el número de células que expresan KRT y su localización en distintos tipos de lesiones asociadas a la PTB permitirían determinar el papel de las KRT en la resiliencia del tejido intestinal de animales con lesiones multifocales.

En las lesiones difusas, la ruta del metabolismo del colesterol (bta04979) aparecía enriquecido (valor de P ajustado= 0,016) con 4 proteínas candidatas incluidas en esta ruta, incluyendo las *Angiopoyetinas 4 y 8* (*Angiopoyetin like 4 y 8*; *ANGPTL4* y *ANGPTL8*), el *Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad* (*Low Density Lipoprotein Receptor*; *LDRL*), y la *Colesterol Ester Hidrolasa Neutral 1* (*Neutral Cholesterol Ester Hydrolase 1*; *NCEH1*). Las *ANGPTL4* y *ANGPTL8* participan en la regulación de la eliminación de triglicéridos y en el metabolismo lipídico. El *LDRL* se une a las lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein*; *LDL*), las principales lipoproteínas transportadoras de colesterol del plasma, que transportan por endocitosis el colesterol al interior de las células, incluidos los macrófagos. El *NCEH1* es responsable de la hidrólisis de ésteres de colesterol en los macrófagos.

6.4.5. Determinación de los niveles de colesterol en muestras de plasma de animales con distintos tipos de lesiones asociadas a la PTB

Para validar si la presencia de las variantes asociadas al metabolismo de colesterol en los animales con lesiones difusas se traducían en una desregulación del metabolismo del colesterol, se midieron los niveles de colesterol total en muestras de plasma de animales con lesiones focales, multifocales y difusas y de animales sin lesiones. Los resultados demostraron que los animales con lesiones difusas presentaban valores inferiores de colesterol en plasma (0,080 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) cuando se comparaban con los valores de animales con lesiones focales (0,126 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; $P \leq 0,001$), multifocales (0,141 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $P \leq 0,001$) o sin presencia de lesiones (0,129 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $P \leq 0,001$) ($P < 0,001$). Esto puede ser debido a la alteración en la eficiencia de la absorción del colesterol que se produce por el engrosamiento y disrupción de la pared intestinal en animales en fases avanzadas de la infección. De acuerdo a estos resultados, estudios previos detectaron bajos niveles de colesterol en suero de pacientes con enfermedad de Crohn e IBD (Agouridis y col., 2011; Dyer & Dawson, 1971). En nuestro estudio de RNA-Seq (Alonso-Hearn y col., 2019), ya se había observado previamente que la ruta del colesterol bta04977 se encontraba desregulada en muestras de ICV de animales con lesiones difusas respecto a animales control con cuatro genes sobre-expresados en dicha ruta: *APOA1*, *APOC3*, *APOA4* y *APOB* en relación a los animales control. Además, el gen más sobre-expresado en PB de vacas con lesiones focales respecto a los controles fue el *ABCA13*, un gen responsable de la internalización del colesterol y de su acumulación en vesículas intracelulares (Alonso-Hearn y col., 2019; Blanco Vázquez y col., 2020,2022; Nakato y col., 2021). Estudios recientes sugieren que los macrófagos infectados con MAP acumulan colesterol lo que favorece la supervivencia de la bacteria (Johansen y col., 2019; Ariel y col., 2020). Considerando todos los trabajos publicados hasta el momento se puede establecer que los macrófagos de animales con lesiones difusas incrementan el transporte, internalización e hidrólisis del colesterol. Uno de los principales signos clínicos de la PTB es una menor producción láctea que va asociada a una menor cantidad de grasa en la leche en animales con lesiones difusas (Smith y col., 2016). Bajos niveles de colesterol en plasma, pueden por tanto indicar una menor producción de leche y una progresión hacia formas clínicas de la enfermedad pudiendo ser el colesterol un biomarcador pronóstico de la enfermedad.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.5. Identificación de genes candidatos implicados en el empaquetamiento del DNA, la reparación del daño del DNA, la inmunidad innata y la persistencia del patógeno mediante un estudio GWAS de tolerancia a la PTB

MAP ha coevolucionado con animales y seres humanos a lo largo del tiempo comprometiendo la supervivencia de un pequeño número de hospedadores. Aunque este hecho se ha atribuido a la resistencia del hospedador, nuestra comprensión de los procesos que tienen lugar en los animales infectados que permanecen asintomáticos o libres de la infección, es bastante limitada. Aunque no se conocen bien, los mecanismos subyacentes a la tolerancia a la enfermedad parecen implicar respuestas conservadas al estrés y al daño (Soares y col., 2017). Cuando estas respuestas fallan, la respuesta por defecto se convierte en la muerte celular programada de las células infectadas, su fagocitosis inmediata por parte de los macrófagos y su posterior polarización. Esta polarización de los macrófagos también está asociada a la producción de citoquinas como el TGF β 1 que puede promover la regeneración de los tejidos. Dado que la tolerancia a la enfermedad no afecta a la carga del patógeno como se espera que lo haga la resistencia, no provoca que el patógeno desarrolle estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedador. Además, la prevalencia del patógeno induce una selección continua a favor de las variantes genéticas beneficiosas para la tolerancia a la enfermedad. Aunque la mejora de la resistencia del hospedador podría conducir a la erradicación de la enfermedad, esto es poco probable si los hospedadores son tolerantes, ya que pueden albergar el patógeno sin mostrar síntomas y lesiones clínicas (Doeschl-Wilson y Kyriazakis, 2012). Sin embargo, en el caso de las enfermedades endémicas que dan lugar a un elevado número de animales asintomáticos, mejorar la tolerancia podría ser un enfoque más útil que promover la resistencia. Las micobacterias han desarrollado varias estrategias para evadir los mecanismos de resistencia del hospedador y persistir durante largos periodos. En este contexto, la inducción y modulación de las vías de tolerancia es fundamental para controlar la inflamación y minimizar la patología. Los signos clínicos asociados a las infecciones por micobacterias surgen cuando la homeostasis del hospedador se ve comprometida debido al daño tisular. Además, mientras que los mecanismos de resistencia suelen ser específicos del patógeno (por ejemplo, la movilización de células inmunitarias específicas), los mecanismos de tolerancia que previenen o reparan el daño pueden ofrecer protección para una amplia gama de patógenos. En última instancia, los mecanismos de tolerancia determinan la salud general del hospedador y su longevidad.

Las micobacterias han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune innata del hospedador y sobrevivir en él durante largos periodos, por lo que en los mecanismos de inmunidad innata no son suficientes para eliminar el patógeno ni para minimizar el daño patológico

ocasionado. En este contexto, los genes y mecanismos asociados a tolerancia son fundamentales para prevenir la inflamación descontrolada y el daño tisular y determinantes en la salud y longevidad del animal infectado. En el caso de enfermedades de producción, crónicas y endémicas que dan lugar a un alto número de animales asintomáticos, como es el caso de la PTB, la inducción de tolerancia podría ser una estrategia más ventajosa para controlar la enfermedad que la inducción de resistencia porque evita el sacrificio y reemplazo de los animales tolerantes. Aunque la susceptibilidad genética a las enfermedades se ha estudiado ampliamente, las variantes genéticas y los principales mecanismos moleculares y celulares que controlan la tolerancia a las enfermedades siguen siendo en gran medida desconocidos. Comprender la base genética que controla la inflamación y el daño tisular podría ser útil el desarrollo de agentes moduladores e inductores de tolerancia y, en el caso de la ganadería, permitiría también la selección genética de animales con una mayor tolerancia a la PTB.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe una base genética asociada a la tolerancia a la PTB y definir las regiones genéticas y los mecanismos celulares y moleculares responsables de esta. Aunque existía un estudio previo que analizó la tolerancia a la PTB (Zanella y col., 2011), este estudio fue el primer análisis de asociación llevado a cabo con WGS. Se calcularon los componentes de la varianza y la estima de la h^2 y posteriormente, se identificaron SNPs, QTLs, genes candidatos y vías funcionales asociadas a la tolerancia a la PTB. Se calcularon los EBVs para la población incluida en el estudio y se validaron de forma cruzada en una población independiente. Dado que existen pruebas de que algunas variantes alélicas pueden contribuir a la tolerancia a múltiples enfermedades, los QTLs y los genes candidatos identificados se compararon con los QTLs y los genes candidatos descritos para otras enfermedades bovinas y con los genes candidatos humanos para la enfermedad de Crohn, la IBD, el cáncer colorrectal, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus tipo I y la artritis reumatoide.

6.5.1. Definición del fenotipo de tolerancia y cálculo de estimas de heredabilidad

Los animales incluidos en este estudio fueron caracterizados mediante ELISA, PCR y cultivo bacteriológico de tejidos y mediante análisis histopatológico de muestras de tejido intestinal (Vázquez y col., 2014a). La asociación con la tolerancia a la PTB se analizó utilizando los genotipos imputados a secuencia completa de animales infectados con resultado positivo a PCR y cultivo de tejidos pero sin presencia de lesiones en tejido intestinal y ganglios linfáticos asociados (N= 24). Estos 24 animales presentaron una carga bacteriana baja (<10 CFUs/g) y resultado negativo a ELISA y fueron considerados como casos. Partiendo de esta definición de caso, se llevaron a cabo 3 análisis caso-control considerando como población control 1) vacas con resultado

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

negativo a PCR y Cultivo y con presencia de lesiones focales (N= 253), 2) vacas con lesiones focales independientemente del resultado que presentasen para PCR y Cultivo (N= 288) y 3) vacas con resultados negativo a ELISA, PCR y cultivo y sin presencia de lesiones en tejido intestinal (N= 373). Las estimas de heredabilidad oscilaron entre 0,18 y 0,55 dependiendo de la población control analizada. El valor de heredabilidad más alto ($h^2= 0,55$) se obtuvo cuando la población control utilizada presentaba resultado negativo a PCR y cultivo y presencia de lesiones focales asociadas a la PTB (N= 253). Estos resultados subrayan la importancia de una correcta definición de los fenotipos estudiados para mejorar la sensibilidad del análisis, resaltando la importancia de la selección de los controles entre aquellos animales con rasgos más opuestos a los casos.

6.5.2. Identificación de SNPs asociados a la tolerancia a la PTB

Tres SNPs localizados en el BTA25 (11.89-12.93 Mb) resultaron significativos ($FDR \leq 0,05$; $P < 5 \times 10^{-7}$) en los tres estudios caso-control, lo que sugiere una importante asociación entre esa región del BTA25 con la tolerancia a la PTB. Para el análisis posterior de SNPs, QTLs, genes candidatos y vías funcionales se seleccionó el caso-control 1 por presentar valores superiores de h^2 . Cuando se analizó el fenotipo con la mayor heredabilidad ($h^2= 0,55$) (caso-control 1) se identificaron un total de 40 SNPs asociados a la tolerancia ($P < 5 \times 10^{-7}$). La mayoría de estos SNPs (59%) se localizaba en regiones intrónicas del genoma. Además los efectos de estos 40 SNPs (valor b) presentaban valores positivos y los OR eran mayores de 1, lo que indica que los animales portadores del alelo menor para dichos SNPs presentaban una mayor probabilidad de ser tolerantes a la PTB que el resto de animales. Más concretamente, los 2 SNPs con valores de OR más altos se localizaban en el BTA4 (OR: 25,89) y el BTA9 (OR: 20,71), 12 SNPs con un OR de 15,86 se localizaban en el BTA25 y 3 de estos 12 SNPs resultaban significativos en las 3 comparaciones caso-control realizadas.

6.5.3. Identificación de QTLs y genes candidatos

Los 40 SNPs asociados a la tolerancia ($P < 5 \times 10^{-7}$) definían 9 QTLs localizados en los cromosomas BTA4, BTA9, BTA16, BTA25 y BTA26. Veinticinco de estos cuarenta SNPs (62,5%) se localizaban en el BTA25 (8,90-12,93Mb), lo que remarca la importante asociación de esta región con el fenotipo estudiado. Zanella y col., identificaron una región asociada a la tolerancia a la PTB en el BTA15 de 6,5kb (Zanella y col., 2011) que no ha sido identificada en el presente estudio. Esto podría ser debido a que la definición del fenotipo de tolerancia es diferente en los dos estudios. En el estudio de Zanella y col., la tolerancia se establecía mediante la relación entre la intensidad de la infección (nivel de MAP en tejidos) y la aptitud física (nivel de excreción fecal de MAP), pero para definir la tolerancia es fundamental determinar las lesiones histopatológicas, no sólo la carga

bacteriana. En nuestro estudio, las vacas tolerantes a la PTB presentaron carga de MAP en tejido intestinal pero no lesiones.

Los cromosomas BTA25 y BTA26 albergaban 4 de los 9 QTLs definidos y el QTL que alojaba el SNP más significativo ($P = 1,58 \times 10^{-7}$) se localizaba en el BTA16 (21,30-22,30Mb). Este QTL, junto con otro QTL localizado en el BTA26 (33,90-34,90Mb), se superponían con dos QTLs asociados con la susceptibilidad a la PTB (QTL14860 y QTL14880) (Kirkpatrick y col., 2011) de acuerdo a la base de datos cattle QTL database. El QTL más grande localizado en el BTA25 (8,90-9,99Mb) contenía 13 SNPs asociados ($P < 5 \times 10^{-7}$) y 16 genes candidatos. Este QTL solapaba con QTLs asociados a la mastitis clínica (QTL1751) (Holmberg & Andersson-Eklund, 2004) y al índice de células somáticas (QTL4993, QTL52494) (Cole y col., 2011; Lund y col., 2008). Un segundo QTLs identificado en el cromosoma BTA25 (11,89-12,93Mb) se superponía con QTLs asociados a la susceptibilidad a la tuberculosis bovina (QTL96564) (Richardson y col., 2016), a la mastitis clínica (QTL1751) (Holmberg & Andersson-Eklund, 2004) y al índice de células somáticas (QTL177968, QTL32484, QTL32485, QTL4993, QTL52521) (Cole y col., 2011; Strillacci y col., 2014; Oliveira y col., 2019). Los dos QTLs identificados en el BTA16 y uno de los detectados en el BTA26 (20,05-21,05Mb) se solapaban con QTLs asociados con la vida productiva (Cole y col., 2011) remarcando la asociación de este rasgo con la PTB y la salud de los animales. Finalmente, uno de los QTLs identificados en el BTA26 (33,90-34,90Mb) también solapaba con un QTL asociado a la infección persistente causada por el virus de la diarrea bovina (QTL66096) (Neiberger y col., 2011).

Los genes candidatos identificados en este estudio son nuevos en el sentido de que no habían sido asociados con anterioridad a la PTB, ni a la tuberculosis ni a la mastitis. En total se definieron 98 genes candidatos, de los cuales solo uno, el Reparador por escisión 4 (*Excision Repair 4*; ERCC4) se localizaba en el QTL del cromosoma BTA25 (11,89-12,93Mb) y era común para los tres estudios caso-control. La ERCC4 es una endonucleasa reparadora del DNA (XPF). Junto con ERCC1, XPF forma el complejo enzimático ERCC1- XPF que participa en la reparación del DNA por escisión de nucleótidos, un mecanismo muy conservado que reconoce y elimina las distorsiones helicoidales del genoma. Los 98 genes candidatos detectados, se compararon con genes candidatos descritos en bases de datos para la CD, IBD, cáncer colorrectal, esclerosis múltiple, diabetes tipo I y artritis reumatoide. Siete de los genes, Transaminasa glutámico-oxalacética 1 (*Glutamic-Oxaloacetic Transaminase*; GOT1), Factor de transcripción NK2 Homeobox 3 (*NK2 Homeobox 3 transcription factor*; NKX2-3), Miembro de la familia 25 de transportadores de solutos 8 (*Solute Carrier Family 25 Member 8*; SLC25A8), Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

oncogénico (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Oncogene Partner; CPE43), Receptor de quimioquinas similar a 3 (Chemokine Receptor-Like 3; CCR6), lectina tipo C que contiene el dominio 16A (C-Type Lectin Domain Containing 16; CLEC16A), y el gen de inestabilidad del genoma mediada por RecQ 2 (RecQ Mediated Genome Instability 2; RMI2), habían sido previamente asociados con la artritis reumatoide. Los dos últimos genes, *CLEC16A* y *RMI2*, también se habían asociado con CD, IBD, esclerosis múltiple y diabetes tipo I. *CLEC16A* es un regulador de la mitofagia/autofagia y de la integridad mitocondrial y *RMI2* desempeña un papel crítico en la reparación del DNA dependiente de la recombinación homóloga (Xu y col., 2008). *NKX2-3* y *SLC25A28* se asociaron con la CD, IBD, cáncer colorrectal, diabetes tipo I y artritis reumatoide. Además, cinco de los 98 genes candidatos también aparecían descritos en la base de datos Innate DB como genes con importantes funciones en la inmunidad innata: *CCR6*, *Factor nuclear NF-Kappa-B inhibidor de la quinasa alfa (Nuclear Factor NF-Kappa-B Inhibitor Kinase Alpha; CHUK or IkbKA)*, *Inhibidor STAT 1 o supresor de la señalización de citoquinas 1 (STAT-Induced STAT Inhibitor 1 or suppressor of cytokine Signaling 1; SOCS1)*, *Factor 5 asociado al receptor del TNF (TNF Receptor Associated Factor 5; TRAF5)* y *Caspasa 7 (Caspase 7; CASP7)*, una caspasa implicada en la activación de las caspasas responsables de la apoptosis.

6.5.4. Análisis funcional para la identificación de GO y rutas metabólicas

El análisis de enriquecimiento funcional llevado a cabo con los genes candidatos permitió identificar 7 GOs y 2 rutas metabólicas enriquecidas en animales tolerantes a la PTB. Los cuatro genes comunes a estos 7 GO eran *Proteína de transición nuclear 2 (Nuclear transition protein 2; TNP2)/ Protamina 1 (Protamine 1; PRM1)/ Protamina 2 (Protamine 2; PRM2)/ Protamina 3 (Protamine 3; PRM3)*. TNP2 desempeña un papel clave en la sustitución de las histonas por PRM durante la espermatogénesis. Las PMR compactan el ADN en un complejo altamente condensado, estable e inactivo. De esto 7 GO, dos correspondían a procesos biológicos relacionados con el empaquetamiento y cambios conformacionales del DNA. De los 7 GOs identificados, 5 CCs se asociaban con el empaquetamiento del DNA como el nucleosoma, la cromatina o el cromosoma, el complejo de empaquetamiento del DNA y el complejo proteína-DNA. En la misma región donde se localizan los genes *TNP2*, *PRM1*, *PRM2* y *PRM3* en el BTA25, se localiza el gen candidato *RMI2* que está implicado en reparación del DNA y en la estabilidad del genoma (Xu y col., 2008). Además, se identificaron 12 variantes génicas en el cromosoma 25 (11,89-12,93 Mb) en la región 5' del gen *ERCC4* que forma el complejo enzimático ERCC1-XPF y participa en la reparación del DNA mediante escisión de nucleótidos. En conjunto, estos datos evidencian la asociación entre la

tolerancia a la PTB y las variantes genéticas en genes implicados en el empaquetamiento y reparación del DNA.

En la mayoría de las células eucariotas, los nucleosomas constituyen la unidad estructural de la cromatina formados por una estructura de octámeros de histonas (Xing y col., 2011). Durante la espermatogénesis tiene lugar un proceso de remodelación de la cromatina que reemplaza el 90% de las histonas por proteínas de transición y PRMs (Balhorn, 2007; Rousseaux y col., 2008). El número de histonas reemplazadas por PRMs y la proporción entre PRM1/PRM2 es esencial para mantener la estructura de la cromatina en cada especie animal, de manera que si esta proporción cambia, el DNA podría estar insuficientemente empaquetado, siendo más susceptible a daños (Simon y col., 2011). La estructura especializada de la cromatina espermática-PRM tiene una doble función: por un lado proteger el DNA de cualquier daño en su transporte al oocito y, por otro lado, permitir un correcto desempaquetamiento del genoma paterno en el ooplasma (Björndahl & Kvist, 2014). En el ooplasma los factores maternos acceden rápidamente a la cromatina paterna y comienza el reemplazo de PRM por histonas maternas (Miller y col., 2010). Cualquier daño que se produzca en el DNA espermático en el traslado desde el testículo al oocito, no podrá ser reparado hasta que el DNA no se encuentre accesible para los sistemas de reparación de DNA en el ooplasma (Björndahl & Kvist, 2014). Por otro lado, los oocitos son especialmente sensibles a daños del DNA en la meiosis durante el ciclo menstrual. Los daños en el DNA, si no son reparados, pueden poner en riesgo la viabilidad de la célula u organismo. Dado que el daño del DNA es uno de los factores más importantes que pueden comprometer la homeostasis del organismo y contribuir a la aparición de enfermedades, los individuos con mayor capacidad para reparar y empaquetar el DNA correctamente presentan una mejor homeostasis celular y una mayor esperanza de vida (Sheldon y col., 2019).

El análisis de enriquecimiento funcional con los 98 genes candidatos permitió identificar enriquecimiento de la ruta de señalización del *TNF* (bta04668) con 4 genes implicados: *TRAF5*, *Proteína 5 de unión a elementos sensibles a CAMP* (*CAMP Responsive Element Binding Protein 5; CREB5*), *CASP7* y *CHUK*. La segunda ruta enriquecida fue la de toxoplasmosis (bta46689) con cuatro genes candidatos: *TGFβ2*, *CHUK*, *Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II* (*Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator; CIITA*) y *SOCS1*. *CHUK* es una molécula clave en la vía de señalización del *NF-κB*, se encontraba enriquecido en ambas rutas metabólicas ($P \leq 0,01$)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Schneider y col., observaron que moscas con mutaciones en la molécula “Eiger” relacionada con el TNF vivían más que otras moscas infectadas con las mismas dosis de agentes bacterianos (Schneider y col., 2007). De manera similar, en nuestro estudio se observó enriquecimiento de genes candidatos incluidos en la ruta de señalización del TNF (*TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK*) en los animales tolerantes a la PTB. Los genes *TRAF5*, *CASP7*, y *CHUK*, son conocidos por sus funciones en la inducción de respuestas inmune innata. *CHUK* es una kinasa que forma parte del complejo canónico IKK de activación de la ruta *NF-κβ*, fosforilando a los inhibidores del *NF-κβ*. Una vez libre, el *NF-κβ* es traslocado al núcleo dónde activa la transcripción de diversos genes implicados en la respuesta inmune, el control del crecimiento o la protección frente a la apoptosis. La *CASP7* es uno de los genes responsable de la apoptosis, que constituye un importante mecanismo mediante el cual el hospedador puede restringir la multiplicación del patógeno en las células infectadas favoreciendo así la tolerancia a enfermedades. Por otro lado *TRAF5*, es un miembro de la familia de factores asociados a receptores del TNF que participa en la activación del TNF y resulta, en activación del *NF-κβ* y JNK.

Aunque el TNF supone una defensa crítica frente a la infección por micobacterias, su excesiva estimulación, está implicada en inmunopatogénesis y en la activación de necrosis a través de la inducción mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno (ROS; reactive oxygen species) que destruye tanto a las bacterias como a los macrófagos infectados (Roca & Ramakrishnan, 2013). Por lo tanto, la respuesta inmune innata, pese a ser importante para la eliminación del patógeno, también puede llegar a provocar daño tisular si no es controlada. En nuestro estudio, además de la ruta del TNF, identificamos un enriquecimiento de genes candidatos implicados en la ruta de la toxoplasmosis (*TGFβ2/CHUK/CIITA/SOCS1*) en los animales tolerantes. *CHUK* es uno de los genes enriquecidos en la ruta de la toxoplasmosis que desempeña un importante papel como modulador de la respuesta inflamatoria. Además de participar en la ruta de activación canónica de *NF-κβ*, *CHUK* puede inhibir la ruta de señalización del *NF-κβ* previniendo la muerte celular mediada por TNF. Mientras que la activación canónica del *NF-κβ* está asociada con una producción rápida de mediadores proinflamatorios, el papel no canónico de *CHUK* resulta en un control de la ruta de activación del *NF-κβ* lo que se asocia con procesos inflamatorios crónicos y el mantenimiento de la homeostasis. El doble papel de *CHUK* al activar o limitar la activación de *NF-κβ*, podría ser dependiente de las condiciones medioambientales presentes en cada momento. En general, la activación de la ruta de la toxoplasmosis en animales tolerantes podría resultar en el establecimiento de una infección persistente por MAP tal y como se ha descrito en infecciones con *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii*, así como otros parásitos intracelulares, se convierten en

huéspedes a largo plazo de sus hospedadores y esta convivencia suele estar asociada con altos niveles de expresión de TGF β (Johnson y col., 2016). La activación directa del *Transductor de señales y activador de la transcripción 3* (*Signal transducer and activator of transcription 3*; *STAT3*) por parte del parásito estimula la función antiinflamatoria del TGF β causando infecciones que pueden durar toda la vida del hospedador al establecerse un entorno antiapoptótico. Además, el papel del TGF β 2 en la reparación tisular puede generar tolerancia en fases avanzadas de diversas infecciones (Divangahi y col., 2018). En nuestro estudio encontramos otros dos genes candidatos asociados a la tolerancia a la PTB: el *CIITA* y el *SOCS1*. Ambos genes están localizados en el BTA25 en la zona 5' de la región *RMI2/TNP2/PRIM1/PRM2/PRM3* y adyacentes al gen *CLEC16A*, un regulador de la fusión autofagosoma-lisosoma durante la mitofagia tardía. *CIITA* es un regulador positivo de la transcripción del MHC II y una pieza clave en el control de la expresión de esos genes. En humanos, determinadas variantes alélicas en el promotor tipo I de *CIITA* dan lugar a una mayor expresión del MHC II en macrófagos y células dendríticas tanto en hígado como en sangre periférica (Yau y col., 2017). El aumento en la expresión del MHC II se traduce en un aumento de la presentación de antígenos a los linfocitos T *in vitro* y en una mayor activación de estos. De acuerdo con estos datos, nuestros resultados apoyan el concepto de que mayores niveles de expresión del MHC II y la activación de la respuesta antiinflamatoria, juegan un papel importante en la tolerancia a la PTB. *SOCS1* es un miembro de la familia de inhibidores de STAT con importantes funciones en la homeostasis de células inmunes y en la regulación de la inflamación, lo que resulta vital para impedir una respuesta inflamatoria excesiva y minimizar el daño tisular derivado.

6.5.5. Valores de selección estimados y validación cruzada de las predicciones genómicas

El modelo GBLUP (VanRaden & Sullivan, 2010) se utilizó para calcular los EBVs de cada animal en la población de estudio atribuidos al efecto de los SNPs significativamente asociados a la tolerancia (FDR $\leq 0,05$). La precisión de las predicciones genómicas obtenidas se evaluaron mediante una estrategia de validación cruzada en una población independiente con animales con resultado positivo en el cultivo de tejidos y sin lesiones en los tejidos intestinales (casos, N= 10) y animales con lesiones asociadas a la PTB en los tejidos intestinales (controles, N= 190). El AUC de los modelos generados utilizando por un lado los 142 SNPs con valor de $P < 5 \times 10^{-5}$ (AUC media = $0,657 \pm 0,017$) y, por otro, los 40 SNPs con valor de $P < 5 \times 10^{-7}$ (AUC media = $0,676 \pm 0,014$) resultaron muy parecidos, sugiriendo que el modelo generado con los 40 SNPs podría ser una buena herramienta para la identificación de animales con genotipo de tolerancia. El punto de corte para los EBVs en la población de estudio fue de 0,0356.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.5.6. Impacto y aplicabilidad de los marcadores genéticos identificados

Nuestros resultados confirman que la susceptibilidad a la infección por MAP es un rasgo poligénico controlado por un alto número de variantes. Los resultados de estos estudios proporcionan más información sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la susceptibilidad a la infección por MAP y a la tolerancia a la PTB en bovinos, y podrían utilizarse para desarrollar evaluaciones genéticas para la PTB en España. Los SNPs identificados en los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral permitirán seleccionar animales menos susceptibles a la infección por MAP y más tolerantes a la PTB y probablemente, también a otras enfermedades bovinas, reduciendo la transmisión de enfermedades, las pérdidas económicas y el uso de antimicrobianos. En consecuencia, una reducción de la presencia de MAP en el medio ambiente también sería beneficiosa para los seres humanos, especialmente si se confirma la relación entre MAP y diversas enfermedades inflamatorias intestinales humanas.

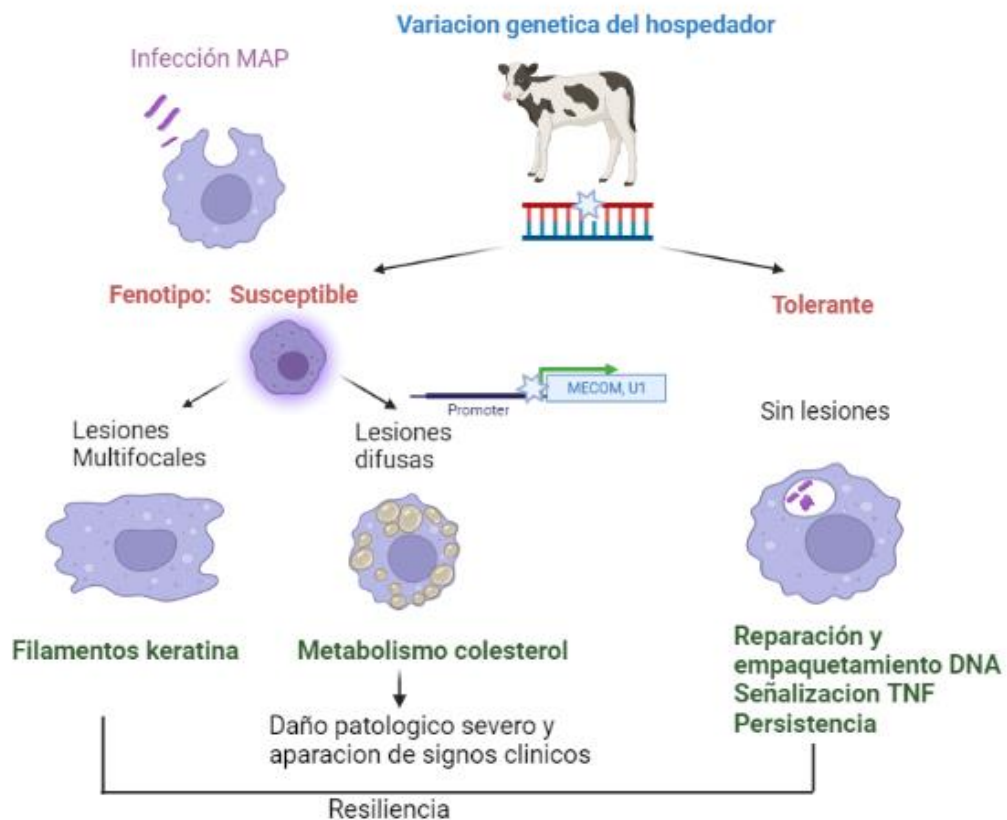


Figura 23. Interacción entre la genética del hospedador y la infección con MAP en el fenotipo del hospedador

	Estudio I	Estudio II	Estudio III	Estudio IV	Estudio V
Objetivo	Genes diferencialmente expresando en PB e ICV, GOs y rutas enriquecidas	cis-eQTLs en PB e ICV, Genes regulados	SNPs, QTLs y genes candidatos	SNPs, QTLs, genes candidatos, GOs y rutas enriquecidas	SNPs, QTLs, genes candidatos y rutas enriquecidas
Datos	RNA-seq (N=14) Controles (N=3) Lesión focal (N=6) Lesión difusa (N=5)	RNA-seq (N=14) Controles (N=4) Lesión focal (N=6) Lesión difusa (N=4) GWAS (N=986)	GWAS (N=713) Casos (N=55) Controles (N=658)	GWAS (N= 442) Controles (N= 373) Multifocal (N=33) Difusa (N=36)	GWAS (N=277) Casos (N= 24) Controles (N=253)
Genotipos	-	Euro GI0K MD (54.609 SNPs)	WGS (13.881.067 SNPs)	WGS (13.881.067 SNPs)	WGS (13.881.067 SNPs)
Fenotipo	Focal vs Control Difusa vs control	-	ELISA/PCR/cultivo	Lesión multifocal Lesión difusa	PCR+/Cultivo+/ Sin lesión
h ²	-	-	0,139	Multifocal 0,078 Difusa 0,189	0,550
SNPs	-	rs 43744169 (MECOM) rs 110345285 (eEF1A2) rs 109859270 (U1)	159	Multifocal= 192 Difusa= 92	40
Genes diferencialmente expresados	Genes DE Focal vs Control (PB)= 109 Genes DE Difusa vs Control (PB)= 207 Genes DE Focal vs Control (ICV)= 3189 Genes DE Difusa vs Control (ICV)= 4724 Genes DE Focal vs Control (PB+ICV) = 19 Genes DE Difusa vs Control (PB+ICV) = 48	-	-	-	-
QTLs	-	-	12	Multifocal= 13 Difusa= 9	9
GOs	GOs Focal (PB) = 0 GOs Difusa (PB) = 11 GOs Focal (ICV) = 83 GOs Difusa (ICV) = 80	-	-	GOs multifocal= 7: Filamento de queratina (GO:0045095), Filamento intermedio (GO:0005882), Filamento intermedio del citoesqueleto (GO:0045111), Fibra supramolecular (GO:0099512), Polímero supramolecular (GO:0099081), Fibra polimérica del citoesqueleto (GO:0099513), Complejo supramolecular (GO:0099080) GOs difusa= 0	GOs = 7: Empaquetamiento del DNA (GO:0006323), Cambio de conformación del DNA (GO:0071103), Nucleosoma (GO:000786), Complejo de empaquetamiento del DNA (GO:0044815), Complejo proteína-DNA (GO:0032993), Cromatina (GO:0000785), Cromosoma (GO:0005694)
Rutas enriquecidas	Rutas enriquecidas Focal (PB) = 0 Rutas enriquecidas Difusa (PB) = 0 Rutas enriquecidas Focal (ICV) = 3: Biosíntesis de N-Glicanos (bta00510), Metabolismo de las purinas (bta00230), Pool de carbono por la vía del folato (bta00670) y secreción biliar (bta04976) Rutas enriquecidas Difusa (ICV) = 82: Degradación de valina, leucina e isoleucina (bta00280), Metabolismo de las purinas (bta00230), ruta de digestión y absorción de vitaminas y ruta de colesterol.	-	-	Rutas enriquecidas multifocal = 0 Rutas enriquecidas difusa= 1: Metabolismo del colesterol (bta04979)	Rutas enriquecidas = 2: Toxoplasmosis (bta05145) y Señalización del TNF (bta04668)

7. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, W., Kumar, A., & Herbein, G. (2015). The eEF1A proteins: At the crossroads of oncogenesis, apoptosis, and viral infections. *Frontiers in Oncology*, 5(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00075>
- Abbott, D. W., Wilkins, A., Asara, J. M., & Cantley, L. C. (2004). The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Current Biology*, 14, 2217–2227.
- Abendaño, N., Sevilla, I., Prieto, J. M., Garrido, J. M., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2012). Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2609–2617. <https://doi.org/10.1128/JCM.00441-12>
- Abendaño, N. (2016). Análisis del potencial epizoótico de cepas de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aisladas de diversos hospedadores empleando modelos de infección in vitro. Universidad del País Vasco.
- Acharya, K. R., Dhand, N. K., Whittington, R. J., & Plain, K. M. (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula using IS900 quantitative PCR and liquid culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 1–9.
- Agouridis, A. P., Elisaf, M., & Milionis, H. J. (2011). An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, 24(3), 181–187.
- Aleri, J. W., Hine, B. C., Pyman, M. F., Mansell, P. D., Wales, W. J., Mallard, B., & Fisher, A. D. (2016). Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research in Veterinary Science*, 108, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.07.007>
- Almejan, C. S. (1958). Johne's disease in yaks. *Monatshefte Fuer Veterinaermedizin*, 13, 645–649.
- Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J. M., & Juste, R. A. (2009). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(4), 513–518. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0226>
- Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., & Juste, R. A. (2012). Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 618–629. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2860>
- Alonso-Hearn, M., Canive, M., Blanco-Vazquez, C., Torremocha, R., Balseiro, A., Amado, J., Varela-Martinez, E., Ramos, R., Jugo, B. M., & Casais, R. (2019). RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51328-0>
- Alpay, F., Zare, Y., Kamalludin, M. H., Huang, X., Shi, X., Shook, G. E., Collins, M. T., & Kirkpatrick, B. W. (2014). Genome-wide association study of susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Holstein cattle. *PLoS ONE*, 9(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111704>
- 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. *Veterinary Record*, 156(7), 212–213. <https://doi.org/10.1136/vr.156.7.212>
- Alzuherri, H. M., Woodall, C. J., & Clarke, C. J. (1996). Increased intestinal TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression in ovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 49(4), 331–345. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05477-4](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05477-4)
- Amand, W. B. (1974). Paratuberculosis in a dromedary camel. *Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*, 150–153.
- Amiri, A., Noei, F., Jeganathan, S., Kulkarni, G., Pinke, D. E., & Lee, J. M. (2007). eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene*, 26(21), 3027–3040. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210101>

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. L., Meece, J. K., Koziczowski, J. J., Clark, D. L., Radcliff, R. P., Nolden, C. A., Samuel, M. D., & Ellingson, J. L. E. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, *43*(2), 302–308. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.2.302>
- Appleby, E. C., & Head, K. W. (1954). A case of suspected Johne's disease in a llama (*L. glama*). *Journal of Comparative Pathology*, *64*(1), 52–53. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(54\)80007-5](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(54)80007-5)
- Ariel, O., Gendron, D., Dudemaine, P. L., Gévry, N., Ibeagha-Awemu, E. M., & Bissonnette, N. (2020). Transcriptome profiling of bovine macrophages infected by *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* depicts foam cell and innate immune tolerance phenotypes. *Frontiers in Immunology*, *10*(January), 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02874>
- Arrazuria, R., Ladero, I., Molina, E., & Fuertes, M. (2020). Alternative vaccination routes against paratuberculosis modulate local immune response and interference with tuberculosis diagnosis in laboratory animal models. *Veterinary sciences*, *7*, 7. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010001>
- 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), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-54>
- Aryngazyev, B., Beltramo, C., Dondo, A., Karymsakov, T., Varello, K., Gorla, M., Di Blasio, A., Nodari, S., Colussi, S., Modesto, P., Daugaliyeva, A., Acutis, P. L., Daugaliyeva, S., & Peletto, S. (2020). Polymorphisms associated to bovine paratuberculosis: Investigation of their role in DNA-protein interactions and transcriptional regulation. *Veterinaria Italiana*, *56*(2), 109–114. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2325.13205.1>
- Azimi, T., Nasiri, M. J., Chirani, A. S., Pouriran, R., & Dabiri, H. (2018). The role of bacteria in the inflammatory bowel disease development: a narrative review. *Apmis*, *126*(4), 275–283. <https://doi.org/10.1111/apm.12814>
- Baldwin, E. W. (1976). Isoniazid therapy in two cases of Johne's disease. *Vet Med Small Anim Clin*, *71*(10), 1359–1362.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, *8*(9). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Balseiro, A., Prieto, J. M., Espí, A., Perez, V., & García Marín, J. F. (2003). Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and the ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin skin test. *Veterinary Journal*, *166*(2), 210–212. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00312-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00312-X)
- Balseiro, A., Perez, V., & Juste, R. A. (2019). Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *62*(October 2018), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001>
- Bannantine, J. P., Wu, C. wei, Hsu, C., Zhou, S., Schwartz, D. C., Bayles, D. O., Paustian, M. L., Alt, D. P., Sreevatsan, S., Kapur, V., & Talaat, A. M. (2012). Genome sequencing of ovine isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* offers insights into host association. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-89>
- Banos, G., Winters, M., Mrode, R., Mitchell, A. P., Bishop, S. C., Woolliams, J. A., & Coffey, M. P. (2017). Genetic evaluation for bovine tuberculosis resistance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 1272–1281. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11897>
- Bao, Y., Yao, Y., Wang, Z., Wu, S., Jiang, X., & Ma, H. (2022). Analysis of mRNA and circRNA expression profiles of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, *12*(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796922>
- Baquero, M. M., & Plattner, B. L. (2015). Bovine WC1+ $\gamma\delta$ T lymphocytes modify monocyte-derived macrophage responses during early *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *170*, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.002>
- Baquero, M. M., & Plattner, B. L. (2017). Bovine WC1+ and WC1neg $\gamma\delta$ T lymphocytes influence monocyte differentiation and monocyte-derived dendritic cell maturation during in vitro *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Frontiers in Immunology*, *8*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00534>

- Barkema, H. W., Orsel, K., Nielsen, S. S., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Bannantine, J. P., Keefe, G. P., Kelton, D. F., Wells, S. J., Whittington, R. J., Mackintosh, C. G., Manning, E. J., Weber, M. F., Heuer, C., Forde, T. L., Ritter, C., Roche, S., Corbett, C. S., Wolf, R., ... De Buck, J. (2018). Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(May 2017), 125–148. <https://doi.org/10.1111/tbed.12723>
- Barreiro, L. B., & Quintana-Murci, L. (2010). From evolutionary genetics to human immunology: How selection shapes host defence genes. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 17–30. <https://doi.org/10.1038/nrg2698>
- Bastida, F., & Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: A review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8>
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., & Sharp, J. M. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1517–1521. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1517-1521.2001>
- Begg, D. J., Plain, K. M., de Silva, K., Gurung, R., Gunn, A., Purdie, A. C., & Whittington, R. J. (2018). Immunopathological changes and apparent recovery from infection revealed in cattle in an experimental model of Johne's disease using a lyophilised culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 219(December 2017), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.029>
- Behr, M. A., & Kapur, V. (2008). The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(1), 17–21. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f1dcc4>
- Benedictus, A., Mitchell, R. M., Linde-Widmann, M., Sweeney, R., Fyock, T., Schukken, Y. H., & Whitlock, R. H. (2008). Transmission parameters of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in a dairy herd going through a control program. *Preventive Veterinary Medicine*, 83(3–4), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.07.008>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bergey, D., Harrison, F., Breed, R., Hammer, B., & Huntoon, P. (1923). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (1st edition).
- 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>
- Björndahl, L., & Kvist, U. (2014). Structure of chromatin in spermatozoa. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 791, 1–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9_1
- 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>
- Blanco Vázquez, C., Balseiro, A., Alonso-Hearn, M., Juste, R. A., Iglesias, N., Canive, M., & Casais, R. (2021). Bovine intelectin 2 expression as a biomarker of paratuberculosis disease progression. *Animals*, 11(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11051370>
- Blanco-Vázquez, C., Alonso-Hearn, M., Iglesias, N., Vázquez, P., Juste, R. A., Garrido, J. M., Balseiro, A., Canive, M., Amado, J., Queipo, M. A., Iglesias, T., & Casais, R. (2022). Use of ATP-binding cassette subfamily A member 13 (ABCA13) for sensitive detection of focal pathological forms of subclinical bovine paratuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science*. (Aceptado)
- Bo, R. (2009). Practical cattle breeding in the future - commercialised or co-operative, across borderlines between countries and organizations. *Interbull Bulletin*, 0(40), 252.
- Bo, M., Jasemi, S., Uras, G., Erre, G. L., Passiu, G., & Sechi, L. A. (2020). Role of infections in the pathogenesis of

7. BIBLIOGRAFÍA

- rheumatoid arthritis: Focus on mycobacteria. *Microorganisms*, 8(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101459>
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., & Bottger, E. C. (1990). Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8), 1751–1759. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.8.1751-1759.1990>
- Boever, W. J., & Peters, D. (1974). Paratuberculosis in two herds of exotic sheep. *J.Am.Vet.Med.Assoc*, 165(9), 822.
- Borutaite, V., & Brown, G. C. (2003). Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(11), 1457–1468. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.003>
- Brennan, P. J., & Goren, M. B. (1979). Structural studies on the type-specific antigen and lipids of the *Mycobacterium avium*. *Mycobacterium intracellulare*. *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *Journal of Biological Chemistry*, 254(10), 4205–4211. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)50716-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)50716-x)
- Brennan, P. J., & Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 29–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333>
- Brito, L. F., Mallikarjunappa, S., Sargolzaei, M., Koeck, A., Chesnais, J., Schenkel, F. S., Meade, K. G., Miglior, F., & Karrow, N. A. (2018). The genetic architecture of milk ELISA scores as an indicator of Johne’s disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 10062–10075. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14250>
- Britton, L., Cassidy, J. P., O’Donovan, J., Gordon, S. V., & Markey, B. (2016). Potential application of emerging diagnostic techniques to the diagnosis of bovine 4 Johne’s disease (paratuberculosis). *Vet J.*, 209, 32–39.
- Buergelt, C. D., & Ginn, P. E. (2000). The histopathologic diagnosis of subclinical Johne’s disease in North American Bison (*Bison bison*). *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 325–331. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00317-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00317-5)
- Buza, J. J., Mori, Y., Bari, A. M., Hikono, H., Aodon-geril, Hirayama, S., Shu, Y., & Momotani, E. (2003). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection causes suppression of RANTES, monocyte chemoattractant protein 1, and tumor necrosis factor alpha expression in peripheral blood of experimentally infected cattle. *Infection and Immunity*, 71(12), 7223–7227. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.7223-7227.2003>
- Byun, E. H., Kim, W. S., Kim, J. S., Won, C. J., Choi, H. G., Kim, H. J., Cho, S. N., Lee, K., Zhang, T., Hur, G. M., & Shin, S. J. (2012). *Mycobacterium paratuberculosis* CobT activates dendritic cells via engagement of toll-like receptor 4 resulting in Th1 cell expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38609–38624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391060>
- Cai, Z., Guldbandsen, B., Lund, M. S., & Sahana, G. (2018). Prioritizing candidate genes post-GWAS using multiple sources of data for mastitis resistance in dairy cattle. *BMC Genomics*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5050-x>
- Caldeira, J. L. A., Faria, A. C. S., Diaz-Miranda, E. A., Zilch, T. J., da Costa Caliman, S. L., Okano, D. S., Guimarães, J. D., Pena, J. L., Barbosa, W. F., Junior, A. S., Chang, Y. F., & Moreira, M. A. S. (2021). Interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine sperm. *Theriogenology*, 161, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.007>
- Canive, M., Casais, R., Jimenez, J. A., Blanco-Vazquez, C., Amado, J., Garrido, J. M., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2020). Correlations between single nucleotide polymorphisms in bovine CD209, SLC11A1, SP110 and TLR2 genes and estimated breeding values for several traits in Spanish Holstein cattle. *Heliyon*, 6(6), e04254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04254>
- Canive, M., González-Recio, O., Fernández, A., Vázquez, P., Badia-Bringué, G., Lavín, J. L., Garrido, J. M., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2021). Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. *PLoS ONE*, 16(8 August), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091>

- 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>
- Casey, M. E., Meade, K. G., Nalpas, N. C., Taraktoglou, M., Browne, J. A., Killick, K. E., Stephen, S. D., Gormley, E., Hokamp, K., Magee, D. A., & MacHugh, D. E. (2015). Analysis of the bovine monocyte-derived macrophage response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection using RNA-seq. *Frontiers in Immunology*, *6*(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00023>
- Celler, B. G. (2018). Case Study: Cardiac sarcoidosis resolved with *Mycobacterium avium paratuberculosis* antibiotics (MAP). *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*, *35*(2), 171–177. <https://doi.org/10.36141/svdl.v35i2.6769>
- Chakravarty, S. D., Zhu, G., Tsai, M. C., Mohan, V. P., Marino, S., Kirschner, D. E., Huang, L., Flynn, J. A., & Chan, J. (2008). Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infection and Immunity*, *76*(3), 916–926. <https://doi.org/10.1128/IAI.01011-07>
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S., & Bloom, B. R. (1992). Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by murine macrophages. *J Exp Med*, *175*, 1111–1122.
- Cheng, Z., Shang, Y., Gao, S., & Zhang, T. (2017). Overexpression of U1 snRNA induces decrease of U1 spliceosome function associated with Alzheimer's disease. *Journal of Neurogenetics*, *31*(4), 337–343. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1395425>
- Cheng, Z., Du, Z., Zhai, B., Yang, Z., & Zhang, T. (2018). U1 small nuclear RNA overexpression implicates autophagic-lysosomal system associated with AD. *Neuroscience Research*, *136*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.01.006>
- Chiodini, R. J., & Van Kruiningen, H. J. (1983). Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc*, *182*(2), 168–169.
- Chiodini, R. J., & Hermon-Taylor, J. (1993). The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *5*(4), 629–631. <https://doi.org/10.1177/104063879300500424>
- Chua, C. E. L., Gan, B. Q., & Tang, B. L. (2011). Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(20), 3349–3358. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0748-9>
- Clarke, C. J. (1997). The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J Comp Pathol*. *116*(1906), 217–261.
- Cleland, P. C., Lehmann, D. R., Phillips, P. H., Cousins, D. V., Reddacliff, L. A., & Whittington, R. J. (2010). A survey to detect the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Kangaroo Island macropods. *Veterinary Microbiology*, *145*(3–4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.021>
- Click, R. E. (2011). Successful treatment of asymptomatic or clinically terminal bovine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection (Johne's disease) with the bacterium *Dietzia* used as a probiotic alone or in combination with dexamethasone. *Virulence*, *2*(2), 131–143. <https://doi.org/10.4161/viru.2.2.15647>
- Coad, M., Doyle, M., Steinbach, S., Gormley, E., Vordermeier, M., & Jones, G. (2019). Simultaneous measurement of antigen-induced CXCL10 and IFN- γ enhances test sensitivity for bovine TB detection in cattle. *Veterinary Microbiology*, *230*(November 2018), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.007>
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., De Kesel, M., Poupart, P., & Vannuffel, P. (1994). Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *7*(3), 328–345. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.3.328>
- Cole, J. B., Wiggans, G. R., Ma, L., Sonstegard, T. S., Lawlor, T. J., Crooker, B. A., Van Tassell, C. P., Yang, J., Wang, S., Matukumalli, L. K., & Da, Y. (2011). Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. *BMC Genomics*, *12*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-408>

7. BIBLIOGRAFÍA

- Collins, D. M., Gabric, D. M., & de Lisle, G. W. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *60*, 175–178.
- CONAFE. (2019). Evaluación genética nacional del vacuno frisón español. 1–10. http://213.0.29.171/IndicesGen/Docs/evaluaciones_Metodologia_y_requisitos.pdf
- Conde, C., Branger, M., Cochard, T., Rossignol, M.-N., Fourichon, C., Delafosse, A., Davergne, A., Joly, A., Ngwa-Mbot, D., Journaux, L., Guatteo, R., Schibler, L., & Biet, F. (2021). Draft genome sequences of 142 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from naturally infected dairy cattle. *Microbiology Resource Announcements*, *10*(38), 1–5. <https://doi.org/10.1128/mra.00697-21>
- Corbett, C. S., Naqvi, S. A., Bauman, C. A., De Buck, J., Orsel, K., Uehlinger, F., Kelton, D. F., & Barkema, H. W. (2018). Prevalence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infections in Canadian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 11218–11228. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14854>
- Corn, J. L., Manning, E. J. B., Sreevatsan, S., & Fischer, J. R. (2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 6963–6967. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6963-6967.2005>
- Corpa, J. M., Garrido, J., García Marín, J. F., & Pérez, V. (2000). Classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in goats. *Journal of Comparative Pathology*, *122*(4), 255–265. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0368>
- Cossu, D., Cocco, E., Paccagnini, D., Masala, S., Ahmed, N., Frau, J., Marrosu, M. G., & Sechi, L. A. (2011). Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in sardinian patients. *PLoS ONE*, *6*(4), 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018482>
- Coussens, P. M., Colvin, C. J., Wiersma, K., Abouzied, A., & Sipkovsky, S. (2002). Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, *70*(10), 5494–5502. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5494-5502.2002>
- Coussens, P. M., Verman, N., Coussens, M. A., Elftman, M. D., & McNulty, A. M. (2004). 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. *Infection and Immunity*, *72*(3), 1409–1422. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1409-1422.2004>
- Coussens, P. M. (2020). Host–Pathogen interactions and intracellular survival of MAP. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 133–150).
- Crandall, P. G., Ricke, S. C., O’Bryan, C. A., & Parrish, N. M. (2012). In vitro effects of citrus oils against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous Mycobacteria of clinical importance. *Journal of Environmental Science and Health* *47*(7), 736–741. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.669331>
- Dalziel, A. T. K. (1913). Chronic Interstitial Enteritis. *The British Medical Journal- Section of surgery (Oct)*, 1068–1070.
- Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A. E., Kwong, A., Vrieze, S. I., Chew, E. Y., Levy, S., McGue, M., Schlessinger, D., Stambolian, D., Loh, P. R., Iacono, W. G., Swaroop, A., Scott, L. J., Cucca, F., Kronenberg, F., Boehnke, M., ... Fuchsberger, C. (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nature Genetics*, *48*(10), 1284–1287. <https://doi.org/10.1038/ng.3656>
- David, J., Barkema, H. W., Mortier, R., Ghosh, S., Guan, L. L., & De Buck, J. (2014). Gene expression profiling and putative biomarkers of calves 3 months after infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *160*(1–2), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.04.006>
- De Buck, J., Shaykhtudinov, R., Barkema, H. W., & Vogel, H. J. (2014). Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111872>
- DeKuijper, J. L., Cooperider, H. E., Lubben, N., Ancel, C. M., & Coussens, P. M. (2020). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* drives an innate Th17-like T cell response regardless of the presence of antigen presenting cells. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00108>

- Del Corvo, M., Luini, M., Stella, A., Pagnacco, G., Ajmone-Marsan, P., Williams, J. L., & Minozzi, G. (2017). Identification of additional loci associated with antibody response to *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* in cattle by GSEA-SNP analysis. *Mammalian Genome*, 28(11–12), 520–527. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9714-7>
- Devonshire, A. S., O’Sullivan, D. M., Honeyborne, I., Jones, G., Karczmarczyk, M., Pavšič, J., Gutteridge, A., Milavec, M., Mendoza, P., Schimmel, H., Van Heuverswyn, F., Gorton, R., Cirillo, D. M., Borroni, E., Harris, K., Barnard, M., Heydenrych, A., Ndusilo, N., Wallis, C. L., y col (2016). The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1696-7>
- 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>
- Divangahi, M., Khan, N., & Kaufmann, E. (2018). Beyond killing *Mycobacterium tuberculosis*: Disease tolerance. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 2976. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02976>
- Doeschl-Wilson, A. B., & Kyriazakis, I. (2012). Should we aim for genetic improvement in host resistance or tolerance to infectious pathogens? *Frontiers in Genetics*, 3, 1–2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00272>
- 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>
- Donat, K., Eisenberg, S., & Whittington, R. J. (2020). Paratuberculosis control measures. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 346–364).
- Dow, C. T., & Ellingson, J. L. E. (2010). Detection of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in Blau syndrome tissues. *Autoimmune Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.4061/2010/127692>
- Dow, C. T. (2021). Warm, sweetened milk at the twilight of immunity - Alzheimer’s Disease - inflammaging, insulin resistance, *M. paratuberculosis* and immunosenescence. *Frontiers in Immunology*, 12(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714179>
- Dow, C. T., & Chan, E. D. (2021). What is the evidence that mycobacteria are associated with the pathogenesis of Sjogren’s syndrome? *Journal of Translational Autoimmunity*, 4(January), 100085. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100085>
- Dudemaine, P. L., Fecteau, G., Lessard, M., Labrecque, O., Roy, J. P., & Bissonnette, N. (2014). Increased blood-circulating interferon- γ , interleukin-17, and osteopontin levels in bovine paratuberculosis. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3382–3393. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7059>
- Dufour, B., Pouillot, R., & Durand, D. (2004). A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet Res*, 35(1), 69–81. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003045>
- Dukes, T. W., Glover, G. J., Brooks, B. W., Duncan, J. R., & Swendrowski, M. (1992). Paratuberculosis in saiga antelope (*Saiga tatarica*) and experimental transmission to domestic sheep. *J Wildl Dis*, 28, 161–170.
- Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/ Bioconductor package biomaRt. *Nature Protocols*, 4(8), 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>
- Dyer, N. H., & Dawson, A. M. (1971). The significance of serum cholesterol measurements in crohn’s disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 6(3), 253–256. <https://doi.org/10.3109/00365527109180703>
- Egger-Danner, C., Cole, J. B., Pryce, J. E., Gengler, N., Heringstad, B., Bradley, A., & Stock, K. F. (2014). Invited review: Overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *Animal*, 9(2), 191–207. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002614>
- Eidus, L., & Konst, H. (1964). The susceptibility of *Mycobacterium Paratuberculosis* (Johne’s Bacillus). *The American Review of Respiratory Disease*, 89, 289–292.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Eisenberg, S. W. F., Koets, A. P., Hoeboer, J., Bouman, M., Heederik, D., & Nielen, M. (2010). Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in environmental samples collected on commercial dutch dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6310–6312. <https://doi.org/10.1128/AEM.00998-10>
- Elliott, G. N., Hough, R. L., Avery, L. M., Maltin, C. A., & Campbell, C. D. (2015). Environmental risk factors in the incidence of Johnes disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(4), 488–507. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.867830>
- Eppleston, J., Begg, D. J., Dhand, N. K., Watt, B., & Whittington, R. J. (2014). Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of eastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2337–2342. <https://doi.org/10.1128/AEM.03630-13>
- Facciuolo, A., Lee, A. H., Gonzalez Cano, P., Townsend, H. G. G., Falsafi, R., Gerdts, V., Potter, A., Napper, S., Hancock, R. E. W., Mutharia, L. M., & Griebel, P. J. (2020). Regional dichotomy in enteric mucosal immune responses to a persistent *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* Infection. *Frontiers in Immunology*, 11(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01020>
- Fang, L., Sahana, G., Su, G., Yu, Y., Zhang, S., Lund, M. S., & Sørensen, P. (2017). Integrating sequence-based GWAS and RNA-Seq provides novel insights into the genetic basis of mastitis and milk production in dairy cattle. *Scientific Reports*, 7(March), 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep45560>
- Fang, L., Sørensen, P., Sahana, G., Panitz, F., Su, G., Zhang, S., Yu, Y., Li, B., Ma, L., Liu, G., Lund, M. S., & Thomsen, B. (2018). MicroRNA-guided prioritization of genome-wide association signals reveals the importance of microRNA-target gene networks for complex traits in cattle. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27729-y>
- Faustino, N. A., & Cooper, T. A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes and Development*, 17(4), 419–437. <https://doi.org/10.1101/gad.1048803>
- Fecteau, M. E., & Whitlock, R. H. (2011). Treatment and chemoprophylaxis for paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(3), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.002>
- Fecteau, M. (2020). Paratuberculosis in cattle. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 149–159).
- Fehring, G., Kraft, P., Pharoah, P. D., Eeles, R. A., Chatterjee, N., Schumacher, F. R., Schildkraut, J. M., Lindström, S., Brennan, P., Bickeböller, H., Houlston, R. S., Landi, M. T., Caporaso, N., Risch, A., Al Olama, A. A., Berndt, S. I., Giovannucci, E. L., Grönberg, H., Kote-Jarai, Z., et al. (2016). Cross-cancer genome-wide analysis of lung, ovary, breast, prostate, and colorectal cancer reveals novel pleiotropic associations. *Cancer Research*, 76(17), 5103–5114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2980>
- Fernández, M., Benavides, J., Castaño, P., Elguezabal, N., Fuertes, M., Muñoz, M., Royo, M., Ferreras, M. C., & Pérez, V. (2017). Macrophage subsets within granulomatous intestinal lesions in bovine paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, 54(1), 82–93. <https://doi.org/10.1177/0300985816653794>
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., & Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 67(4 SUPPL.), 503.
- Ferroglio, E., Nebbia, P., Robino, P., Rossi, L., & Rosati, S. (2000). *Mycobacterium paratuberculosis* infection in two free-ranging Alpine ibex. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 19(3), 859–862. <https://doi.org/10.20506/rst.19.3.1260>
- Ferwerda, G., Kullberg, B. J., de Jong, D. J., Girardin, S. E., Langenberg, D. M. L., van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., Van der Meer, J. W. M., & Netea, M. G. (2007). *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), 1011–1018. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307147>
- Fischer, O., Mátlová, L., Dvorská, L., Švástová, P., Bartl, J., Melichárek, I., Weston, R. T., & Pavlík, I. (2001). Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(2), 208–211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00292.x>
- Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorská, L., Svastova, P., & Pavlik, I. (2003a). Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. *Medical and Veterinary*

Entomology, 17(2), 145–150. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00417.x>

- Fischer, O. A., Matlova, L., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du Maine, R., Melicharek, I., Bartos, M., & Pavlik, I. (2003b). Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) and mycobacteria. *Veterinary Microbiology*, 91(4), 325–338. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00302-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00302-4)
- Fitzgerald, L. E., Abendaño, N., Juste, R. A., & Alonso-Hearn, M. (2014). Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/623856>
- Florou, M., Leontides, L., Kostoulas, P., Billinis, C., Sofia, M., Kyriazakis, I., & Lykotrafitis, F. (2008). Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of greek sheep and goats. *Epidemiology and Infection*, 136(5), 644–652. <https://doi.org/10.1017/S095026880700893X>
- Fox, N. J., Smith, L. ., Stevenson, K., Davidson, R. S., Marion, G., & Hutchings, M. R. (2020). Infection of Non-ruminant Wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 200–212).
- Francis, J. (1943). Infection of laboratory animals with *Mycobacterium Johnei*. *J Comp Path*, 53, 140–150.
- Fratti, R. A., Backer, J. M., Gruenberg, J., Corvera, S., & Deretic, V. (2001). Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *Journal of Cell Biology*, 154(3), 631–644. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106049>
- Frau, J., Cossu, D., Coghe, G., Lorefice, L., Fenu, G., Melis, M., Paccagnini, D., Sardu, C., Murru, M. R., Tranquilli, S., Marrosu, M. G., Sechi, L. A., & Cocco, E. (2013). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and multiple sclerosis in sardinian patients: Epidemiology and clinical features. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(11), 1437–1442. <https://doi.org/10.1177/1352458513477926>
- Gao, Y., Jiang, J., Yang, S., Cao, J., Han, B., Wang, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zhang, S., Zhang, Q., Fang, L., Cantrell, B., & Sun, D. (2018). Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5385-3>
- Garcia, 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>
- Garrido, J.M. (2001). Puesta a punto de las técnicas de PCR en heces y de ELISA para el diagnóstico de la paratuberculosis. Estudio de prevalencia en ganado bovino. Universidad de Zaragoza.
- 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>
- Geijtenbeek, T. B. H., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Appelmek, B., & Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1), 7–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20021229>
- Geraghty, T., Graham, D. A., Mullaney, 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>
- Gerrard, Z. E., Swift, B. M. C., Botsaris, G., Davidson, R. S., Hutchings, M. R., Huxley, J. N., & Rees, C. E. D. (2018). Survival of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in retail pasteurised milk. *Food Microbiology*, 74, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.004>
- Gijsbers, K., Van Assche, G., Joossens, S., Struyf, S., Proost, P., Rutgeerts, P., Geboes, K., & Van Damme, J. (2004). CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: Down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. *European Journal of Immunology*, 34(7), 1992–2000. <https://doi.org/10.1002/eji.200324807>
- Gilmour, N. J. L., Nisbet, D. I., & Brotherston, J. G. (1965). Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium*

7. BIBLIOGRAFÍA

- johni. Journal of Comparative Pathology*, 75(3), 281–286. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(65\)90033-2](https://doi.org/10.1016/0021-9975(65)90033-2)
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., & Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8869–8872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Glass, C., Wuertzer, C., Cui, X., Bi, Y., Davuluri, R., Xiao, Y. Y., Wilson, M., Owens, K., Zhang, Y., & Perkins, A. (2013). Global Identification of EVI1 Target Genes in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067134>
- Glawischnig, W., Awad-Masalmeh, M., Khaschabi, D., & Schönbauer, M. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from the testicles of a clinically infected breeding animal. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 117(3–4), 136–139.
- Gomes, M. S. (1999). A interação entre o macrófago e o *Mycobacterium avium*. Universidade do Porto.
- Gonda, M. G., Kirkpatrick, B. W., Shook, G. E., & Collins, M. T. (2007). Identification of a QTL on BTA20 affecting susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in US Holsteins. *Animal Genetics*, 38(4), 389–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01627.x>
- 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>
- González, J. R., Armengol, L., Solé, X., Guinó, E., Mercader, J. M., Estivill, X., & Moreno, V. (2007). SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, 23(5), 644–645. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm025>
- Govoni, G., & Gros, P. (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflammation Research*, 47(7), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s000110050330>
- Grant, I. R., Foddai, A. C. G., Tarrant, J. C., Kunkel, B., Hartmann, F. A., McGuirk, S., Hansen, C., Talaat, A. M., & Collins, M. T. (2017). Viable *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isolated from calf milk replacer. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9723–9735. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13154>
- Grant, I. (2020). MAP in animal-derived foods and the environment. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (p. 14–28).
- Greenstein, R. J., Su, L., Haroutunian, V., Shahidi, A., & Brown, S. T. (2007). On the action of methotrexate and 6-mercaptopurine on *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 2(1), 3–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000161>
- Greenstein, R. J., Su, L., Whitlock, R. H., & Brown, S. T. (2009). Monensin causes dose dependent inhibition of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in radiometric culture. *Gut Pathogens*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-4>
- Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A., Grant, J., & Sharp, J. (1997). Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec*, 140(6), 141–143.
- Greig, A., Stevenson, K., Henderson, D., Perez, V., Hughes, V., Pavlik, I., Hines, M. E., McKendrick, I., & Sharp, J. M. (1999). Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1746–1751. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1746-1751.1999>
- Griffin, J. F. T. (1988). The etiology of tuberculosis and mycobacterial diseases in farmed deer. *Ir Vet J*, 42, 23–26.
- Gronesova, P., Ficova, M., Mizakova, A., Kabat, P., Trnka, A., & Betakova, T. (2008). Prevalence of avian influenza viruses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia, 2006. *Avian Pathology*, 37(5), 537–543. <https://doi.org/10.1080/03079450802356953>
- Guirado, E., & Schlesinger, L. S. (2013). Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma - the critical battlefield in host immunity and disease. *Frontiers in Immunology*, 4(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00098>

- Guler, R., Roy, S., Suzuki, H., & Brombacher, F. (2015). Targeting Batf2 for infectious diseases and cancer. *Oncotarget*, 6(29). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5576>
- Guler, R., Mpotje, T., Ozturk, M., Nono, J. K., Parihar, S. P., Chia, J. E., Abdel Aziz, N., Hlaka, L., Kumar, S., Roy, S., Penn-Nicholson, A., Hanekom, W. A., Zak, D. E., Scriba, T. J., Suzuki, H., & Brombacher, F. (2019). Batf2 differentially regulates tissue immunopathology in Type 1 and Type 2 diseases. *Mucosal Immunology*, 12(2), 390–402. <https://doi.org/10.1038/s41385-018-0108-2>
- Gupta, P., Peter, S., Jung, M., Lewin, A., Hemmrich-Stanisak, G., Franke, A., von Kleist, M., Schütte, C., Einspanier, R., Sharbati, S., & Bruegge, J. zur. (2019). Analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in bovine macrophages brings up novel aspects of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38141-x>
- Gwozdz, J. M., Thompson, K. G., Murray, A., Reichel, M. P., Manktelow, B. W., & West, D. M. (2000). Comparison of three serological tests and an interferon- γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep. *Australian Veterinary Journal*, 78(11), 779–783. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb10452.x>
- Hare, N. J., Lee, L. Y., Loke, I., Britton, W. J., Saunders, B. M., & Thaysen-Andersen, M. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* infection manipulates the glycosylation machinery and the N-Glycoproteome of human macrophages and their microparticles. *Journal of Proteome Research*, 16(1), 247–263. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00685>
- Hasonova, L., & Pavlik, I. (2006). Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Veterinarni Medicina*, 51(5), 193–211. <https://doi.org/10.17221/5539-VETMED>
- Hayes, B. J., & Daetwyler, H. D. (2019). 1000 Bull genomes project to map simple and complex genetic traits in cattle: Applications and outcomes. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 89–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115024>
- Hempel, R. J., Bannantine, J. P., & Stabel, J. R. (2016). Transcriptional profiling of ileocecal valve of holstein dairy cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 11(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153932>
- Heuvelink, A., Hassan, A. A., van Weering, H., van Engelen, E., Bülte, M., & Akineden, Ö. (2017). An intra-laboratory cultural and real-time PCR method comparison and evaluation for the detection of subclinical paratuberculosis in dairy herds. *Folia Microbiologica*, 62(3), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0488-1>
- Hoffsis, G. F., & Streeter, R. N. (1990). Therapy for Johne ' s Disease. *Bovine Pract*, 25, 55–58.
- Holmberg, M., & Andersson-Eklund, L. (2004). Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2653–2659. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73391-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73391-3)
- Hood, D., Moxon, R., Purnell, T., Richter, C., Williams, D., Azar, A., Crompton, M., Wells, S., Fray, M., Brown, S. D. M., & Cheeseman, M. T. (2016). A new model for non-typeable *Haemophilus influenzae* middle ear infection in the Junbo mutant mouse. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(1), 69–79. <https://doi.org/10.1242/dmm.021659>
- Hope, A. F., Kluver, P. F., Jones, S. L., & Condron, R. J. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 78(12), 850–856. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb10508.x>
- <https://johnes.org/>
- Hussain, T., Shah, S. Z. A., Zhao, D., Sreevatsan, S., & Zhou, X. (2016). The role of IL-10 in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Cell Communication and Signaling*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0152-z>
- Ibeagha-Awemu, E. M., Bissonnette, N., Do, D. N., Dudemaine, P.-L., Wang, M., Facciuolo, A., & Griebel, P. (2021). Regionally distinct immune and metabolic transcriptional responses in the bovine small intestine and draining lymph nodes during a subclinical *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Frontiers in Immunology*, 12(December), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760931>

7. BIBLIOGRAFÍA

- Imada, J., Kelton, D. F., & Barkema, H. W. (2020). Epidemiology, global prevalence and economics of infection. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 1–13).
- Inderlied, C. B., Kemper, C. A., & Bermudez, L. E. M. (1993). The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(3), 266–310. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.266>
- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Larner, A. C., & Finbloom, D. S. (1999). Interleukin-10 inhibits expression of both interferon α - and Interferon γ - induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93(5), 1456–1463. <https://doi.org/10.1182/blood.v93.5.1456>
- Itoh, Y., Joh, T., Tanida, S., Sasaki, M., Kataoka, H., Itoh, K., Oshima, T., Ogasawara, N., Togawa, S., Wada, T., Kubota, H., Mori, Y., Ohara, H., Nomura, T., Higashiyama, S., & Itoh, M. (2005). IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase- cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 29(6), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.11.005>
- Jenum, S., Dhanasekaran, S., Ritz, C., Macaden, R., Doherty, T. M., & Grewal, H. M. S. (2016). Added value of IP-10 as a read-out of *Mycobacterium tuberculosis* specific immunity in young children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(12), 1336–1338. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001328>
- Jenvey, C. J., Shircliff, A. L., Bannantine, J. P., & Stabel, J. R. (2019). Phenotypes of macrophages present in the intestine are impacted by stage of disease in cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 14(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217649>
- Jessup, D. A., Abbas, B., & Behymer, D. (1981). Paratuberculosis in tule elk in California. *J Am Vet Med Assoc*, 179(11), 1252–1254.
- Johansen, M. D., de Silva, K., Plain, K. M., Whittington, R. J., & Purdie, A. C. (2019). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microbial Pathogenesis*, 130(March), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.031>
- Johne, H., & Frothingam, L. (1985). Ein eigenthümlicher fall von Tuberculose beim Rind. *Deutsche Zeitschrift Für Tiermedizin Und Vergleichende Pathologie*, 21, 438–455.
- Johnson, P. T. J., Wood, C. L., Joseph, M. B., Preston, D. L., Haas, S. E., & Springer, Y. P. (2016). Habitat heterogeneity drives the host-diversity-begets-parasite-diversity relationship: evidence from experimental and field studies. *Ecology Letters*, 19(7), 752–761. <https://doi.org/10.1111/ele.12609>
- Jolly, A., Fernández, B., Stempler, A., Ingratta, G., Postma, G., Boviez, J., Lombardo, D., Hajos, S., & Mundo, S. L. (2022). Antibodies from healthy or paratuberculosis infected cows have different effects on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* invasion in a calf ileal loop model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 245(January), 110381. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110381>
- Józefowski, S., Sobota, A., & Kwiatkowska, K. (2008). How *Mycobacterium tuberculosis* subverts host immune responses. *BioEssays*, 30(10), 943–954. <https://doi.org/10.1002/bies.20815>
- Ju, H. C., Fraser, I. P., Fukase, K., Kusumoto, S., Fujimoto, Y., Stahl, G. L., & Ezekowitz, R. A. B. (2005). Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood*, 106(7), 2551–2558. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0530>
- Jubb, T. F., Sergeant, E. S. G., Callinan, A. P. L., & Galvin, J. W. (2004). Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*, 82(9), 569–573. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2004.tb11206.x>
- Juste, R. A., Elguezabal, N., Garrido, J. M., Pavon, A., Geijo, M. V., Sevilla, I., Cabriada, J. L., Tejada, A., Garcia-Campos, F., Casado, R., Ochotorena, I., Izeta, A., & Greenstein, R. J. (2008). On the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 3(7), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002537>
- Juste, R. A., Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I. A., & Garrido, J. M. (2009). Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Research Notes*, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-233>

- Juste, R. A., Vazquez, P., Ruiz-Larrañaga, O., Iriondo, M., Manzano, C., Agirre, M., Estonba, A., Geijo, M. V., Molina, E., Sevilla, I. A., Alonso-Hearn, M., Gomez, N., Perez, V., Cortes, A., & Garrido, J. M. (2018). Association between combinations of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis. *Heliyon*, July 2017. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00535>
- Kabara, E., & Coussens, P. M. (2012). Infection of primary bovine macrophages with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* suppresses host cell apoptosis. *Frontiers in Microbiology*, 3(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00215>
- Kaida, D., Berg, M. G., Younis, I., Kasim, M., Singh, L. N., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2010). U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*, 468(7324), 664–668. <https://doi.org/10.1038/nature09479>
- Kakuta, Y., Kawai, Y., Okamoto, D., Takagawa, T., Ikeya, K., Sakuraba, H., Nishida, A., Nakagawa, S., Miura, M., Toyonaga, T., Onodera, K., Shinozaki, M., Ishiguro, Y., Mizuno, S., Takahara, M., Yanai, S., Hokari, R., Nakagawa, T., Araki, H., y col. (2018). NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study. *Journal of Gastroenterology*, 53(9), 1065–1078. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1486-7>
- Kalam, H., Fontana, M. F., & Kumar, D. (2017). Alternate splicing of transcripts shape macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. In *PLoS Pathogens* (Vol. 13, Issue 3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006236>
- Kalam, H., Singh, K., Chauhan, K., Fontana, M. F., & Kumar, D. (2018). Alternate splicing of transcripts upon *Mycobacterium tuberculosis* infection impacts the expression of functional protein domains. *IUBMB Life*, 70(9), 845–854. <https://doi.org/10.1002/iub.1887>
- Karakousis, P. C., Bishal, W. R., & Dorman, S. E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*, 6(2), 105–116. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00351.x>
- Katic, I. (1961). Paratuberculosis (Johne's disease) with special reference to captive wild animals. *Nordisk Veterinary Medicine*, 13, 205–214.
- Kavaliers, M., & Choleris, E. (2018). The role of social cognition in parasite and pathogen avoidance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1751). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0206>
- Khalifeh, M. S., & Stabel, J. R. (2004). Effects of Gamma interferon, Interleukin-10, and Transforming Growth Factor β on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infection and Immunity*, 72(4), 1974–1982. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.1974-1982.2004>
- Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D., & Adams, L. G. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1075–1081. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1075-1081.2004>
- Khol, J. L., Kralik, P., Slana, I., Beran, V., Aurich, C., Baumgartner, W., & Pavlik, I. (2010). Consecutive excretion of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in semen of a breeding bull compared to the distribution in feces, tissue and blood by IS900 and F57 quantitative real-time PCR and culture examinations. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1283–1288. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0052>
- Khol, J.L., & Baumgartner, W. (2012). Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60, 51–57.
- Kim, S. H., Kim, G., Han, D. H., Lee, M., Kim, I., Kim, B., Kim, K. H., Song, Y. M., Yoo, J. E., Wang, H. J., Bae, S. H., Lee, Y. H., Lee, B. W., Kang, E. S., Cha, B. S., & Lee, M. S. (2017). Ezetimibe ameliorates steatohepatitis via AMP activated protein kinase-TFEB-mediated activation of autophagy and NLRP3 inflammasome inhibition. *Autophagy*, 13(10), 1767–1781. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1356977>
- King, D. N., Donohue, M. J., Vesper, S. J., Villegas, E. N., Ware, M. W., Vogel, M. E., Furlong, E. F., Kolpin, D. W., Glassmeyer, S. T., & Pfaller, S. (2016). Microbial pathogens in source and treated waters from drinking water treatment plants in the United States and implications for human health. *Science of the Total Environment*, 562,

7. BIBLIOGRAFÍA

987–995. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.214>

- Kirkpatrick, B. W., Shi, X., Shook, G. E., & Collins, M. T. (2011). Whole-Genome association analysis of susceptibility to paratuberculosis in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 42(2), 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02097.x>
- Kirkwood, B. R., & Sterne, J. A. C. (2010). *Essential Medical Statistics* (2nd ed.).
- Kiser, J. N., Neupane, M., White, S. N., & Neibergs, H. L. (2018). Identification of genes associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Map) tissue infection in Holstein cattle using gene set enrichment analysis–SNP. *Mammalian Genome*, 29(7–8), 539–549. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9725-4>
- Kiser, J. N., Wang, Z., Zanella, R., Scraggs, E., Neupane, M., Cantrell, B., Van Tassell, C. P., White, S. N., Taylor, J. F., & Neibergs, H. L. (2021). Functional variants surrounding endothelin 2 are associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.625323>
- Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*, 30(2), 88–106. <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.660936>
- Klungland, H., Sabry, A., Heringstad, B., Olsen, H. G., Gomez-Raya, L., Våge, D. I., Olsaker, I., Ødegård, J., Klemetsdal, G., Schulman, N., Vilkki, J., Ruane, J., Aasland, M., Rønningen, K., & Lien, S. (2001). Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mammalian Genome*, 12(11), 837–842. <https://doi.org/10.1007/s00335001-2081-3>
- Koets, A. P., Adugna, G., Janss, L. L. G., Van Weering, H. J., Kalis, C. H. J., Wentink, G. H., Rutten, V. P. M. G., & Schukken, Y. H. (2000). Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(11), 2702–2708. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75164-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75164-2)
- Koets, A., Santema, W., Mertens, H., Oostenrijk, D., Keestra, M., Overdijk, M., Labouriau, R., Franken, P., Frijters, A., Nielen, M., & Rutten, V. (2010). Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(4), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.008>
- Kopečna, M., Trcka, I., Lamka, J., Moravkova, M., Koubek, P., Heroldova, M., Mrlik, V., Kralova, A., & Pavlik, I. (2008). The wildlife hosts of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Czech Republic during the years 2002–2007. *Veterinarni Medicina*, 53(8), 420–426. <https://doi.org/10.17221/1931-VETMED>
- Koul, A., Herget, T., Klebl, B., & Ullrich, A. (2004). Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 189–202. <https://doi.org/10.1038/nrmicro840>
- Kralik, P., Babak, V., & Dziedzinska, R. (2014). Repeated cycles of chemical and physical disinfection and their influence on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability measured by propidium monoazide F57 quantitative real time PCR. *Veterinary Journal*, 201(3), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.032>
- Krasilnikov, N. (1941). *Guide to bacteria and actinomycetes* (Akad Nauk SSSR).
- Krishnan, M. Y., Manning, E. J. B., & Collins, M. T. (2009). Effects of interactions of antibacterial drugs with each other and with 6-mercaptopurine on in vitro growth of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(5), 1018–1023. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp339>
- Kumar, S., Kumar, S., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, A., Sulabh, S., Bharati, J., & Singh, S. V. (2019). Genetic association of polymorphisms in bovine TLR2 and TLR4 genes with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Indian cattle population. *Veterinary Research Communications*, 43(2), 105–114. <https://doi.org/10.1007/s11259-019-09750-2>
- Kumar, S., Kumar, S., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, A., Bharati, J., & Singh, S. V. (2020). Association of genetic variability in CD209 gene with bovine paratuberculosis disease: a case–control study in the Indian cattle population. *Animal Biotechnology*, 0(0), 1–8. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1823400>

- Küpper, J. D., Brandt, H. R., & Erhardt, G. (2014). Genetic association between NOD2 polymorphism and infection status by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Animal Genetics*, *45*(1), 114–116. <https://doi.org/10.1111/age.12097>
- Larsen, A. B., Vardaman, D. H., & Groth, A. H. (1950). Preliminary studies on the effect of streptomycin and other agents on *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, *11*(41), 374–377.
- Law, P. J., Timofeeva, M., Fernandez-Rozadilla, C., Broderick, P., Studd, J., Fernandez-Tajes, J., Farrington, S., Svinti, V., Palles, C., Orlando, G., Sud, A., Holroyd, A., Penegar, S., Theodoratou, E., Vaughan-Shaw, P., Campbell, H., Zgaga, L., Hayward, C., Campbell, A., ... Dunlop, M. G. (2019). Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility. *Nature Communications*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09775-w>
- Leach, R. J., Craigmile, S. C., Knott, S. A., Williams, J. L., & Glass, E. J. (2010). Quantitative trait loci for variation in immune response to a Foot-and-Mouth Disease virus peptide. *BMC Genetics*, *11*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-107>
- Leal-Calvo, T., Martins, B. L., Bertoluci, D. F., Rosa, P. S., de Camargo, R. M., Germano, G. V., Brito de Souza, V. N., Pereira Latini, A. C., & Moraes, M. O. (2021). Large-scale gene expression signatures reveal a microbicidal pattern of activation in *Mycobacterium leprae*-infected monocyte-derived macrophages with low multiplicity of infection. *Frontiers in Immunology*, *12*(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.647832>
- Lee, H., Stabel, J. R., & Kehrli, M. E. (2001). Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *82*(1–2), 73–85. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00340-3)
- Lee, M. H., & Surh, Y. J. (2009). eEF1A2 as a putative oncogene. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1171*, 87–93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04909.x>
- Lehman, J. F., & Neumann, R. (1896). Atlas und Grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speziellen bakteriologischen diagnostik (Lehman (ed.); 1st ed.).
- 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>
- Li, Z., Qi, C. F., Shin, D. M., Zingone, A., Newbery, H. J., Kovalchuk, A. L., Abbott, C. M., & Morse, H. C. (2010). Eef1a2 promotes cell growth, inhibits apoptosis and activates JAK/STAT and AKT signaling in mouse plasmacytomas. *PLoS ONE*, *5*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010755>
- Liang, G., Malmuthuge, N., Guan, Y., Ren, Y., Griebel, P. J., & Guan, L. L. (2016). Altered microRNA expression and pre-mRNA splicing events reveal new mechanisms associated with early stage *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Scientific Reports*, *6*(September 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24964>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, *41*(10). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>
- Lin, J., Zhao, D., Wang, J., Wang, Y., Li, H., Yin, X., Yang, L., & Zhou, X. (2015). Transcriptome changes upon in vitro challenge with *Mycobacterium bovis* in monocyte-derived macrophages from bovine tuberculosis-infected and healthy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *163*(3–4), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.12.001>
- Lisle, G., Yates, G. F., Cavaignac, S. M., Collins, D. M., & Paterson, B. M. (2003). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feral ferrets – a potential reservoir of Johne’s disease. *Proceedings of the Seventh International Colloquium on Paratuberculosis*, 361–362.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted*

7. BIBLIOGRAFÍA

Therapy, 2(April). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

- Liu, X., Feng, Z., Harris, N. B., Cirillo, J. D., Bercovier, H., & Barletta, R. G. (2001). Identification of a secreted superoxide dismutase in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 233–238. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00325-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00325-1)
- Liu, X., Lu, R., Wu, S., Zhang, Y. G., Xia, Y., Sartor, R. B., & Sun, J. (2012). Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(3), 418–429. <https://doi.org/10.1002/ibd.21788>
- Lloyd, J. B., Whittington, R. J., Fitzgibbon, C., & Dobson, R. (2001). Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. *Veterinary Record*, 148(9), 261–263. <https://doi.org/10.1136/vr.148.9.261>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Loehle, C. (1995). Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. *Ecology*, 76(2), 326–335. <https://doi.org/10.2307/1941192>
- Loh, P. R., Palamara, P. F., & Price, A. L. (2016). Fast and accurate long-range phasing in a UK Biobank cohort. *Nature Genetics*, 48(7), 811–816. <https://doi.org/10.1038/ng.3571>
- Lombard, J. E., Gardner, I. A., Jafarzadeh, S. R., Fossler, C. P., Harris, B., Capsel, R. T., Wagner, B. A., & Johnson, W. O. (2013). Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 108(2–3), 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.08.006>
- Loret, J. F., & Dumoutier, N. (2019). Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems: A review of prevalence data and control means. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(4), 628–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.01.002>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lund, M. S., Guldbrandtsen, B., Buitenhuis, A. J., Thomsen, B., & Bendixen, C. (2008). Detection of quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 4028–4036. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0290>
- Luppi, F., Longo, A. M., de Boer, W. I., Rabe, K. F., & Hiemstra, P. S. (2007). Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer*, 56(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.11.014>
- Ma, B., Zhu, J., Su, J., Pan, F., Ji, Y., Luan, L., Huang, J., & Hou, Y. (2020). The role of GPR110 in lung cancer progression. *Annals of Translational Medicine*, 8(12), 745–745. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3146>
- Machackova, M., Svastova, P., Lamka, J., Parmova, I., Liska, V., Smolik, J., Fischer, O. A., & Pavlik, I. (2004). Paratuberculosis in farmed and free-living wild ruminants in the Czech Republic (1999-2001). *Veterinary Microbiology*, 101(4), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.04.001>
- Majumdar, D., Tiernan, J. P., Lobo, A. J., Evans, C. A., & Corfe, B. M. (2012). Keratins in colorectal epithelial function and disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 93(5), 305–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00830.x>
- Mallikarjunappa, S., Adnane, M., Cormican, P., Karrow, N. A., & Meade, K. (2018a). Characterization of the bovine salivary gland transcriptome associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* experimental challenge. *BMC genomics*, 20, 491.
- Mallikarjunappa, S., Sargolzaei, M., Brito, L. F., Meade, K. G., Karrow, N. A., & Pant, S. D. (2018b). Short communication: Uncovering quantitative trait loci associated with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using a high-density single nucleotide polymorphism panel. *Journal*

of Dairy Science, 101(8), 7280–7286. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14388>

- Mallikarjunappa, S., Schenkel, F. S., Brito, L. F., Bissonnette, N., Miglior, F., Chesnais, J., Lohuis, M., Meade, K. G., & Karrow, N. A. (2020). Association of genetic polymorphisms related to Johne's disease with estimated breeding values of Holstein sires for milk ELISA test scores. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02381-9>
- Mallikarjunappa, S., Brito, L. F., Pant, S. D., Schenkel, F. S., Meade, K. G., & Karrow, N. A. (2021). Johne's Disease in sairy cattle: An immunogenetic perspective. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.718987>
- Malvisi, M., Palazzo, F., Morandi, N., Lazzari, B., Williams, J. L., Pagnacco, G., & Minozzi, G. (2016). Responses of bovine innate immunity to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection revealed by changes in gene expression and levels of MicroRNA. *PLoS ONE*, 11(10), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164461>
- Malvisi, M., Curti, N., Remondini, D., De Iorio, M. G., Palazzo, F., Gandini, G., Vitali, S., Polli, M., Williams, J. L., & Minozzi, G. (2020). Combinatorial discriminant analysis applied to RNAseq data reveals a set of 10 transcripts as signatures of exposure of cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Animals*, 10(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani10020253>
- Manrique, W. G., Claudianoda, G. S., DeCastro, M. P., Petrillo, T. R., Figueiredo, M. A. P., De Andrade Belo, M. A., Berdeal, M. I. Q., De Moraes, J. E. R., & De Moraes, F. R. (2015). Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* model. *PLoS ONE*, 10(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121625>
- Mapholi, N. O., Maiwashe, A., Matika, O., Riggio, V., Bishop, S. C., MacNeil, M. D., Banga, C., Taylor, J. F., & Dzama, K. (2016). Genome-wide association study of tick resistance in South African Nguni cattle. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(3), 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.005>
- Marete, A., Ariel, O., Ibeagha-Awemu, E., & Bissonnette, N. (2021). Identification of long non-coding RNA isolated from naturally infected macrophages and associated with bovine Johne's disease in canadian Holstein using a combination of neural networks and logistic regression. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(April). <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.639053>
- Marino, R., Capoferri, R., Panelli, S., Minozzi, G., Strozzi, F., Trevisi, E., Snel, G. G. M., Ajmone-Marsan, P., & Williams, J. L. (2017). Johne's disease in cattle: an in vitro model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. *Molecular Immunology*, 91(April), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.08.017>
- Marino, S., El-Kebir, M., & Kirschner, D. (2011). A hybrid multi-compartment model of granuloma formation and T cell priming in Tuberculosis. *Journal of Theoretical Biology*, 280(1), 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.03.022>
- Massone, C., Belachew, W. A., & Schettini, A. (2015). Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clinics in Dermatology*, 33(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.003>
- Matos, A. C., Figueira, L., Martins, M. H., Matos, M., Álvares, S., Pinto, M. L., & Coelho, A. C. (2013). Disseminated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in two wild eurasian otters (*lutra lutra l.*) from Portugal. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(1), 193–195. <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.193>
- Matthews, P. R., & Sargent, A. (1977). The isolation of Mycobacteria from the brown hare (*Lepus europaeus*). *The British Veterinary Journal*, 133(4), 399–404. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)34041-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)34041-1)
- McAloon, C. G., Whyte, P., More, S. J., Green, M. J., O'Grady, L., Garcia, A., & Doherty, M. L. (2015). The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1449–1460. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10156>
- McAloon, C. G., Doherty, M. L., Donlon, J., Lorenz, I., Meade, J., O'Grady, L., & Whyte, P. (2016). Microbiological contamination of colostrum on Irish dairy farms. *Veterinary Record*, 178(19), 474. <https://doi.org/10.1136/vr.103641>
- McClure, H. M., Chiodini, R. J., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Thayer, W. R., & Coutu, J. A. (1987).

7. BIBLIOGRAFÍA

- Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca Arctoides*). *Journal of Infectious Diseases*, 155(5), 1011–1019. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.1011>
- McGovern, S. P., Purfield, D. C., Ring, S. C., Carthy, T. R., Graham, D. A., & Berry, D. P. (2019). Candidate genes associated with the heritable humoral response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cows have factors in common with gastrointestinal diseases in humans. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4249–4263. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15906>
- McNeil, M. R., & Brennan, P. J. (1991). Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Research in Microbiology*, 142(4), 451–463. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90120-Y](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90120-Y)
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, 335(6071), 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>
- Merkal, R. S., & Larsen, A. B. (1973). Clofazimine treatment of cows naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res*, 34(1), 8–27.
- Merkal, R. S., & Curran, B. J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology*, 28(2), 276–279. <https://doi.org/10.1128/am.28.2.276-279.1974>
- Merkal, R. S., Larsen, A. B., & Booth, G. D. (1975). Analysis of the effect of inapparent bovine paratuberculosis. *Am J Vet Res*, 36(6), 837–838.
- Middleton, S., Steinbach, S., Coad, M., McGill, K., Brady, C., Duignan, A., Wiseman, J., Gormley, E., Jones, G. J., & Vordermeier, H. M. (2021). A molecularly defined skin test reagent for the diagnosis of bovine tuberculosis compatible with vaccination against Johne's Disease. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82434-7>
- Miller, D., Brinkworth, M., & Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 139(2), 287–301. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0281>
- Milner, A. R., Lepper, A. W., Symonds, W. N., & Gruner, E. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M phlei*. *Research in Veterinary Science*, 42(2), 140–144. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)30675-1](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30675-1)
- Minozzi, G., Buggiotti, L., Stella, A., Strozzi, F., Luini, M., & Williams, J. L. (2010). Genetic loci involved in antibody response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cattle. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011117>
- Minozzi, G., Williams, J. L., Stella, A., Strozzi, F., Luini, M., Settles, M. L., Taylor, J. F., Whitlock, R. H., Zanella, R., & Neiberghs, H. L. (2012). Meta-analysis of two genome-wide association studies of bovine paratuberculosis. *PLoS ONE*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032578>
- Momotani, E., Whipple, D. L., Thiermann, A. B., & Cheville, N. F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of Ileal Peyer's Patches in calves. *Veterinary Pathology*, 25(2), 131–137. <https://doi.org/10.1177/030098588802500205>
- Mucha, R., Bhide, M. R., Chakurkar, E. B., Novak, M., & Mikula, I. (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.12.007>
- Münster, P., Völkel, I., Wemheuer, W., Schwarz, D., Döring, S., & Czerny, C. P. (2013). A longitudinal study to characterize the distribution patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in semen, blood and faeces of a naturally infected bull by IS 900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(2), 175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01336.x>
- Mura, M., Bull, T. J., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., McMinn, L., Rhodes, G., Pickup, R., & Hermon-Taylor, J. (2006). Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 854–859.

<https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.854-859.2006>

- Naito, T., Yokoyama, N., Kakuta, Y., Ueno, K., Kawai, Y., Onodera, M., Moroi, R., Kuroha, M., Kanazawa, Y., Kimura, T., Shiga, H., Endo, K., Nagasaki, M., Masamune, A., Kinouchi, Y., & Shimosegawa, T. (2018). Clinical and genetic risk factors for decreased bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 33(11), 1873–1881. <https://doi.org/10.1111/jgh.14149>
- Nakato, M., Shiranaga, N., Tomioka, M., Watanabe, H., Kurisu, J., Kengaku, M., Komura, N., Ando, H., Kimura, Y., Kioka, N., & Ueda, K. (2021). ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100166. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015997>
- Naser, S. A., Schwartz, D., & Shafran, I. (2000). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients [6]. *American Journal of Gastroenterology*, 95(4), 1094–1095. [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(00\)00746-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(00)00746-2)
- Naser, S. A., Thanigachalam, S., Dow, C. T., & Collins, M. T. (2013). Exploring the role of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: A pilot study. *Gut Pathogens*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-14>
- Neiberghs, H., Zanella, R., Casas, E., Snowden, G. D., Wenz, J., Neiberghs, J. S., & Moore, D. (2011). Loci on *Bos taurus* chromosome 2 and *Bos taurus* chromosome 26 are linked with bovine respiratory disease and associated with persistent infection of bovine viral diarrhea virus. *Journal of Animal Science*, 89(4), 907–915. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3330>
- 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>
- Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: The most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays*, 25(12), 1147–1149. <https://doi.org/10.1002/bies.10394>
- Nugent, G., Whitford, E. J., Hunnam, J. C., Wilson, P. R., Cross, M. L., & de Lisle, G. W. (2011). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in wildlife on three deer farms with a history of Johne's disease. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(6), 293–298. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.605747>
- O'Brien R, Mackintosh, C. G., & Griffin, J. F. T. (2020). Paratuberculosis in Deer, Camelids and Other Ruminants. In *Paratuberculosis Org. Dis. Control*, (pp. 188–199).
- OIE. (2018). Terrestrial manual. (p. 2.1.11).
- OIE. (2021). Código Sanitario para los Animales Terrestres.
- Oliveira, H. R., Cant, J. P., Brito, L. F., Feitosa, F. L. B., Chud, T. C. S., Fonseca, P. A. S., Jamrozik, J., Silva, F. F., Lourenco, D. A. L., & Schenkel, F. S. (2019). Genome-wide association for milk production traits and somatic cell score in different lactation stages of Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 8159–8174. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16451>
- Orme, I. M., Roberts, A. D., Griffin, J. P., & Abrams, J. S. (1993). Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*, 151(1), 518–525.
- Palmer, M. V., Stoffregen, W. C., Carpenter, J. G., & Stabel, J. R. (2005). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 629–635. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.3.629>
- Pant, S. D., Schenkel, F. S., Verschoor, C. P., You, Q., Kelton, D. F., Moore, S. S., & Karrow, N. A. (2010). A principal component regression based genome wide analysis approach reveals the presence of a novel QTL on BTA7 for MAP resistance in holstein cattle. *Genomics*, 95(3), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.01.001>
- Pant, S. D., Verschoor, C. P., Schenkel, F. S., You, Q., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2011a). Bovine PGLYRP1 polymorphisms and their association with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis*. *Animal*

7. BIBLIOGRAFÍA

- Genetics*, 42(4), 354–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02153.x>
- Pant, S. D., Verschoor, C. P., Skelding, A. M., Schenkel, F. S., You, Q., Biggar, G. A., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2011b). Bovine IFNGR2, IL12RB1, IL12RB2, and IL23R polymorphisms and MAP infection status. *Mammalian Genome*, 22(9–10), 583–588. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9332-8>
- Pant, S. D., Verschoor, C. P., Schenkel, F. S., You, Q., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2014). Bovine CLEC7A genetic variants and their association with seropositivity in Johne's disease ELISA. *Gene*, 537(2), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.12.020>
- Park, H. E., Shin, M., Park, H., Jung, M., Cho, Y. Il, & Yoo, H. S. (2016). Gene expression profiles of putative biomarker candidates in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected cattle. *Pathogens and Disease*, December 2015, 3–6. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw022>
- 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>
- Park, H. E., Park, H. T., Jung, Y. H., & Yoo, H. S. (2018). Gene expression profiles of immune-regulatory genes in whole blood of cattle with a subclinical infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS ONE*, 13(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196502>
- Park, H. S., Back, Y. W., Son, Y. J., & Kim, H. J. (2020). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* MAP1889c protein induces maturation of dendritic cells and drives Th2-biased immune responses. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040944>
- Park, K. T., Allen, A. J., & Davis, W. C. (2014). Development of a novel DNA extraction method for identification and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from tissue samples by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 99(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.02.003>
- Pauciullo, A., Küpper, J., Brandt, H., Donat, K., Iannuzzi, L., & Erhardt, G. (2015). Wingless-type MMTV integration site family member 2 (WNT2) gene is associated with resistance to MAP in faecal culture and antibody response in Holstein cattle. *Animal Genetics*, 46(2), 122–132. <https://doi.org/10.1111/age.12261>
- Pavić, K., Perković, I., Pospíšilová, Š., Machado, M., Fontinha, D., Prudêncio, M., Jampilek, J., Coffey, A., Endersen, L., Rimac, H., & Zorc, B. (2018). Primaquine hybrids as promising antimycobacterial and antimalarial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.083>
- Pavlik, I., Bartl, J., Dvorska, L., Svastova, P., Du Maine, R., Machackova, M., Yayo Ayele, W., & Horvathova, A. (2000). Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995–1998. *Veterinary Microbiology*, 77(3–4), 231–251. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00309-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00309-6)
- Peleman, R., Wu, J., Fargeas, C., & Delespesse, G. (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med*, 170(5), 1751–1756.
- Pence, M., Baldwin, C., & Black, C. C. (2003). The seroprevalence of Johne's disease in Georgia beef and dairy cull cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(5), 475–477. <https://doi.org/10.1177/104063870301500514>
- Perez, V., Corpa, J. M., & García Marín, J. F. (2000). El cuadro clínico y lesional de la paratuberculosis bovina. *Bovis. Aula Veterinaria*, 97, 39–47.
- Pérez, V., Moreno, O., Muñoz, M., Gracia-Pariente, C., Benavides, J., Delgado, L., Gonzalez, J., Luis, M., Fuertes, M., Gracia-Marín, J. F., & Ferreras, M. C. (2009). Diagnosis of paratuberculosis in slaughtered calves in the Northwest of Castilla y Leon (Spain) by pathological methods. *Proceedings of the 10 International Colloquium on Paratuberculosis*.
- Picasso-Risso, C., 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>

- Pierce, E. S. (2018). Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colit...and colorectal cancer? *Infectious Agents and Cancer*, 13(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3>
- Pieters, J. (2001). Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes and Infection*, 3(3), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01376-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01376-4)
- Pinedo, P. J., Buergelt, C. D., Donovan, G. A., Melendez, P., Morel, L., Wu, R., Langae, T. Y., & Rae, D. O. (2009). Association between CARD15/NOD2 gene polymorphisms and paratuberculosis infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 134(3–4), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.052>
- Pithua, P., Godden, S. M., Wells, S. J., & Stabel, J. R. (2011). Evaluation of the risk of paratuberculosis in adult cows fed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA-positive or -negative colostrum as calves. *American Journal of Veterinary Research*, 72(11), 1456–1464. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.11.1456>
- Ponnusamy, D., Periasamy, S., Tripathi, B. N., & Pal, A. (2013). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Research in Veterinary Science*, 94(2), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.023>
- Purdie, A. C., Plain, K. M., Begg, D. J., de Silva, K., & Whittington, R. J. (2012). Expression of genes associated with the antigen presentation and processing pathway are consistently regulated in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.007>
- Quist, C. F., Nettles, V. F., Manning, E. J. B., Hall, D. G., Gaydos, J. K., Wilmers, T. J., & Lopez, R. R. (2002). Paratuberculosis in key deer (*Odocoileus Virginianus Clavium*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4), 729–737. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-38.4.729>
- Raizman, E. A., Fetrow, J., Wells, S. J., Godden, S. M., Oakes, M. J., & Vazquez, G. (2007). The association between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fecal shedding or clinical Johne's disease and lactation performance on two Minnesota, USA dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 78(3–4), 179–195. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.10.006>
- Ramakrishnan, L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(5), 352–366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
- Rankin, J. D. (1958). The present knowledge of Johne's disease. *Vet Rec*, 70, 693–697.
- Rasmussen, P., Barkema, H. W., Mason, S., Beaulieu, E., & Hall, D. C. (2021). Economic losses due to Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 3123–3143. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19381>
- Rathnaiah, G., Zinniel, D. K., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Gröhn, Y. T., Collins, M. T., & Barletta, R. G. (2017). Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne's disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(NOV), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>
- Rauw, W. M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E. N. & Grommers, F.J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: A review. (1998). *Livestock Production Science*, 56(1), 15–33. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00147-X)
- Reyes-García, R., Pérez-de-la-Lastra, J. M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Garrido, J. M., & Gortázar, C. (2008). Large-scale ELISA testing of Spanish red deer for paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124(1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.01.032>
- Ricchi, M., Bertasio, C., Boniotti, M. B., Vicari, N., Russo, S., Tilola, M., Bellotti, M. A., & Bertasi, B. (2017). Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01174>
- Richardson, I. W., Berry, D. P., Wiencko, H. L., Higgins, I. M., More, S. J., McClure, J., Lynn, D. J., & Bradley, D. G. (2016). A genome-wide association study for genetic susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23. *Genetics Selection Evolution*, 48(1), 1–13.

7. BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1186/s12711-016-0197-x>

- Ridge, S. E., Harkin, J. T., Badman, R. T., Mellor, A. M., & Larsen, J. W. (1995). Johnes-disease in alpacas (lamapacos) in Australia. *Aust Vet J*, *72*(4), 150–153.
- Riemann, H., Zaman, M. R., Ruppner, R., Aalund, O., Jorgensen, J. B., Worsaae, H., & Behymer, D. (1979). Paratuberculosis in cattle and free-living exotic deer. *J Am Vet Med Assoc*, *174*(8), 841–843.
- Ring, S. C., Purfield, D. C., Good, M., Breslin, P., Ryan, E., Blom, A., Evans, R. D., Doherty, M. L., Bradley, D. G., & Berry, D. P. (2019). Variance components for bovine tuberculosis infection and multi-breed genome-wide association analysis using imputed whole genome sequence data. *PLoS ONE*, *14*(2), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212067>
- Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L., & Potier, M. C. (2007). Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? *Bioinformatics*, *23*(4), 401–407. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl633>
- Roach, D. R., Bean, A. G. D., Demangel, C., France, M. P., Briscoe, H., & Britton, W. J. (2002). TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *The Journal of Immunology*, *168*(9), 4620–4627. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4620>
- Roca, F. J., & Ramakrishnan, L. (2013). TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell*, *153*(3), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.022>
- Rotta, G., Matteoli, G., Mazzini, E., Nuciforo, P., Colombo, M. P., & Rescigno, M. (2008). Contrasting roles of SPARC-related granuloma in bacterial containment and in the induction of anti-*Salmonella typhimurium* immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(3), 657–667. <https://doi.org/10.1084/jem.20071734>
- Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C., & Khochbin, S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reproductive BioMedicine Online*, *16*(4), 492–503. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60456-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60456-7)
- Rowe, M. T., & Grant, I. R. (2006). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. *Letters in Applied Microbiology*, *42*(4), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01873.x>
- Rue-Albrecht, K., Magee, D. A., Killick, K. E., Nalpas, N. C., Gordon, S. V., & MacHugh, D. E. (2014). Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. *Frontiers in Immunology*, *5*(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00536>
- Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Iriondo, M., Manzano, C., Molina, E., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Juste, R. A., & Estonba, A. (2010a). Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*, *41*(6), 652–655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x>
- Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Iriondo, M., Manzano, C., Molina, E., Montes, I., Vazquez, P., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Juste, R. A., & Estonba, A. (2010b). SP110 as a novel susceptibility gene for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *Journal of Dairy Science*, *93*(12), 5950–5958. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3340>
- Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Manzano, C., Iriondo, M., Molina, E., Gil, A., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Juste, R. A., & Estonba, A. (2010c). Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science*, *93*(4), 1713–1721. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2438>
- Ruiz-Larrañaga, O., Manzano, C., Iriondo, M., Garrido, J. M., Molina, E., Vazquez, P., Juste, R. A., & Estonba, A. (2011). Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science*, *94*(7), 3635–3641. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3788>
- Salgado, M., Herthnek, D., Bölske, G., Leiva, S., & Kruze, J. (2009). First isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from wild guanacos (*Lama guanicoe*) on tierra del fuego Island. *Journal of Wildlife Diseases*, *45*(2), 295–301. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.295>
- Sallam, A. M., Zare, Y., Alpay, F., Shook, G. E., Collins, M. T., Alsheikh, S., Sharaby, M., & Kirkpatrick, B. W.

- (2017). An across-breed genome wide association analysis of susceptibility to paratuberculosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 84(1), 61–67. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000807>
- Sallam, A. M., Zare, Y., Shook, G., Collins, M., & Kirkpatrick, B. W. (2018). A positional candidate gene association analysis of susceptibility to paratuberculosis on bovine chromosome 7. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.035>
- Sanchez, M. P., Guatteo, R., Davergne, A., Saout, J., Grohs, C., Deloche, M. C., Taussat, S., Fritz, S., Boussaha, M., Blanquefort, P., Delafosse, A., Joly, A., Schibler, L., Fourichon, C., & Boichard, D. (2020). Identification of the ABCC4, IER3, and CBFA2T2 candidate genes for resistance to paratuberculosis from sequence-based GWAS in Holstein and Normande dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*, 52(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00535-9>
- Sandor, M., Weinstock, J. V., & Wynn, T. A. (2003). Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: A model of local immune responses. *Trends in Immunology*, 24(1), 44–52. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)00006-6)
- Saunders, B. M., & Cooper, A. M. (2000). Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunology and Cell Biology*, 78(4), 334–341. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00933.x>
- Saxegaard, F. & Baess, I. (1988). Relationship between *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium paratuberculosis* and “wood pigeon mycobacteria” Determinations by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 96(1), 37–42.
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schneider, D. S., Ayres, J. S., Brandt, S. M., Costa, A., Dionne, M. S., Gordon, M. D., Mabery, E. M., Moule, M. G., Pham, L. N., & Shirasu-hiza, M. M. (2007). *Drosophila eiger* mutants are sensitive to extracellular pathogens. *Plos Pathogens* 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030041>
- Schulman, N. F., Viitala, S. M., De Koning, D. J., Virta, J., Mäki-Tanila, A., & Vilkki, J. H. (2004). Quantitative trait loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 443–449. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73183-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73183-5)
- Sechi, L. A., Mura, M., Tanda, E., Lissia, A., Fadda, G., & Zanetti, S. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of Crohn’s disease patients. *New Microbiol.*, 27(1), 75–77.
- Secott, T. E., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2002). Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cells by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*, 70(5), 2670–2675. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2670-2675.2002>
- Secott, T. E., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infection and Immunity*, 72(7), 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3724-3732.2004>
- Sergeant, E. S. G., Marshall, D. J., Eamens, G. J., Kearns, C., & Whittington, R. J. (2003). Evaluation of an absorbed ELISA and an agar-gel immuno-diffusion test for ovine paratuberculosis in sheep in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 61(4), 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.010>
- 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(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005478>
- Settles, M., Zanella, R., McKay, S. D., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Whitlock, R., Schukken, Y., Van Kessel, J. S., Smith, J. M., & Neibergs, H. (2009). A whole genome association analysis identifies loci associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection status in US holstein cattle. *Animal Genetics*, 40(5), 655–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01896.x>
- Sevilla, I. A., Aduriz, G., Garrido, J. M., Gejjo, M. V., & Juste, R. A. (2002). A preliminary survey on the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. *7th International Colloquium on Paratuberculosis*.
- Shabalin, A. A. (2012). Matrix eQTL: Ultra fast eQTL analysis via large matrix operations. *Bioinformatics*, 28(10),

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1353–1358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts163>
- Shariati, A., Fallah, F., Pormohammad, A., Taghipour, A., Safari, H., Chirani, A., Sabour, S., Alizadeh-Sani, M., & Azimi, T. (2019). The possible role of bacteria, viruses, and parasites in initiation and exacerbation of irritable bowel syndrome. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(6), 8550–8569. <https://doi.org/10.1002/jcp.27828>
- Sharma, B. S., Abo-Ismael, M. K., Schenkel, F. S., You, Q., Verschoor, C. P., Pant, S. D., & Karrow, N. A. (2015). Association of TLR4 polymorphisms with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection status in Canadian Holsteins. *Animal Genetics*, *46*(5), 560–565. <https://doi.org/10.1111/age.12333>
- Shaughnessy, R. G., Farrell, D., Stojkovic, B., Browne, J. A., Kenny, K., & Gordon, S. V. (2020). Identification of microRNAs in bovine faeces and their potential as biomarkers of Johne's Disease. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62843-w>
- Sheldon, I. M., Cronin, J. G., & Bromfield, J. J. (2019). Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. *Annual Review of Animal Biosciences*, *7*, 361–384. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>
- Sheldon, I. M., Molinari, P. C. C., Ormsby, T. J. R., & Bromfield, J. J. (2020). Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria. *Theriogenology*, *150*, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.017>
- Shephard, R. W., Williams, S. H., & Beckett, S. D. (2016). Farm economic impacts of bovine Johne's disease in endemically infected Australian dairy herds. *Australian Veterinary Journal*, *94*(7), 232–239. <https://doi.org/10.1111/avj.12455>
- Sherman, D. M. (1985). Current concepts in Johne's disease. *Vet Med*, *80*, 77–84.
- Shinnick, T. M., & Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *13*(11), 884–901. <https://doi.org/10.1007/BF02111489>
- Shukla, S. K., Shukla, S., Chauhan, A., Sarvjeet, Khan, R., Ahuja, A., Singh, L. V., Sharma, N., Prakash, C., Singh, A. V., & Panigrahi, M. (2017). Differential gene expression in *Mycobacterium bovis* challenged monocyte-derived macrophages of cattle. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 113). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.030>
- Sigurardóttir, Ó. G., Press, C. M., & Evensen. (2001). Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: An ultrastructural study. *Veterinary Pathology*, *38*(2), 184–189. <https://doi.org/10.1354/vp.38-2-184>
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, *23*(6), 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.08.010>
- Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., & Lengauer, T. (2005). ROCr: Visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics*, *21*(20), 3940–3941. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti623>
- Sisto, M., Cucci, L., D'Amore, M., Dow, T. C., Mitolo, V., & Lisi, S. (2010). Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto's thyroiditis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, *42*(10), 787–790. <https://doi.org/10.3109/00365541003762306>
- Sivakumar, P., Tripathi, B. N., & Singh, N. (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology*, *108*(3–4), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.002>
- Slocombe, R. F. (1982). Combined streptomycin-isoniazid-rifampin therapy in the treatment of Johne's Disease in a goat. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*, *23*(5), 160–163.
- Smeed, J. A., Watkins, C. A., Rhind, S. M., & Hopkins, J. (2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Veterinary Research*, *3*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-18>
- Smith, R. L., Gröhn, Y. T., Pradhan, A. K., Whitlock, R. H., Van Kessel, J. S., Smith, J. M., Wolfgang, D. R., &

- Schukken, Y. H. (2016). The effects of progressing and nonprogressing *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1383–1390. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9822>
- Snow, G. A. (1970). Mycobactins: iron-chelating growth factors from mycobacteria. *Bacteriological Reviews*, 34(2), 99–125. <https://doi.org/10.1128/mmbr.34.2.99-125.1970>
- Soares, M. P., Teixeira, L., & Moita, L. F. (2017). Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nature Reviews Immunology*, 17(2), 83–96. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.136>
- Soltys, M. A., Andress, C. E., & Fletch, A. L. (1967). Johne's disease in a moose (*Alces alces*). *Bull Wild Dis Assoc*, 3, 183–184.
- Sorge, U. S., Lissemore, K., Godkin, A., Hendrick, S., Wells, S., & Kelton, D. (2011). Associations between paratuberculosis milk ELISA result, milk production, and breed in Canadian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 754–761. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3404>
- Sorge, U. S., Kurnick, S., & Sreevatsan, S. (2013). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the saliva of dairy cows: A pilot study. *Veterinary Microbiology*, 164(3–4), 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.021>
- Souza, C., Davis, W. C., Eckstein, T. M., Sreevatsan, S., & Weiss, D. J. (2013). Mannosylated lipoarabinomannans from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* alters the inflammatory response by bovine macrophages and suppresses killing of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* organisms. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075924>
- Ssekitoleko, J., Ojok, L., Abd, A., Wahed, E., Erume, J., Amanzada, A., Eltayeb, E., Eltom, K. H., & Okuni, J. B. (2021). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Virulence: A Review. 1–16.
- Stabel, J. R. (2000). Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American Journal of Veterinary Research*, 61(7), 754–760. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.754>
- Stabel, J. R. (2006). Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 7(1–2), 61–70. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001168>
- 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>
- Stabel, J. R., Reinhardt, T. A., & Hempel, R. J. (2018). Short communication: Vitamin D status and responses in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1594–1600. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15241>
- Stabel, J. R., Turner, A., & Walker, M. (2020). An eco-friendly decontaminant to kill *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 176, 106001. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106001>
- Stolzenberg, E. D., Anderson, G. M., Ackermann, M. R., Whitlock, R. H., & Zasloff, M. (1997). Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8686–8690. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8686>
- Stott, A. W., Jones, G. M., Humphry, R. W., & Gunn, G. J. (2005). The financial incentive to control paratuberculosis (Johne's disease) on UK dairy farms. *Veterinary Record*, 156(26), 825–831.
- Strlic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U. C., Pasparakis, M., & Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*, 536(7615), 215–218. <https://doi.org/10.1038/nature19076>
- Strillacci, M. G., Frigo, E., Schiavini, F., Samoré, A. B., Canavesi, F., Vevey, M., Cozzi, M. C., Soller, M., Lipkin, E., & Bagnato, A. (2014). Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed

7. BIBLIOGRAFÍA

- using pooled DNA. *BMC Genetics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0106-7>
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J., & Russell, D. G. (1994). Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263(5147), 678–681. <https://doi.org/10.1126/science.8303277>
- Sun, Y., Du, C., Wang, B., Zhang, Y., Liu, X., & Ren, G. (2014). Up-regulation of eEF1A2 promotes proliferation and inhibits apoptosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.045>
- Sung, J. S., & Collins, M. T. (2008). Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 418–426. <https://doi.org/10.1128/AAC.00678-07>
- 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., Whitlock, R. H., & Rosenberger, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 166–171. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.1.166-171.1992>
- Sweeney, R. W. (2011). Pathogenesis of Paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 27(3), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001>
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2017). The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D362–D368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw937>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tanaka, S., Sato, M., Onitsuka, T., Kamata, H., & Yokomizo, Y. (2005). Inflammatory cytokine gene expression in different types of granulomatous lesions during asymptomatic stages of bovine paratuberculosis. *Veterinary Pathology*, 42(5), 579–588. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-579>
- Thirunavukkarasu, S., Plain, K. M., de Silva, K., Begg, D., Whittington, R. J., & Purdie, A. C. (2014). Expression of genes associated with cholesterol and lipid metabolism identified as a novel pathway in the early pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*-infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3–4), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.04.002>
- Thoen, C. O., Richards, W. D., & Jarnagin, J. L. (1977). Mycobacteria isolated from exotic animals. *J Am Vet Med Assoc*, 170(9), 987–990.
- 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*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 254–260. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-3-254>
- Tiezzil, F., Parker-Gaddis, K. L., Cole, J. B., Clay, J. S., & Maltecca, C. (2015). A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS ONE*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114919>
- Tiwari, A., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., & Weersink, A. (2008). Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Canadian Veterinary Journal*, 49(6), 569–576.
- Trapnell, C., Pachter, L., & Salzberg, S. L. (2009). TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), 1105–1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>

- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. L., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3), 562–578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>
- Trimble, W. S., & Grinstein, S. (2007). TB or not TB: Calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell*, 130(1), 12–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.039>
- Tsairidou, S., Allen, A., Banos, G., Coffey, M., Anacleto, O., Byrne, A. W., Skuce, R. A., Glass, E. J., Woolliams, J. A., & Doeschl-Wilson, A. B. (2018). Can we breed cattle for lower bovine TB infectivity? *Frontiers in Veterinary Science*, 5(DEC), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00310>
- Tsuji, S., Yamashita, M., Hoffman, D. R., Nishiyama, A., Shinohara, T., Ohtsu, T., & Shibata, Y. (2009). Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology*, 19(5), 518–526. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp013>
- Twort, F., & Ingram, G. (1912). A Method for Isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc R soc Lond B Biol Sci*; (84), 517–542.
- Vaerewijck, M. J. M., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J., & Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: Ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 911–934. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.02.001>
- Vallimont, J. E., Dechow, C. D., Sattler, C. G., & Clay, J. S. (2009). Heritability estimates associated with alternative definitions of mastitis and correlations with somatic cell score and yield. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3402–3410. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1229>
- van den Esker, M. H., & Koets, A. P. (2019). Application of transcriptomics to enhance early diagnostics of mycobacterial infections, with an emphasis on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary Sciences*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/VETSCI6030059>
- van Hulzen, K. J. E., Schopen, G. C. B., van Arendonk, J. A. M., Nielen, M., Koets, A. P., Schrooten, C., & Heuven, H. C. M. (2012). Genome-wide association study to identify chromosomal regions associated with antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2740–2748. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5005>
- VanRaden, P. M., & Sullivan, P. G. (2010). International genomic evaluation methods for dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*, 42(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-7>
- Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., & Portaels, F. (2004). Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 100(3–4), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.006>
- Varela-Castro, L., Torrontegi, O., Sevilla, I. A., & Barral, M. (2020). Detection of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) carrying non-tuberculous mycobacteria able to infect cattle and interfere with the diagnosis of bovine tuberculosis. *Microorganisms*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030374>
- Vázquez, P., Garrido, J. M., & Juste, R. A. (2013). Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064568>
- Vázquez, P. (2014a). Latencia y patencia en la paratuberculosis bovina, relación con marcadores genéticos y aspectos de salud pública y control. Universidad de Zaragoza.
- Vázquez, P., Ruiz-Larrañaga, O., Garrido, J. M., Iriondo, M., Manzano, C., Agirre, M., Estonba, A., & Juste, R. A. (2014b). Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian cattle. *Veterinary Medicine International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/321327>
- Verschoor, C. P., Pant, S. D., You, Q., Schenkel, F. S., Kelton, D. F., & Karrow, N. A. (2010). Polymorphisms in the gene encoding bovine interleukin-10 receptor alpha are associated with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection status. *BMC Genetics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-23>

7. BIBLIOGRAFÍA

- Verteramo Chiu, L. J., Tauer, L. W., Al-Mamun, M. A., Kaniyamattam, K., Smith, R. L., & Grohn, Y. T. (2018). An agent-based model evaluation of economic control strategies for paratuberculosis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*, *101*(7), 6443–6454. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13175>
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: Design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, *136*(4), 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Wang, S., Diao, N., Lu, C., Wu, J., Gao, Y., Chen, J., Zhou, Z., Huang, H., Shao, L., Jin, J., Weng, X., Zhang, Y., & Zhang, W. (2012). Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-Vaccinated population. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051338>
- Wang, Y., Yang, Y., Li, H., Liang, Y., Liu, J., Xu, T., & Wu, X. (2016). Evaluation of a whole blood chemiluminescent immunoassay of interferon-gamma inducible protein 10 (IP-10) for diagnosis of tuberculosis patients. *Clin Lab*, *62*(1–2), 165–172.
- Wang, Z., Sun, Y., Fu, X., Yu, G., Wang, C., Bao, F., Yue, Z., Li, J., Sun, L., Irwanto, A., Yu, Y., Chen, M., Mi, Z., Wang, H., Huai, P., Li, Y., Du, T., Yu, W., Xia, Y., y col. (2016). A large-scale genome-wide association and meta-analysis identified four novel susceptibility loci for leprosy. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13760>
- Wayne, L., & Kubika, G. (1986). Family *Mycobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Weiss, D. J., Evanson, O. A., Deng, M., & Abrahamsen, M. S. (2004). Gene expression and antimicrobial activity of bovine macrophages in response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, *41*(4), 326–337. <https://doi.org/10.1354/vp.41-4-326>
- Weiss, D. J., & Souza, C. D. (2008). REVIEW PAPER: Modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Pathology*, *45*(6), 829–841. <https://doi.org/10.1354/vp.45-6-829>
- Weiss, Douglas J., Souza, C. D., Evanson, O. A., Sanders, M., & Rutherford, M. (2008). Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(1), 48–55. <https://doi.org/10.1189/jlb.0707490>
- Westra, H. J., & Franke, L. (2014). From genome to function by studying eQTLs. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(10), 1896–1902. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.024>
- Whan, L., Grant, I. R., & Rowe, M. T. (2006). Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiology*, *6*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-63>
- White, C. I., Birtles, R. J., Wigley, P., & Jones, P. H. (2010). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Veterinary Record*, *166*(13), 401–402. <https://doi.org/10.1136/vr.b4797>
- Whitlock, R. H., & Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *12*(2), 345–356. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30410-2)
- 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)
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(5), 2989–3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004>
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., & Reddacliff, L. A. (2005). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5304–5308. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5304-5308.2005>

- Whittington, R. J., & Windsor, P. A. (2009). In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Veterinary Journal*, 179(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.023>
- 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., y col. (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. (2020). Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In *Paratuberculosis: organism, disease, control* (pp. 279–304).
- Williams, E. S., Spraker, T. R., & Schoonveld, G. G. (1979). Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a Rocky Mountain goat in Colorado. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(2), 221–227. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-15.2.221>
- Windsor, P. A., & Whittington, R. J. (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Veterinary Journal*, 184(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.01.007>
- Wittkopp, P. J. (2005). Genomic sources of regulatory variation in cis and in trans. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1779–1783. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5064-9>
- Wojdak-Maksymiec, K., Szyda, J., & Strabel, T. (2013). Parity-dependent association between TNF- α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Veterinary Research*, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-114>
- Wong, S. Y. Y., Grant, I. R., Friedman, M., Elliott, C. T., & Situ, C. (2008). Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5986–5990. <https://doi.org/10.1128/AEM.00981-08>
- Woo, S. R., Barletta, R. G., & Czuprynski, C. J. (2009). ATP release by infected bovine monocytes increases the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(5), 365–377. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.003>
- Wright, K., Plain, K., Purdie, A., Saunders, B. M., & De Silva, K. (2020). Biomarkers for detecting resilience against mycobacterial disease in animals. *Infection and Immunity*, 88(1). <https://doi.org/10.1128/IAI.00401-19>
- Wu, Y., Guo, Z., Yao, K., Miao, Y., Liang, S., Liu, F., Wang, Y., & Zhang, Y. (2016). The transcriptional foundations of sp110-mediated macrophage (RAW264.7) resistance to *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep22041>
- Xing, Y., Zhao, X., & Cai, L. (2011). Prediction of nucleosome occupancy in *Saccharomyces cerevisiae* using position-correlation scoring function. *Genomics*, 98(5), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.008>
- Xu, C., Hu, D. M., & Zhu, Q. (2013). EEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation. *Clinical and Experimental Metastasis*, 30(7), 933–944. <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9593-6>
- Xu, D., Guo, R., Sobeck, A., Bachrati, C. Z., Yang, J., Enomoto, T., Brown, G. W., Hoatlin, M. E., Hickson, I. D., & Wang, W. (2008). RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes and Development*, 22(20), 2843–2855. <https://doi.org/10.1101/gad.1708608>
- Xu, X., Woo, C.-H., Steere, R. R., Lee, B. C., Huang, Y., Wu, J., Pang, J., Lim, J. H., Xu, H., Zhang, W., Konduru, A. S., Yan, C., Cheeseman, M. T., Brown, S. D. M., & Li, J.-D. (2012). EVI1 Acts as an Inducible Negative-Feedback Regulator of NF- κ B by Inhibiting p65 Acetylation. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6371–6380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103527>
- Xu, Z., & Jin, B. (2010). A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. *Cellular and Molecular Immunology*, 7(1), 11–19. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.108>

7. BIBLIOGRAFÍA

- Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R. J., Weinberg, K., Rea, T. H., Bloom, B. R., & Modlin, R. L. (1991). Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, *254*(5029), 277–279. <https://doi.org/10.1126/science.1925582>
- Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2011a). GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics*, *88*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011>
- Yang, J., Manolio, T. A., Pasquale, L. R., Boerwinkle, E., Caporaso, N., Cunningham, J. M., De Andrade, M., Feenstra, B., Feingold, E., Hayes, M. G., Hill, W. G., Landi, M. T., Alonso, A., Lettre, G., Lin, P., Ling, H., Lowe, W., Mathias, R. A., Melbye, M., y col. (2011b). Genome partitioning of genetic variation for complex traits using common SNPs. *Nature Genetics*, *43*(6), 519–525. <https://doi.org/10.1038/ng.823>
- Yau, A. C. Y., Piehl, F., & Olsson, T. (2016). Effects of C2ta genetic polymorphisms on MHC class II expression and autoimmune diseases. *Immunology*, *150*; 408–417 <https://doi.org/10.1111/imm.12692>
- Yoshimi, A., & Kurokawa, M. (2011). Evi1 forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways. *Oncotarget*, *2*(7), 575–586.
- You, Q., Verschoor, C. P., Pant, S. D., Macri, J., Kirby, G. M., & Karrow, N. A. (2012). Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). *Vet Immunol Immunopathology*, *148*(3–4), 243–251.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias GSeq is a method for GO analysis of RNA-seq data that takes into account the length bias inherent in RNA-seq. *Genome Biology*, *11*. <http://genomebiology.com/2010/11/2/R14>
- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, *16*(5), 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Zanella, R., Settles, M. L., McKay, S. D., Schnabel, R., Taylor, J., Whitlock, R. H., Schukken, Y., Van Kessel, J. S., Smith, J. M., & Neibergs, H. L. (2011). Identification of loci associated with tolerance to Johne's disease in Holstein cattle. *Animal Genetics*, *42*(1), 28–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02076.x>
- Zare, Y., Shook, G. E., Collins, M. T., & Kirkpatrick, B. W. (2014). Genome-wide association analysis and genomic prediction of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in US Jersey cattle. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088380>
- Zhang, X., Yin, M., & Zhang, L. J. (2019). Keratin 6, 16 and 17-critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis. *Cells*, *8*(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells8080807>
- Zhao, B., Collins, M. T., & Czuprynski, C. J. (1997). Effects of gamma interferon and nitric oxide on the interaction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with bovine monocytes. *Infection and Immunity*, *65*(5), 1761–1766. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1761-1766.1997>
- Zhu, Z., Zhang, F., Hu, H., Bakshi, A., Robinson, M. R., Powell, J. E., Montgomery, G. W., Goddard, M. E., Wray, N. R., Visscher, P. M., & Yang, J. (2016). Integration of summary data from GWAS and eQTL studies predicts complex trait gene targets. *Nature Genetics*, *48*(5), 481–487. <https://doi.org/10.1038/ng.3538>
- Zimpel, C. K., Patané, J. S. L., Guedes, A. C. P., de Souza, R. F., Silva-Pereira, T. T., Camargo, N. C. S., de Souza Filho, A. F., Ikuta, C. Y., Neto, J. S. F., Setubal, J. C., Heinemann, M. B., & Guimaraes, A. M. S. (2020). Global distribution and evolution of *Mycobacterium bovis* lineages. *Frontiers in Microbiology*, *11*(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00843>
- Zwald, N. R., Weigel, K. A., Chang, Y. M., Welper, R. D., & Clay, J. S. (2010). Genetic analysis of clinical mastitis data from on-farm management software using threshold models. *Journal of Dairy Science*, *89*(1), 330–336. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72098-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72098-7)
- Zwick, L. S., Walsh, T. F., Barbiere, R., Collins, M. T., Kinsel, M. J., & Murnane, R. D. (2002). Paratuberculosis in a Mandrill (*Papio Sphinx*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *14*(4), 326–328. <https://doi.org/10.1177/104063870201400409>

SECCIÓN II: CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1.- El análisis transcriptómico realizado mediante RNA-Seq con objeto de comparar los cambios de expresión génica que tienen lugar en la válvula ileocecal y sangre periférica de animales con lesiones focales y difusas en relación a los animales sin lesiones, proporcionó información valiosa sobre la respuesta del hospedador a una infección natural con MAP, y permitió identificar genes, procesos biológicos, rutas metabólicas y redes de proteínas desregulados en animales con lesiones focales y difusas que no habían sido previamente descritos; como, por ejemplo, la inhibición de la vía de señalización CXCL8/IL8.

2.- A partir de los resultados obtenidos en el estudio de RNA-Seq, se seleccionaron dos genes sobreexpresados en sangre periférica y válvula ileocecal, el transportador de lípidos ABCA13 y el precursor de la intelectina 2, que permitieron el posterior desarrollo y validación de nuevas herramientas para mejorar el diagnóstico de animales subclínicos y con lesiones focales difícilmente detectables con los métodos diagnósticos tradicionales.

3.- La integración de los niveles de expresión génica obtenidos mediante RNA-Seq con datos de genotipado permitió determinar que el genotipo heterocigoto en el SNP regulador rs43744169 (T/C) se asociaba con una sobreexpresión del gen *MECOM*, resultados positivos a los test de ELISA, PCR y cultivo bacteriológico, con mayores niveles de *MECOM* en el plasma de animales infectados con MAP, con una mayor supervivencia intracelular de MAP en ensayos *ex vivo* llevados a cabo con macrófagos bovinos y con una mayor riesgo de progresión a PTB clínica. Nuestros resultados sugieren que la presencia del alelo menor en el *cis*-eQTL regulador de la expresión del gen *MECOM*, un regulador transcripcional de la respuesta inflamatoria mediada por *NF-κβ*, podría causar una respuesta inflamatoria progresiva que exacerbaría el daño tisular en los animales infectados por MAP.

4.- La combinación de los resultados de ELISA para la detección de respuesta humoral frente a la infección por MAP y de PCR y cultivo bacteriológico para la detección de MAP en tejidos intestinales, junto con el uso de datos de imputación a secuencia completa, mejoró las estimas de heredabilidad siendo de 0,139 para la combinación de ELISA-PCR-Cultivo. Este estudio permitió validar algunas asociaciones genéticas previamente descritas e identificar nuevos SNPs, QTLs y genes candidatos asociados con la respuesta humoral a la infección por MAP y con la detección de MAP en tejido intestinal.

CONCLUSIONES

5.- El estudio de asociación genética llevado a cabo empleando secuencias imputadas a genoma completo y la presencia o ausencia de lesiones histopatológicas asociadas a la PTB permitió identificar un total de 129 y 92 SNPs asociados ($P \leq 5 \times 10^{-7}$) con la presencia de lesiones multifocales ($h^2 = 0,075$) y difusas ($h^2 = 0,189$), respectivamente. No se encontraron SNPs comunes asociados a ambos tipos de formas lesionales lo que sugiere que puedan ser indicativas de mecanismos divergentes. Asimismo se identificaron genes candidatos implicados en el proceso de queratinización asociados a los animales con lesiones multifocales, mientras que en los animales con lesiones difusas se identificaron genes candidatos relacionados con el metabolismo del colesterol que pudieron ser confirmados funcionalmente al detectarse niveles más bajos de colesterol en el plasma de animales con lesiones difusas en relación a los animales con otro tipo de lesión o sin lesión.

6.- El estudio de asociación genética a genoma completo permitió identificar un total de 40 SNPs ($P < 5 \times 10^{-7}$) que definieron 9 QTLs y 98 genes candidatos asociados a los animales tolerantes a la PTB con resultado positivo a PCR y cultivo bacteriológico de MAP pero sin lesiones en tejidos intestinales y linfonodos asociados. La estima de heredabilidad para la tolerancia a la PTB fue alta ($h^2 = 0,55$) y el análisis de enriquecimiento funcional utilizando los genes candidatos identificados permitió definir un perfil inmunogenético específico en los animales tolerantes, diseñado para reparar daños en el DNA, controlar la carga bacteriana, modular la inflamación, limitar el daño tisular, y favorecer la reparación de tejidos,

7.- En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral proporcionan información nueva y global acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la susceptibilidad a la infección por MAP y a la tolerancia a la PTB con aplicaciones en el diagnóstico y control de la enfermedad. Los SNPs identificados podrían ser integrados en los programas de selección de ganado bovino asistidos por marcadores con el objetivo de seleccionar animales menos susceptibles a la infección y más tolerantes a la PTB, y probablemente también a otras enfermedades, lo que reduciría los costes económicos de las explotaciones y minimizaría el uso de agentes antimicrobianos.

SECCIÓN III: ANEXOS

ESTUDIO I

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

Alonso-Hearn M, **Canive M**, Blanco-Vázquez C, Torremocha R, Balseiro A, Amado J, Varela-Martinez E, Ramos R, Jugo BM, Casais R

Scientific Reports, 2019, 9(1):14845.

Índice de impacto: 3,990

Área: Multidisciplinar

Cuartil: Q1

OPEN

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

Marta Alonso-Hearn¹, Maria Canive¹, Cristina Blanco-Vazquez², Rosana Torremocha³, Ana Balseiro², Javier Amado⁴, Endika Varela-Martinez⁵, Ricardo Ramos³, Begoña M. Jugo⁵ & Rosa Casais²

Paratuberculosis is chronic granulomatous enteritis of ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Whole RNA-sequencing (RNA-Seq) is a promising source of novel biomarkers for early MAP infection and disease progression in cattle. Since the blood transcriptome is widely used as a source of biomarkers, we analyzed whether it recapitulates, at least in part, the transcriptome of the ileocecal valve (ICV), the primary site of MAP colonization. Total RNA was prepared from peripheral blood (PB) and ICV samples, and RNA-Seq was used to compare gene expression between animals with focal or diffuse histopathological lesions in gut tissues versus control animals with no detectable signs of infection. Our results demonstrated both shared, and PB and ICV-specific gene expression in response to a natural MAP infection. As expected, the number of differentially expressed (DE) genes was larger in the ICV than in the PB samples. Among the DE genes in the PB and ICV samples, there were some common genes irrespective of the type of lesion including the *C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8/IL8)*, *apolipoprotein L (APOLD1)*, and the *interferon inducible protein 27 (IFI27)*. The biological processes (BP) enriched in the PB gene expression profiles from the cows with diffuse lesions included the killing of cells of other organism, defense response, immune response and the regulation of neutrophil chemotaxis. Two of these BP, the defense and immune response, were also enriched in the ICV from the cows with diffuse lesions. Metabolic analysis of the DE genes revealed that the N-glycan biosynthesis, bile secretion, one-carbon pool by folate and purine metabolism were significantly enriched in the ICV from the cows with focal lesions. In the ICV from cows with diffuse lesions; the valine, leucine and isoleucine degradation route, purine metabolism, vitamin digestion and absorption and the cholesterol routes were enriched. Some of the identified DE genes, BP and metabolic pathways will be studied further to develop novel diagnostic tools, vaccines and immunotherapeutics.

¹NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Animal Health Department, Derio, Bizkaia, Spain. ²SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Asturias, Spain. ³Scientific Park of Madrid, Genomic Unit, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain. ⁴LSAPA, Animal Health Laboratory of the Principality of Asturias, Department of Microbiology, Gijón, Asturias, Spain. ⁵University of the Basque Country (UPV-EHU), Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Science and Technology, Bilbao, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.-H. (email: malonso@neiker.eus)

Received: 28 June 2019

Accepted: 23 September 2019

Published online: 16 October 2019

Johne's disease or paratuberculosis (PTB) is a chronic granulomatous enteritis of ruminant animals caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Transmission of MAP primarily occurs by the fecal-oral route through the ingestion of MAP contaminated feces, colostrum, or milk. Infection usually occurs within the first months of life of the animal but remains subclinical for an average of 2–5 years. After being ingested, MAP crosses the intestinal mucosa where it is phagocytosed by sub-epithelial macrophages establishing a chronic infection¹. MAP is able to survive and proliferate within phagosomes by inhibiting apoptosis and phagosomal acidification and by preventing presentation of antigens to the immune system². As the infection progresses, the lesions in the intestine and mesenteric lymph nodes become more severe. Rather than localized, the granulomatous infiltrate becomes diffuse disrupting the mucosal structure and function and affecting jejunum and ileum^{3,4}. Although understanding the immunological mechanisms leading to the various outcomes of MAP infection remains problematic, there is no doubt that the interaction of Mycobacteria with the innate immune system plays a central role in the disease pathogenesis⁵.

PTB is responsible for significant economic losses in dairy herds worldwide due to decreased milk production, increased management costs and premature culling from clinical disease^{6–9}. Furthermore, there is some evidence suggesting that MAP infection might be associated with Crohn's disease (CD) in humans¹⁰. Several studies have demonstrated that more than 50% of the dairy cattle herds are positive for MAP antibodies in USA and in Europe and, therefore, bovine PTB can be considered endemic in these areas^{11,12}. Commercial inactivated vaccines against bovine PTB are very successful in reducing MAP presence in feces and tissues and in increasing both milk production and cattle productive life in infected farms^{13,14}. However, PTB vaccination with heat-killed inactivated vaccines is not allowed in most European countries due to its interference with *Mycobacterium bovis* detection tests¹⁵. Therefore, PTB control is currently based on testing and culling plus preventing MAP transmission to susceptible animals using appropriate hygienic-sanitary strategies^{16,17}. However, the efficiency of the control programs based on the "test and cull" policy is strongly conditioned by the sensitivity of the tests used to identify early infections. Presently, fecal culture is considered "the gold standard" test for the ante-mortem diagnosis of MAP infection¹⁸. However, individual fecal culture is expensive and time consuming and only detects advanced infections due to the relatively late onset of fecal shedding during the natural course of MAP infection. In fact, the sensitivity of the fecal culture is 70% in animals with PTB-associated clinical signs, but only 23–29% in animals with subclinical infection, which may shed MAP intermittently and in lower numbers in feces and milk contaminating the environment and infecting other animals¹⁹. Early stage diagnostics such as the *IFN- γ* release assay detects whether a T-cell mediated immune response has been elicited in response to mycobacterial antigens but only reflects MAP exposure, and thus cannot discriminate between individuals with controlled infection from those with subclinical disease²⁰. It is clear that the detection of subclinical infections before the bacterium is shed and transmitted to herd mates and possibly to humans remains a challenge and, therefore, novel tools are needed to detect MAP-infected animals at early stages of the infection.

Transcriptomic profiling is a promising source of novel biomarkers for early MAP infection in cattle, for monitoring the progress of the disease, and for the search of immune markers that can be used in the design of therapeutics and vaccines²¹. RNA-Sequencing (RNA-Seq) gives a quantitative and qualitative view of the transcriptomic profile of the tissues or cells being studied. Previous RNA-Seq analysis examined the transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages (MDM) infected with MAP and revealed putative biomarkers for early infection^{22,23}. To date only one study has used RNA-Seq to examine the transcriptome of ICV samples collected from dairy cows naturally infected with MAP²⁴. Some of the subclinical animals included in this study did not show any specific evidence of MAP infection and no pathways controlling the immune response appeared to be affected in this animal group. The authors concluded that perhaps with deeper sequencing in further experiments, potential biomarkers could be ascertained. Since the peripheral blood (PB) is the most available physiological fluid for the detection of biomarkers, in the current study we examined whether it recapitulates, at least in part, the transcriptome of the ileocecal valve (ICV), the primary site of MAP colonization. For this purpose, RNA-Seq was used to identify host genes differentially expressed (DE) in ICV and PB samples collected from PTB-infected animals with focal or diffuse lesions in gut tissues versus control animals. Gene expression data were interpreted using gene ontology (GO) categories and metabolic pathways containing multiple DE genes. Overall, our study provides insights into how cattle respond to a natural MAP infection in two targets, ICV and PB, and revealed common and unique biological processes activated in animals with early and more advanced PTB-associated lesions.

Results

Summary of the RNA-Seq data. The animals included in our study were tested by multiple diagnostic tests including histopathological analysis of gut tissues, acid-fast stain, specific antibody response to MAP, fecal qPCR and tissue and fecal bacteriological culture. The results of the pre-mortem (at the annual sampling time) and post-mortem (at the time of slaughter) diagnostic tests are showed in Table 1. All control animals ($n = 3$) showed a negative result for all diagnostic tests. Culling of control animals was due to age, accident, and coxofemoral luxation. All the infected cows included in our study had detectable lesions in gut tissues with distinct severity, focal or diffuse. At the slaughter time, the animals with focal lesions in gut tissues ($n = 6$) showed a negative fecal culture result but were fecal PCR positive (1/6), ELISA positive (1/6), and/or had evidence of MAP infection in gut tissues by ZN (1/6), PCR (5/6) and/or bacteriological culture (2/6). None of the animals with focal lesions had a heavy bacterial load (>50 cfu/gr) in feces and tissues and none of them was culled due to paratuberculosis-associated clinical signs. In contrast, the cows with diffuse histopathological lesions in gut tissues ($n = 5$) were culled due to a positive ELISA or PCR result (2/5), or because they showed PTB-associated clinical signs, including low milk production (1/5) or profuse diarrhea and weight loss (2/5). At the slaughter time, all of the cows with diffuse lesions had a positive ZN and ELISA result, a PCR-positive result in feces and tissue samples, and had a positive bacteriological culture from gut tissues. The mean amount of MAP estimated by qPCR in the gut tissues of all the

ID	Histopathological analysis			ELISA (OD)		Fecal PCR		Fecal culture (CFUs)		Gut tissues	
	Microscopic	Macroscopic	ZN	Pre-mortem	At slaughter	Pre-mortem	At slaughter	Pre-mortem	At slaughter	PCR	Culture
1	Negative	No	Neg	Neg (1.26)	Neg (1.93)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Negative	No	Neg	Neg (2.77)	Neg (8.54)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Negative	No	Neg	Neg (8.99)	Neg (2.45)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
4	Focal	No	Neg	ND	Neg (2.71)	ND	Neg	ND	Neg	Pos (0.38)	Neg
5	Focal	No	Neg	Neg (1.00)	Neg (1.03)	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos (7.50)	Low
6	Focal	No	Neg	Neg (4.39)	Neg (5.51)	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos (305.28)	Neg
7	Focal	No	Neg	Neg (4.92)	Neg (0.74)	Pos (0.03)	Neg	Neg	Neg	Pos (12.26)	Neg
8	Focal	No	Neg	Pos (95.85)	Pos (133.17)	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos (70.54)	Medium
9	Multifocal	Yes	Pos	Neg (0.00)	Neg (2.97)	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Diffuse paucibacillary	Yes	Pos	Neg (53.00)	Pos (283.13)	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos (667.65)	Heavy
11	Diffuse intermediate	Yes	Pos	Pos (142.31)	Pos (187.69)	Pos (0.14)	Pos (0.14)	Neg	Neg	Pos (3896.19)	Heavy
12	Diffuse intermediate	Yes	Pos	Pos (174.01)	Pos (241.18)	Pos (7.50)	Pos (114.00)	Neg	Heavy	Pos (104032)	Heavy
13	Diffuse intermediate	Yes	Pos	Neg (32.19)	Pos (288.75)	Pos (1.41)	Pos (39.88)	Neg	Neg	Pos (1572.24)	Low
14	Diffuse multibacillary	Yes	Pos	Pos (286.51)	Pos (255.55)	Pos (11.70)	Pos (2832.00)	Neg	Neg	Pos (173316.00)	Heavy

Table 1. Histopathological analysis, ZN stain, ELISA, PCR and bacteriological culture results from all the animals included in the current study. Neg, Negative; Pos, Positive; ZN, Ziehl-Neelsen; OD, Optical Density; CFU, Colony Forming Units; ND, No Determined. DNA samples with a PCR-positive result using the LSI VetMax Triplex real-time PCR were quantified using the ParaTB Kuantu-VK kit. qPCR results are expressed as MAP DNA copies per gram of feces or tissues $\times 10^2$.

animals with diffuse lesions was >66765 copies of MAP/gr tissue while the mean bacterial load in the gut tissue samples of the animals with focal lesions was <30528 copies of MAP/gr tissue.

RNA-Seq libraries were prepared from PB and ICV of 14 animals within the three categories; with focal or diffuse histopathological lesions in gut tissues and control. Duplicate RNA extractions and corresponding RNA-Seq libraries were generated from PB and ICV samples of five of the 14 cows (ID 2, 6, 8, 11, 12) to check the reproducibility of the RNA-Seq technology. The RNA-Seq data summary for each biological sample and experimental replicate including number of reads per individual RNA-Seq library at each phase of the analysis is provided in Supplementary Table I. All the libraries were sequenced generating an average of 22.31 million raw reads per library with a Phred quality score >30 which is considered a benchmark for quality in next-generation sequencing. Following filtering of reads based on quality score, minimum size of 60 bp and ambiguous base N percentage less than 5%, an average of 21.44 million reads remained. Alignment of the filtered RNA-Seq reads to the *Bos taurus* reference genome yielded mean values per library of 19.96 million reads. From the mapped reads, an average of 5% of the reads mapped to multiple locations in the genome and were excluded for gene expression analysis. A more detailed analysis of the reads mapping to unique locations was obtained using bedtools and featureCounts, two software packages developed for counting reads to genomic features such as upstream and downstream regions of genes, exons, introns and intergenic regions. Analysis of the individual library reads from the PB samples revealed that 57% of the reads aligned to exons, 28% to introns, 3% to intergenic regions, 2% to upstream regions and 10% to downstream regions. In the ICV samples, introns accounted for 24% of reads, exons for 63% of the reads, 2% of the aligned reads mapped intergenic regions, 1% upstream regions and 10% downstream regions.

Analysis of differential gene expression from RNA-Seq data. Although high technical reproducibility has been claimed for the RNA-Seq technology^{25,26}, we performed duplicate RNA extractions and corresponding RNA-Seq library preparations from PB and ICV samples of some of the animals (ID 2, 6, 8, 11, 12). Variations in this experiment could arise from the RNA preparation, fragmentation or priming method, ligation efficiencies, amplification and other variables in the technical steps of library construction and amplification. After performing gene expression analysis as describe in materials and methods, no significant differences were observed between each sample and corresponding replicate which support the reproducibility of gene expression studies using RNA-Seq (Supplementary Fig. 1).

The DE genes (FDR < 0.05) between cows with focal or diffuse histopathological lesions versus control cows are presented as red dots in Fig. 1a. The number of DE genes was higher in the ICV samples than in the PB samples and increased in animals with diffuse histopathological lesions when compared with the group of animals with focal lesions. This was expected since diffuse lesions represent a more advanced stage of the disease. In the PB samples, 109 and 207 genes were DE in the comparisons between animals with focal or diffuse lesions and control cows, respectively (Fig. 1b). Data analysis revealed 51 DE genes that were common in the PB samples regardless of the type of lesion. The transcriptomic analysis of the ICV samples showed that 3189 and 4724 genes were DE in the animals with focal or diffuse lesions when compared with control animals, respectively. Between these two comparisons, 2557 genes were DE in the ICV samples of the MAP-infected cows regardless of the comparison. A total of 19 DE genes were common among the animals with focal lesions regardless of the tested sample, ICV or PB. Similarly, 89 genes appeared DE in the PB and ICV samples of the animals with diffuse lesions.

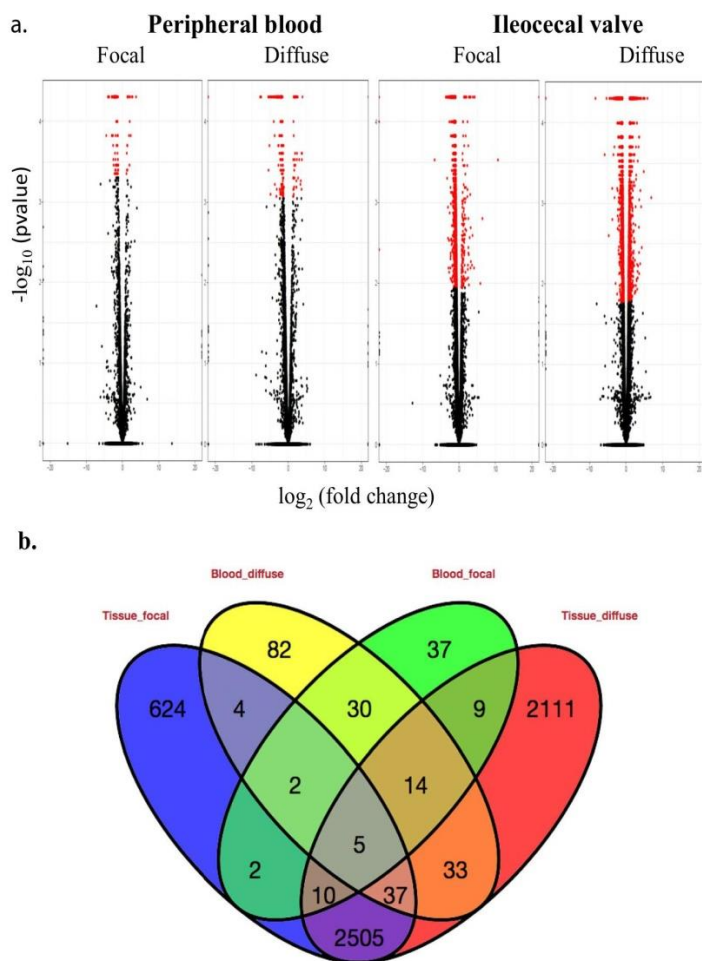


Figure 1. RNA-seq analysis. (a) Volcano plots showing the DE genes (\log_2 fold change) versus $-\log$ (p value) for each comparison. The red spots represent the DE genes in each comparison. (b) Venn diagram showing transcriptional changes between the groups comparisons based on RNA-Seq data.

Gene expression comparison between animals with PTB-associated histopathological lesions versus control cows.

A total of 109 and 207 were DE in the PB samples of the animals with focal or diffuse lesions when compared with the control animals, respectively. Among these DE genes, 21 and 48 were upregulated in each comparison, respectively (Table 2). Table 3 shows the top five upregulated and top-five downregulated genes in the PB samples of the animals with focal lesions versus control samples ranked by fold-change. The top five upregulated genes included the *ATP binding cassette subfamily A member 13 (ABCA13)*, a receptor for class I MHC antigens named *Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6 (LOC618416)* and three still uncharacterized proteins. The top five genes downregulated in the PB samples from the animals with focal lesions versus control cows were: the *C-C motif chemokine ligand 14 (CCL14)*, *Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3)*, *Osteoglycin (OGN)*, *Glycogen phosphorylase muscle associated (PYGM)*, and the *CD5 antigen-like precursor (CD5L)*. Many of the top ranked DE genes have immune-related functions such *LOC618416*, *CD5L* and *CCL14*; being the last two genes downregulated. The *CD5L* is a secreted protein expressed by macrophages in lymphoid and inflamed tissues that acts as a key regulator of lipid synthesis. *CCL14* is a chemotactic factor that attracts T-cells and monocytes, but not neutrophils, eosinophils, or B-cells. Fold change in the downregulated genes ranged from -4.5 to -1.1 , with a mean fold change of -2.0 . For the upregulated genes, the fold change of expression ranged between 3.7 to 1.0 with a mean log fold of 1.7.

RNA-Seq analysis detected 207 DE genes in the PB samples of the cows with diffuse lesions compared to the control group. A total of 48 out of the 207 DE genes were upregulated (mean fold change of 2.1, range between 3.8 to 1.3) and 159 downregulated (mean fold change of -2.3 , range between -1.1 to -7.7). The top five upregulated genes in the PB samples of the animals with diffuse lesions when compared with control animals were: *Two pore channel 3 (TPC3)*, *Creatine kinase M-type (CKM)*, *Desmin (DES)*, *Myosin light chain 2 (MYL2)* and an

Sample	Comparison	DE genes (N)	Up-regulated genes (N)	Down-regulated genes (N)	Comparison specific DE genes (N)	Up-regulated genes (N)	Down-regulated genes (N)
PB	Focal vs Control	109	21	88	37	11	26
PB	Diffuse vs. Control	207	48	159	82	21	61
PB	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	51	6	45	30	4	26
ICV	Focal vs. Control	3189	168	3021	620	68	552
ICV	Diffuse vs. Control	4724	1473	3251	2105	1321	784
ICV	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	2557	96	2446	2505	93	2397
PB, ICV	Focal vs. Control	19	0	18	2	0	2
PB, ICV	Diffuse vs. Control	89	20	49	33	17	12
PB, ICV	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	5	0	4	5	0	4

Table 2. Differentially expressed (DE) genes and specific DE genes for each comparison.

uncharacterized protein (Table 3). The top five downregulated genes in this comparison were: the *Cathelicidins* 3 and 4 (*CATHL3* and *CATHL4*), *CD177* molecule (*CD177*), *C-C motif Chemokine ligand 14* (*CCL14*), and the *Multidrug resistance-associated protein 4-like*. *CATHL3* and *CATHL4* exert a potent antimicrobial activity due to an impairment of the function of the respiratory chain and of energy-dependent activities in the inner membrane of susceptible microorganisms. *CD177* is a neutrophil G-protein-linked surface glycoprotein.

RNA-Seq analysis revealed that 3189 and 4724 genes were dysregulated in the ICV samples from the animals with focal or diffuse lesions versus de control group, respectively (Table 2). The top five upregulated genes in the ICV of cows with focal lesions were the *Intelectin 2* precursor (*ITLN2*), *Cholecystokinin* (*CCK*), *Homeobox B13* (*HOXB13*), *Fatty acid binding protein 6* (*FABP6*) and *Heat shock protein family A member 6* (*HSPA6*). The upregulated genes mean fold change of expression was 1.5 but, in this case there were larger differences in the expression levels between genes, having the most upregulated gene a fold change of 10.6 and the less upregulated one a fold change of 0.6. *CCK* is a peptide hormone that induces gall bladder contraction and release of pancreatic enzymes in the gut. *HOXB3* is a transcriptional factor previously implicated with inflammation. *FABP6* is involved in the gastric acid and pepsinogen secretion and is also required for efficient apical to basolateral transport of conjugated bile acids in ileal enterocytes. The top five downregulated genes were two uncharacterized proteins, the *Duodenase-1-like* with both trypsin-like and chymotrypsin-like activities, *Tumor suppressor candidate 5* (*TUSC5*), and the *Aquaporin 8* (*AQP8*) (Table 3). Mean fold change of the downregulated genes was -1.1 with values ranging between -6.7 and -0.6 .

In the ICV samples, a total of 4724 DE genes were identified in the comparison between the animals with diffuse lesions versus the control group. From these 4724 DE genes, 1473 genes were upregulated and 3251 were downregulated (Table 2). The level of gene expression was similar between the up- and downregulated genes as demonstrated by the \log_2 fold changes. The upregulated genes on average showed a 1.2 fold increase between the cows with diffuse lesions and the control group (range between 6.8 to 0.5), whereas the downregulated genes averaged a -1.2 fold decrease between groups (range between -8.3 to -0.5). The top five upregulated genes included the *Intelectin 2* precursor (*ITLN2*), *Heat shock protein family A member 6* (*HSPA6*), *Immunoglobulin superfamily member 23* (*IGSF23*), *Apolipoprotein B* (*APOB*) and the *Carbamoyl-phosphate synthase 1* (*CPS1*). On the other hand, the top five downregulated genes were the *Lysozyme C milk isozyme 1* (*LYZ1*), *Adiponectin C1Q* (*ADIPOQ*), *Lysozyme C intestinal isozyme* (*LYSB*), *Acyl-CoA synthetase medium chain family member 1* (*ACSM1*) and the *Aquaporin 8* (*AQP8*). Several of the downregulated genes in this comparison such as the *ITLN2*, *LYZ1*, *LYSB* and *ADIPOQ* play important roles in the defense response against pathogens. Lysozymes such as *LYZ1* and *LYSB* have primarily a bacteriolytic function. *ADIPOQ* is an adiponectin involved in the control of the fat metabolism and it has an anti-inflammatory activity by negatively regulating *TNF- α* expression in macrophages, and also by counteracting its effects.

Common gene expression signatures in the PB and ICV samples of MAP-infected animals. DE gene analysis revealed that 51 genes were DE in the PB of the MAP-infected animals regardless of the severity of the lesion (Table 2). Similarly, 2557 genes were DE in the ICV gene expression profiles from the infected cows versus the control group. The PB and ICV gene expression profiles from the cows with focal lesions shared 19 DE genes, and 89 DE genes were common in the PB and ICV expression profiles of the cows with diffuse lesions. In Table 4 we show the top three upregulated and downregulated genes in the PB and/or ICV gene expression profiles from MAP-infected animals. The *Oxidized low density lipoprotein receptor* (*ORL1*) and the *Tweety family protein 2* (*TTYH2*) appeared both upregulated in the PB samples of the MAP-infected cows, regardless of the severity of their lesions in gut tissues. The *CCL14* chemokine, an epithelial-derived chemokine with antibacterial properties, was the most downregulated gene in the PB gene expression profile from MAP-infected cows versus the control group.

In the ICV samples, the *ITLN2* precursor showed the highest transcription increase in the cows with both focal and diffuse lesions; \log_2 fold-change was 10.6 and 6.8, respectively. Immunohistochemistry provided further evidence of the *ITLN2* production and localization in ICV. As seen in Fig. 2, *ITLN2* expression increases upon infection with MAP compared to control samples. Goblet cells and Paneth cells along the ICV from the infected animals were intensively labeled with the bovine *ITLN2* antibody. *FABP6*, a gastrotropin involved in the efficient apical to basolateral transport of conjugated bile acids in ileal enterocytes was highly upregulated in the ICV gene

Sample	Comparison	Gene ID	Description	Fold Change (Log ₂) ^a
PB	Focal vs. Control	ENSBTAG00000003531	ATP binding cassette A member 13 (ABCA13)	3.7
		ENSBTAG000000039691	Uncharacterized protein	2.7
		ENSBTAG000000039086	Uncharacterized protein	2.6
		ENSBTAG00000000930	Uncharacterized protein	2.2
		ENSBTAG00000019348	leukocyte Ig-like receptor subfamily A member 6	2.0
		ENSBTAG00000022514	CD5 antigen-like precursor (CD5L)	-3.6
		ENSBTAG00000001032	Glycogen phosphorylase, muscle associated (PYGM)	-3.8
		ENSBTAG00000011824	Osteoglycin (OGN)	-3.9
		ENSBTAG00000019406	Insulin growth factor 2 binding protein 3 (IGF2BP3)	-4.0
	ENSBTAG00000010738	C-C motif chemokine ligand 14 (CCL14)	-4.5	
	Diffuse vs. Control	ENSBTAG000000046419	Two pore channel 3 (TPC3)	3.8
		ENSBTAG00000013921	Creatine kinase, M-type (CKM)	3.8
		ENSBTAG00000005353	Desmin (DES)	3.7
		ENSBTAG000000046611	Uncharacterized protein	3.6
		ENSBTAG00000018369	Myosin light chain 2 (MYL2)	3.6
		ENSBTAG00000047764	multidrug resistance-associated protein 4-like	-5.1
		ENSBTAG00000010738	C-C motif chemokine ligand 14 (CCL14)	-5.3
		ENSBTAG00000002976	CD177 molecule (CD177)	-5.4
ENSBTAG00000031599		Cathelicidin-3 (CATHL3)	-7.4	
ENSBTAG00000020072	Cathelicidin-4 (CATHL4)	-7.7		
ICV	Focal vs. Control	ENSBTAG000000022937	Intelectin 2 precursor (ITNL2)	10.6
		ENSBTAG00000013027	Cholecystokinin (CCK)	6.3
		ENSBTAG00000014663	Homeobox B13 (HOXB13)	5.8
		ENSBTAG00000010632	Fatty acid binding protein 6 (FABP6)	4.2
		ENSBTAG00000039035	Heat shock protein 70 family A member 6 (HSPA6)	4.2
		ENSBTAG00000020184	Aquaporin 8 (AQP8)	-3.2
		ENSBTAG00000019379	Tumor suppressor candidate 5 (TUSC5)	-3.2
		ENSBTAG000000046611	Uncharacterized protein	-3.6
		ENSBTAG00000013055	Duodenase-1-like	-3.6
	ENSBTAG00000047008	Uncharacterized protein	-6.7	
	Diffuse vs. Control	ENSBTAG000000022937	Intelectin 2 precursor (ITNL2)	6.8
		ENSBTAG00000039035	Heat shock protein family 70A member 6 (HSPA6)	5.8
		ENSBTAG00000048075	Ig superfamily member 23 (IGSF23)	5.1
		ENSBTAG00000008505	Apolipoprotein B (APOB)	4.8
		ENSBTAG00000016662	Carbamoyl-phosphate synthase 1 (CPS1)	4.8
		ENSBTAG00000020184	Aquaporin 8 (AQP8)	-4.5
		ENSBTAG00000001417	Acyl-CoA synthetase medium chain 1 (ACSM1)	-4.7
		ENSBTAG00000026323	Lysozyme C, intestinal isozyme (LYSB)	-5.3
ENSBTAG00000019813		Adiponectin, C1Q (ADIPOQ)	-5.8	
ENSBTAG00000011941	Lysozyme C, milk isozyme (LYZ1)	-8.3		

Table 3. The top five up- and downregulated DE genes in samples from MAP-infected cows versus control samples. ^aA negative fold-change value reports downregulated gene expression.

expression profile from the infected cows irrespective of the severity of the histopathological lesions. The stress response protein, *HSPA6*, was also highly expressed in the ICV from MAP-infected cows with log₂ fold-changes of 4.2 and 5.8 in the gene expression profiles of the cows with focal or diffuse lesions versus control cows, respectively. A significant reduction in the expression of the *AQP8* gene, a protein involved in water/solute intestine homeostasis, was observed in the ICV gene expression profile from the cows with focal or diffuse lesions versus the control group; log₂ fold-change = -3.2 and -4.5, respectively.

Several genes involved in the control of infectious diseases such as the *Basic leucine zipper ATF transcription factor 2 (BATF2)* and the *C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)*, were upregulated in the PB and ICV gene expression profiles from the animal with diffuse lesions. *BATF2* belongs to the activator protein 1 (*AP-1*) transcription factor family and interacts with the *IFN regulatory factor 1* to mediate downstream proinflammatory immune responses. *CXCL10* is chemotactic for monocytes and T-lymphocytes by binding to *CXCR3*. *C4b-binding protein alpha-like, epiregulin (ERG)* and the *CXCL8/IL8* were downregulated in the PB and ICV gene expression profiles from cows with diffuse lesions versus the control group.

Five genes were DE in the PB and ICV gene expression profiles from the animals with PTB-associated histopathological lesions irrespective of the type of lesion including the *CXCL8/IL8*, *Apolipoprotein L domain*

Sample	Comparison	Gen ID	Description (Gene Symbol)	Lesion	Fold Change (Log ₂) ^a
PB	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	ENSBTAG00000019348	Uncharacterized protein	Focal	2.0
				Diffuse	1.6
		ENSBTAG00000004547	<i>Oxidized low density lipoprotein receptor1 (OLR1)</i>	Focal	1.1
				Diffuse	2.3
		ENSBTAG00000011007	<i>Twenty family member 2 (TTYH2)</i>	Focal	1.3
				Diffuse	1.7
		ENSBTAG00000001032	<i>Glycogen phosphorylase (PYGM)</i>	Focal	-3.8
				Diffuse	-2.7
		ENSBTAG00000019406	<i>Insulin growth factor2 mRNA binding prot3 (IGF2BP3)</i>	Focal	-4.0
ICV	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	ENSBTAG00000022937	<i>Intelectin 2 precursor (ITLN2)</i>	Focal	10.6
				Diffuse	6.8
		ENSBTAG00000010632	<i>Fatty acid binding protein 6 (FABP6)</i>	Focal	4.2
				Diffuse	4.7
		ENSBTAG00000039035	<i>Heat shock protein family A member 6 (HSPA6)</i>	Focal	4.2
				Diffuse	5.8
		ENSBTAG00000047181	<i>Multidrug resistance-associated protein 4</i>	Focal	-3.2
				Diffuse	-2.3
		ENSBTAG00000020184	<i>Aquaporin 8 (AQP8)</i>	Focal	-3.2
PB + ICV	Focal vs. Control	ENSBTAG00000036154	<i>TCR gamma alternate reading frame protein (TARP)</i>	Blood	-2.8
				ICV	-1.1
		ENSBTAG00000002362	<i>Apolipoprotein L domain containing 1 (APOLD1)</i>	Blood	-2.6
				ICV	-1.1
	Diffuse vs. Control	ENSBTAG00000038080	<i>Duodenase-1</i>	Blood	-2.2
				ICV	-1.9
		ENSBTAG00000011467	<i>Basic ATF transcription factor2 (BATF2)</i>	Blood	2.6
				ICV	2.8
		ENSBTAG00000001725	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)</i>	Blood	2.0
Diffuse vs. Control			ICV	2.2	
	ENSBTAG00000046803	<i>Growth arrest specific 1 (GAS1)</i>	Blood	2.4	
			ICV	1.1	
	ENSBTAG00000039196	<i>C4b-binding protein alpha-like</i>	Blood	-4.8	
			ICV	-2.0	
ENSBTAG00000010273	<i>Epiregulin (EREG)</i>	Blood	-4.8		
		ICV	-2.0		
ENSBTAG00000019716	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8 (CXCL8)</i>	Blood	-3.9		
		ICV	-1.9		

Table 4. The top 3 up- and downregulated genes in the PB and/or ICV samples of infected animals with focal and/or diffuse lesions versus control samples. ^aA negative fold-change value reports downregulated gene expression.

containing 1 (APOLD1), *Interferon α -inducible protein 27 (IFI27)*, *KIAA1324 like (KIAA1324L)* and *ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (ARAP2)*. *CXCL8/IL8*, *APOLD1*, *KIAA1324L* and *ARAP2* were downregulated in all the comparisons. The *ARAP2* gene is thought to play a major role in the activation of the *major histocompatibility complex class II* genes expression²⁷. The *IFI27* was downregulated in the PB samples and upregulated in the ICV samples from the cows with focal (\log_2 fold = 1.6) and diffuse lesions (\log_2 fold = 2.6) when compared with the control group. The *IFI27 (ISG12)* mediates *IFN*-induced apoptosis characterized by a rapid and robust release of cytochrome C from the mitochondria and activation of caspases 2,3,6,8 and 9 which may in turn influence the antiviral activities of the *IFN*²⁸.

Gene ontology (GO) analysis. Functional categorization of the DE genes in each comparison was performed using the Bioconductor GSeq package to identify biological process (BP), cellular component (CC) and molecular function (MF) (Table 5). While in the PB samples of the cows with focal lesions we did not identify

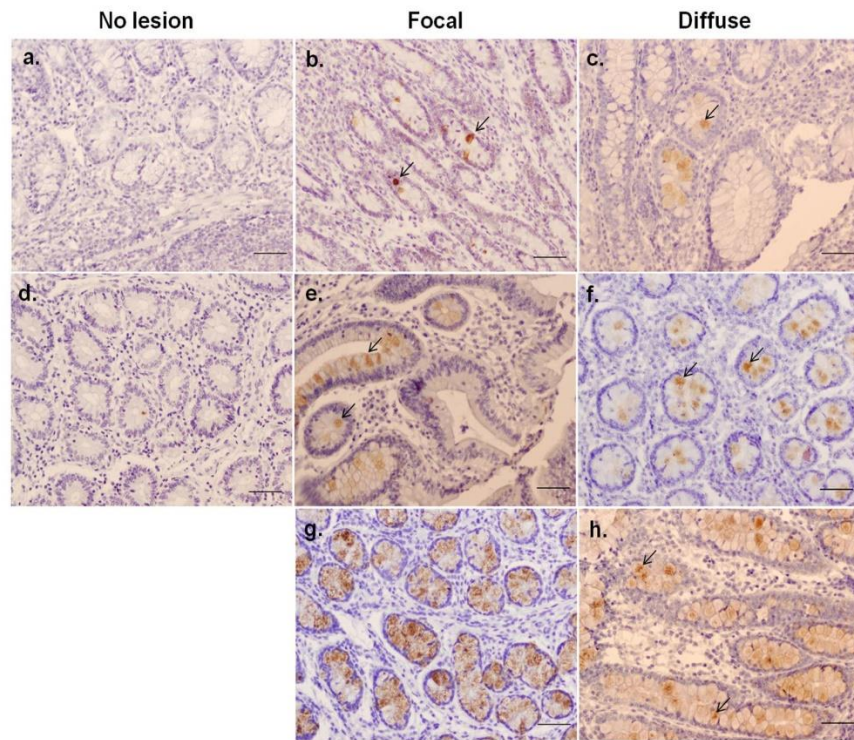


Figure 2. Localization of the *Intelectin 2* (*ITLN2*) precursor in the ICV of MAP-infected versus control cows by immunohistochemistry. Sections of the ICV from animal without lesions (**a,d**), and with focal (**b,e,g**) or diffuse lesions (**c,f,h**) were labeled with an anti-bovine *ITLN2* antibody and stained as explained in materials and methods. The arrows show sites of antibody binding. Bars are 50 μ M.

any significantly overexpressed GO, eleven GOs were significantly enriched in the PB samples of the animals with diffuse lesions. Out of these eleven GOs, 5 were BP, 4 were CC and 2 were MF (Fig. 3a). The five identified BP were related to the immune response, including killing of cells of other organisms (GO:0031640), defense response (GO:0006952, GO:0050832), immune response (GO:0006955) and positive regulation of neutrophil chemotaxis (GO:0090023). The enriched CC identified in the PB samples of cows with diffuse lesions were the extracellular space and cell membrane.

We identified 83 and 80 overrepresented GO in the ICV samples of the cows with focal and diffuse lesions, respectively. The top 11 GOs identified in the ICV samples of the animals with focal and diffuse lesions were CC. Enriched CC in the ICV samples of the cows with both focal and diffuse lesions included the cytosol and the cytoplasm being these the top dysregulated CC. Among the top five BP enriched in the ICV samples of the cows with focal lesions were the cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974), protein transport (GO:0015031), immune system process (GO:00023746), DNA repair (GO:0006281) and the neutrophil chemotaxis GO (GO:0030593) (Fig. 3b). Three of the top five overexpressed BP in the ICV from the cows with diffuse lesions were associated with the innate immune and inflammatory response (Fig. 3c). Interestingly, the defense response (GO:0006952) and immune response (GO:0006955), were both enriched in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions (Fig. 4). Our results revealed that the chemokines *CXCL8/IL8* and *CXCL10* were regulated in opposite directions in cows with the more advanced lesions. While *CXCL8/IL8* was downregulated in the PB and ICV samples, *CXCL10* was upregulated in both MAP-targeted samples from the cows with diffuse lesions. This differential modulation of *CXCL10* and *CXCL8/IL8* may suggest a different role of both chemokines in the infection. While *CXCL8/IL8* attracts neutrophils, basophils and T-cells to the site of the infection, *CXCL10* is chemotactic for monocytes and T-lymphocytes by binding to CXCR3. Expression changes in genes with antibacterial activity such as the *Cathelicidin 6* (*CATHL6*) and β -*defensin* (*DEF β 4A*) were also observed. Seven DE genes included in the immune response pathway (GO:0006955) were dysregulated in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions including the *CCL14*, *ENPP2*, *CD36*, *CXCL8/IL8*, *BOLA-DQ β* , *MHC class I heavy chain* and one uncharacterized protein (ENSBTAG00000040323). While *MHC class I heavy chain* was upregulated; *ENPP2*, *CD36*, *CXCL8/IL8*, and *BOLA-DQ β* were downregulated in the PB and ICV expression profiles from the cows with diffuse lesions when compared with the control group.

Metabolic analysis. Enriched metabolic routes related to the DE genes in each comparison were analyzed. Although no metabolic pathways referenced in the KEGG database were enriched in the PB samples, 78 and

Sample	Comparison	Total enriched GO (N)	Enriched Biological process (N)	Enriched Cellular component (N)	Enriched Molecular function (N)	Specific enriched GO (N)	Enriched Biological process (N)	Enriched Cellular component (N)	Enriched Molecular function (N)
PB	Focal vs. Control	0	0	0	0	0	0	0	0
PB	Diffuse vs. Control	11	5	4	2	7	3	2	2
PB	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	0	0	0	0	0	0	0	0
ICV	Focal vs. Control	83	32	31	19	34	13	12	9
ICV	Diffuse vs. Control	80	38	27	15	30	17	9	4
ICV	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	48	19	18	11	47	19	17	11
PB, ICV	Focal vs. Control	0	0	0	0	0	0	0	0
PB, ICV	Diffuse vs. Control	3	2	1	0	2	2	0	0
PB, ICV	Focal vs. Control + Diffuse vs. Control	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 5. Number of enriched gene ontologies (GOs) and specific GOs for each comparison.

82 metabolic routes were dysregulated in the ICV samples of the cows with focal and diffuse lesions, respectively. Only three of the 78 metabolic pathways dysregulated in the ICV gene expression profiles from the cows with focal lesions were significantly enriched including the N-Glycan biosynthesis (bta00510, $P = 0.004$), purine metabolism (bta00230, $P = 0.015$) and the one carbon pool by folate pathway (bta00670, $P = 0.021$). The metabolic analysis using the DE genes in the ICV from cows with diffuse lesions versus the control group revealed that the DE genes in this comparison affected metabolic processes such as the valine, leucine and isoleucine degradation (bta00280, $P = 0.008$) and the purine metabolism (bta00230, $P = 0.003$) with sequences corresponding to 10 and 34 enzymes, respectively. Therefore, our metabolic analysis revealed bta00230 as a common metabolic route significantly enriched in the ICV from the infected cows versus the control cows. Using the STRING database, the bile secretion metabolic route (bta04976) was significantly enriched in the ICV from the cows with focal lesions (enrichment score = 244.99, $FDR = 0.001$) with 18 proteins involved in this network. In the ICV from the cows with diffuse lesions, the vitamin digestion and absorption (enrichment score = 599.07, $FDR = 0.001$) and the cholesterol (enrichment score = 677.38, $FDR = 0.001$) routes were significantly enriched with six and four proteins matching each route, respectively.

Protein to protein interaction analysis. Protein to protein interaction analysis using the DE genes in the PB samples from the animals with focal lesions revealed a *HBEGF-CXCL8/IL8* functional association (Fig. 5a). Using the DE genes in the PB samples from the cows with diffuse lesions, 11 functional associations and two *CXCL8/IL8* and *Collagen type I, $\alpha 2$ chain (COL1A2)* networks were identified (Fig. 5b). The *COL1A2* was linked to a secreted protein, the *Acidic and rich in cysteine protein (SPARC)*, the *Syndecan 4 (SDC4)* and to the *Integrin subunit $\alpha 9$ (ITGA9)*. When the DE genes in the ICV gene expression profile from the cows with focal lesions were used, 13 functional interactions and one *CXCL8/IL8* centered network were retrieved (Fig. 5c). With a confidence cuff of 0.7, 90 functional interactions and a centered mitogen-activated *MAP kinase 8 (MAPK8)* network were retrieved when the DE genes in the ICV of the animals with diffuse lesions were used (Fig. 5d). Our protein-protein interaction analysis revealed that the interaction between *MAPK8* and *CXCL8/IL8* might be mediated by two leucine zipper protein members of the AP1 transcription factor complex, *FOS* and *FOSB*.

Discussion

Transcriptomic profiling of the host response to MAP infection has the potential to advance our understanding of MAP-host interactions and to reveal the mechanisms involved in the establishment and progression of bovine PTB. This information can help to set up the basis for novel diagnosis tools and for the development of novel preventive and therapeutic approaches which could improve cattle health. Host transcriptomic studies have highlighted the importance to compare whole blood versus other tissues. To our knowledge, our study represents the first attempt to study the specificities and common signatures of the ICV and PB gene expression profiles of PTB-infected cattle using RNA-Seq. All the infected cows included in our study had detectable lesions in gut tissues with distinct severity, focal or diffuse. Although the number of control animals is limited, our results showed extensive expression differences between infected and control cows. We found that the number of DE genes was higher in the ICV than in the PB samples and increased with the severity of the lesion. More specifically, our study revealed 19 genes DE in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with focal lesions versus the control group. Similarly, 89 genes were DE in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions versus the control group. Interestingly, the most upregulated gene in the ICV samples of the infected animals was the *ITLN2* precursor; \log_2 fold change = 10.6 and 6.8 in the cows with focal or diffuse lesions versus the control group, respectively. The *ITLN2* is an extracellular lectin able to bind *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG)²⁹. The *FABP6*, an ileum-specific bile acid (BA) transporter, was also highly upregulated in the ICV gene expression profile from the infected cows versus control cows which suggests a dysregulation of the BA secretion in MAP-infected animals. We also observed that MAP infection downregulated the expression of the BA receptor FXR in the ICV from the cows with focal and diffuse lesions versus control cows; \log_2 fold = -0.8 and -1.0, respectively. In agreement with our results, Hempel *et al.*

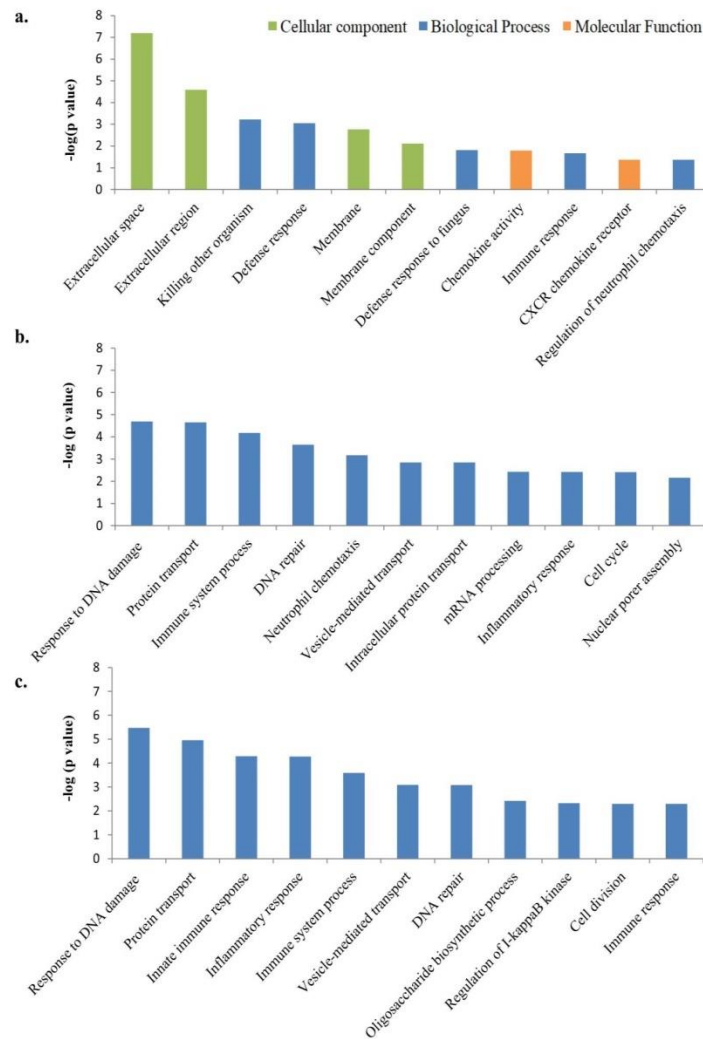


Figure 3. Gene ontology (GO) analysis using the DE genes in the two groups of infected cows compared to the control group. **(a)** The eleven GO enriched in the PB samples collected from the group of animals with diffuse lesions in gut tissues versus the control group. **(b)** The 11 top biological processes overrepresented in the ICV samples collected from the animals with focal lesions versus the control group. **(c)** The 11 top biological processes enriched in the ICV samples from the group of cows with diffuse lesions versus the control group.

found the *FABP6* transporter as the top upregulated gene in the comparison of clinical versus uninfected control animals²⁴. Apart from *FABP6*, we found other genes highly dysregulated in the ICV gene expression profile from the cows with diffuse lesions such as the *Immunoglobulin superfamily member 23 (IGSF23)* (\log_2 fold = 5.1), *Apolipoprotein B (APOB)* (\log_2 fold = 4.8), *Solute carrier family 10 member 2 (SLC10A2)* (\log_2 fold = 2.7), and the *Matrix metalloproteinase 13 (MMP13)* (\log_2 fold = 2.0) which had been previously reported by Hempel *et al.* in the comparison of clinical versus control cows. Little is known about the role of *IGSF23*, but other *IGSF* members are cell adhesion molecules that perform important immunological functions, including recognizing a variety of counterpart molecules on the cell surface or extracellular matrix³⁰.

Several genes involved in the control of infectious diseases such as the *basic leucine zipper transcription factor 2 (BATF2)* and *CXCL10* chemokine were found in our study highly upregulated in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions versus the control group but were unaffected in the cows with focal lesions. *BATF2* is predominantly expressed in monocytes and macrophages and has a central role in macrophage activation by regulating inflammatory responses during mycobacterial infection. In human tuberculosis (TB), *BATF2* has been suggested as a biomarker and a potential host directed drug target^{31,32}. The *CXCL10* chemokine, also known as *IFN- γ inducible protein-10 (IP-10)*, is chemotactic for monocytes and T-lymphocytes by binding to CXCR3 receptor. *CXCL10* is expressed mainly by activated CD14+ memory T cells, which produce a Th1 pattern

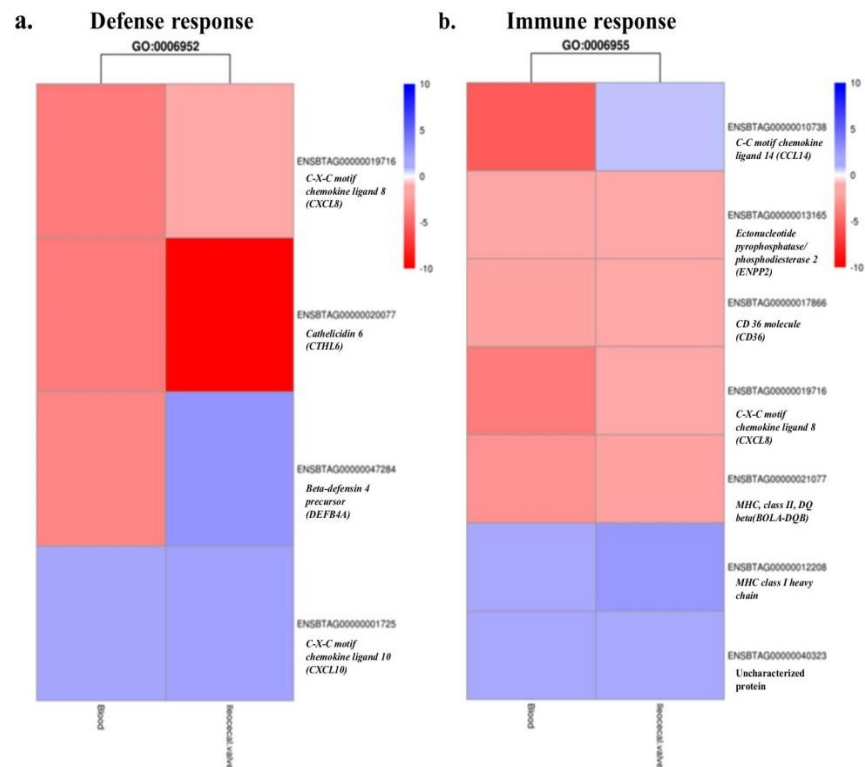


Figure 4. Enriched biological process in PB and ICV from the cows with diffuse lesions versus the control group. The defense response (GO:0006952) and immune response (GO:0006955) biological processes were both enriched in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions. The heatmaps represent the fold change (log₂ fold) of the up- and downregulated genes included in the enriched GO:0006952 and GO:0006955. Colors and intensities depend on expression levels. Red indicated gene downregulation and blue upregulation.

of cytokine production³³. Several studies have demonstrated that *CXCL10* can be used as a biomarker of TB, where significantly greater levels of mycobacterial antigen-induced *CXCL10* protein were detected in whole blood of TB patients compared to healthy controls^{34–36}. More recently, the simultaneous measurement of *CXCL10* and *IFN-γ* enhanced test sensitivity for bovine TB identification in cattle in clinical stages of the infection³⁷.

Our study revealed enrichment of the following GOs in the ICV from the cows with focal lesions: cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974), protein transport (GO:0015031), immune system process (GO:0002376), DNA repair (GO:0006281) and neutrophil chemotaxis (GO:0030593). Three of the top five GO enriched in the ICV gene expression profile from the cows with diffuse lesions were associated with the innate immune response (GO:0045087), inflammatory response (GO:0006954) and the immune system process (GO:0002376). Interestingly, the GOs related to the defense response (GO:0006952) and immune response (GO:0006955) were enriched in the PB and ICV from the cows with diffuse lesions. The DE genes included in the GO:0006952 were the *CXCL8/IL8*, *CXCL10*, *CATHL6*, and *DEFBA4*. Seven DE genes corresponding to the immune response (GO:0006955) were dysregulated in both the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions including *CCL14*, *ENPP2*, *CD36*, *CXCL8/IL8*, *BOLA-DQβ*, *MHC class I heavy chain* and the uncharacterized protein ENSBTAG00000040323. *ENPP2*, *CD36*, *CXCL8/IL8*, and *BOLA-DQβ* were downregulated in the PB and ICV from the cows with diffuse lesions when compared with the control group. Downregulation of members of the bovine major histocompatibility (*MHC*) class II genes can potentially alter antigen presentation and activation of T helper cells during MAP infection³⁸. Our results showed reduced expression of *BOLA-DOβ* and *BOLA-DQB* genes in the PB from the cows with focal and diffuse lesions, respectively. In the ICV samples, the *BOLA-DRα*, *BOLA-DMS*, *BOLA3*, and the *BOLA-DOB* genes were downregulated in cows with focal lesions when compared with the control group. In contrast, in the ICV samples of the cows with diffuse lesions upregulation of the *BOLA-DOα*, *BOLA-DMB*, *BOLA-DMA* genes was detected which might suggest the activation of T helper cells as the infection progresses.

Interestingly, our study revealed *CXCL8/IL8* as a common chemokine highly downregulated in our database and involved in the following pathways; neutrophil chemotaxis (GO:0030593), defense response (GO:0006952) and immune response (GO:0006955). Similarly, *CXCL8/IL8* production was reduced in stimulated PB mononuclear cells from CD patients in comparison to healthy subjects and in MDM from *Mycobacterium bovis*-infected

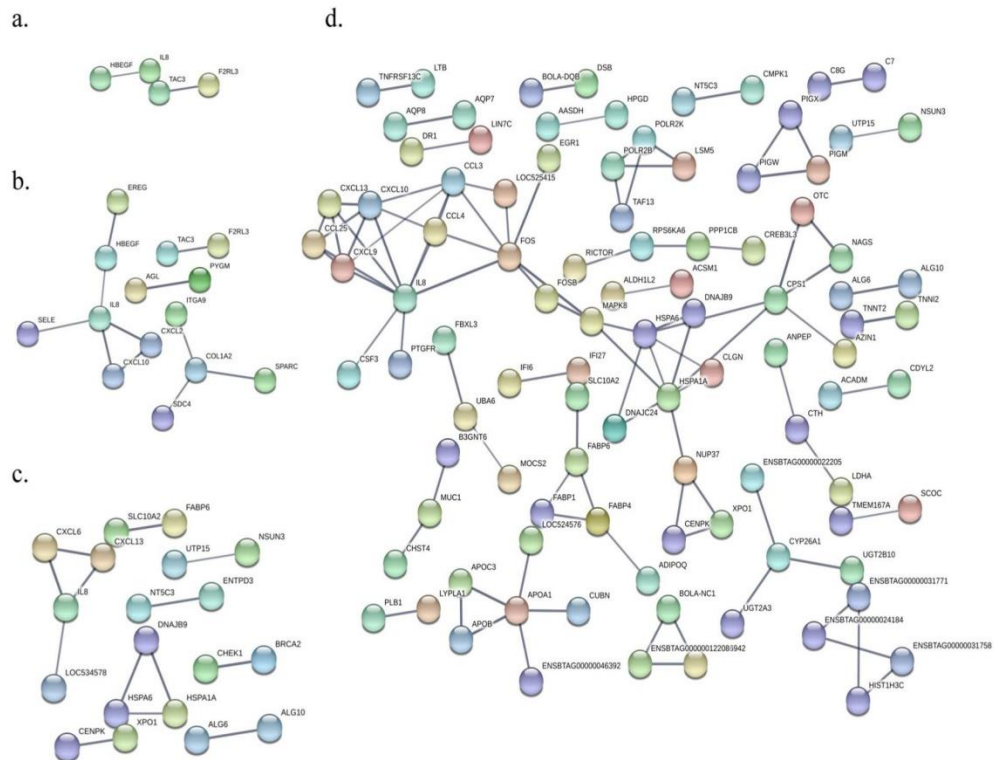


Figure 5. Protein-protein network analysis using the DE genes (\log_2 fold > 2 and < 2) in the transcriptomic profiles of the cows with PTB-associated lesions versus the control group. (a) Using the DE genes in the PB samples from the animals with focal lesions, two *HBEGF-IL8* and *TAC3-F2RL3* functional interactions were detected. (b) In the PB samples from the cows with diffuse lesions, two *IL8* and *COL1A2* centered networks were observed. (c) When the DE genes in the ICV transcriptomic profiles of the cows with focal lesions were used, a *IL8* centered network was also obtained. (d) A *MAPK8* centered network was retrieved when the DE genes in the ICV transcriptomic profile of the cows with diffuse lesions were searched in the STRING database. Individual nodes represent proteins with relationships represented by edges. The confidence score (> 0.7) of each interaction is mapped to the edge thickness. The proteins with no associations to other proteins in the networks were hidden.

cattle versus healthy control cattle^{39,40}. Since the *CXCL8/IL8* is the major chemokine responsible for neutrophil recruitment and activation by binding to *CXCR3*, decreased *CXCL8/IL8* expression may reflect impairment of neutrophil recruitment and activation during a natural MAP infection. Other *CXCL8/IL8*-associated biological functions include plasma exudation, general granulocytophilia, degranulation of neutrophils, respiratory burst response, and mobilization of intra-cellular Ca^{2+} ⁴¹. In our study, the *Epregrulin (ERG)* and *CXCL8/IL8* genes were both downregulated in the PB and ICV gene expression profiles from the cows with diffuse lesions versus control cows. *ERG* belongs to the *epidermal growth factor (EGF)* family together with the *HBEGF*; acting both as mitogenic stimulators via binding to *EGF* receptors (*EGFRs*). Transactivation of *EGFR* leads to downstream signaling events including *MAPK8* phosphorylation and activation which leads to apoptosis induction⁴². Induced *CXCL8/IL8* release is predominantly dependent on *EGF* binding to the *EGFR* leading to activation of *MAPK8*⁴³. Our protein-protein interaction analysis using the DE genes in the cows with diffuse lesions revealed a central role for *CXCL8/IL8* and *MAPK8* in MAP pathogenesis. This kinase was downregulated in the ICV gene expression profiles from the cows with focal and diffuse lesions when compared with the control group; -1.7 and -2.16938 , respectively. Our results support the idea that MAP infection limits signaling via the *MAPK8-IL8* expression pathway which may favor MAP survival. Although the role of *CXCL8/IL8* in MAP pathogenesis has not been characterized before, the *CXCL8/IL8* has been shown to play an important role in the pathogenesis of the human inflammatory bowel disease (IBD)³³.

Our protein-protein interaction analysis using the DE genes in the PB from the cows with focal and diffuse lesions identified a *CXCL8/IL8* network in both stages of the disease. In other hand, using the DE genes in the PB from the cows with diffuse lesions a *COL1A2* centered network was identified containing a *COL1A2-SPARC* functional interaction. Interestingly, a *SPARC*-centered network was expressed more strongly in *Mycobacterium bovis*-challenged MDM from bovine TB infected cows that in uninfected cows⁴⁴. *SPARC*, also known as

osteonectin, is a matrix protein that binds collagen, and it is required for the development of granuloma-like structures during chronic infections⁴⁵. In our study, *SPARC* and *COL1A2* were upregulated in the PB gene expression profiles from the cows with diffuse lesions which suggests that the expression of both proteins could lead to a bad prognosis in MAP-infected cows.

Recently, metabolomic analysis yielded a clear separation between non-infected and MAP-infected cattle, indicating changes in general metabolism, nutrition uptake and energy balance during the early stage of the disease⁴⁶. Using RNA-Seq, we identified three metabolic pathways significantly enriched in the ICV from the cows with focal lesions including the N-Glycan biosynthesis (map00510, $P = 0.004$), purine metabolism (map00230, $P = 0.015$) and the one carbon pool by folate route (map00670, $P = 0.021$). Altered concentrations of N-glycans, such as mannose, were previously observed by the Buck *et al.* early after MAP infection⁴⁶. In addition, it has been recently proposed that *Mycobacterium tuberculosis* infection manipulates the glycosylation machinery and the N-Glycoproteome of human macrophages⁴⁷. The metabolic analysis performed using the DE genes in the ICV from the cows with diffuse lesions revealed enrichment of the branched amino acids (BCAA; valine, leucine and isoleucine) degradation (map00280, $p = 0.008$) and of the purine metabolism (map00230, $p = 0.003$). The degradation of the BCAA in advanced stages of the infection is consistent with the fact that PTB eventually leads to intestinal malabsorption and hypoproteinemia in the final stages of the infection⁴. Interestingly, our study identified the purine metabolism as a common enriched route in the ICV gene expression profiles of MAP-infected cows regardless of the type of lesion. In agreement with our findings, a previous study showed that MAP infection increased intracellular ATP in bovine monocytes⁴⁸. Using the STRING database, the bile secretion metabolic route (bta04976) was significantly enriched in the ICV gene expression profiles from the cows with focal lesion (enrichment score = 244.99, FDR = 0.001). In the ICV gene expression profile from the cows with diffuse lesions, the cholesterol and the vitamin digestion and absorption routes were significantly enriched, respectively. In agreement with these findings, recent reports have demonstrated that MAP is able to manipulate the host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages which might favor MAP persistence⁴⁹. In addition, decreases in serum 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) levels were significantly lower in cows in the clinical stage of disease compared with either cows in the subclinical stage and non-infected control cows⁵⁰. It is generally accepted that cattle in advanced stages of MAP infection are unable to metabolize and absorb vitamin D₃ across the intestinal wall, and therefore suffer from weight loss and cachexia.

This study is the first to simultaneously describe transcriptomic changes in PB and ICV samples of cattle naturally infected with MAP. Several important observations were made. First, by comparing the transcriptomic profiles of two MAP-targeted tissues we described both unique and overlapping changes in the transcriptome of the infected cows versus the control group. Second, our study highlighted the ability of the RNA-Seq technology to reveal roles for genes that have not been previously implicated in the host response to MAP infection. Third, our transcriptomic analysis provided potential biomarkers for the development of future diagnostic tools, vaccines and therapeutics.

Materials and Methods

Ethic statement. Experimental procedures performed on the animals used in this study were approved by the Animal Ethics Committee of the Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) and authorized by the Regional Consejería de Agroganadería y Recursos Autoctonos of the Principality of Asturias (approval code PROAE 29/2015). All the procedures were carried out in accordance with the European Guidelines for the Care and Use of Animals for Research Purposes (2012/63/EU). PB and fecal samples were collected by trained personnel and in accordance with good veterinary practice.

Animal population. Fourteen Holstein Friesian cows from a single commercial dairy farm in Asturias (Spain) were monitored annually by obtaining PB and fecal samples to assess disease status by ELISA, and fecal bacteriological culture and PCR. The mean prevalence of the disease in the farm estimated by ELISA was 6.29% in the sampling period (2016–2018).

Tissue and fecal sampling for histopathology, immunohistochemistry and bacterial culture.

For histopathological analysis, samples from ileocecal lymph nodes, distal jejunal lymph node, ICV, and distal jejunum were collected aseptically from each animal and placed in formalin. The collected samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, and dehydrated through graded alcohols and xilol before being embedded in paraffin wax. Several sections were cut from each tissue sample using a microtome Leica RM2035 (Leica Microsystems, Barcelona, Spain), mounted on treated microscope slides (Fisher Scientific Co) and subsequently stained with hematoxylin-eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (ZN). The stained sections were examined under a microscope Olympus BX51 equipped with an Olympus U-CMAD3 digital camera for pathological lesions and for the presence of acid-fast bacteria (AFB). According to their location and extension, inflammatory cell type, and Mycobacterial load, PTB-associated histopathological lesions were classified as focal (focal and multifocal), and diffuse (paucibacillary, intermediate or multibacillary)³.

For immunohistochemistry, the Avidin-Biotin kit with peroxidase-based detection was used (Vector Laboratories, California, USA). Briefly, ICV sections were deparaffinised, hydrated and rinsed with tap water. Afterwards, slides were treated to quench the endogenous peroxidase by incubation with methanol containing 3% H₂O₂ for 10 min at room temperature and washed with water for 10 min. The tissue sections were incubated overnight at 4 °C with an anti-ITLN2 polyclonal antibody (Aviva Systems Biology, San Diego, California), washed with TBS and incubated with a goat biotinylated anti-rabbit IgG (1:200 dilution). The sections were then incubated with VECTASTAIN Elite ABC Reagent for 30 min at room temperature. Finally, the sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 5 min and washed with TBS. The stained slides were dehydrated, mounted and studied under light microscopy.

For bacteriological culture, a pool (2 gr) of ileocecal lymph nodes, distal jejunal lymph node, ICV, and distal jejunum were decontaminated with 38 mL of hexa-decyl pyridinium chloride at a final concentration of 0.75% (Sigma, St. Louis, MO) and homogenized in a stomacher blender. After 30 min of incubation at room temperature, 15 mL of the suspension was transferred to a new tube and incubated overnight for decontamination and sedimentation. Approximately, 200 µl of the suspension was taken from the layer near the sediment and inoculated into two slants of Herrolds egg yolk medium (HEYM; Becton Dickinson, Sparks, MD) and into two slants of Lowenstein-Jensen medium (LJ; Difco, Detroit, MI), both supplemented with Mycobactin J (Allied Monitor, Fayette, MO) as previously described⁵¹. Bacterial load in tissues was classified as low (<10 cfu; estimated average 2 cfu/tube), medium (between 10 to 50 cfu, estimated average 20 cfu/tube), or heavy (>50 cfu; estimated average 200 cfu/tube). At the time of slaughter, feces were taken from the rectum of each animal and processed within 48 h after arrival at the laboratory. The fecal samples (2 g each) were decontaminated, blended in a stomacher, and cultured in HEYM and LJ, as previously described for tissue culture.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of MAP-specific antibodies. Blood was collected from the coccygeal vein of each animal into 4.5 ml serum clot activator Vacutainer[®] tubes (Vacuette, Kremsmunster, Austria). Serum was separated after clotting by centrifugation (2500 × g for 20 min) and stored at -20 °C until use. The serum samples were tested using the Mycobacterium Paratuberculosis Antibody test kit (IDEXX laboratories, Oofddorp, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The optical density (OD) in each well was measured at 450 nm by an ELISA plate reader (model 680, Sigma, St. Lois, MO). The measured ODs were normalized and the results were expressed as a percentage of the positive control OD according to the following formula: % relative OD sample/OD positive control = 100 × [(OD sample_{+Ag} - OD sample_{-Ag})/(OD mean positive control_{+Ag} - OD mean positive control_{-Ag})].

Fecal real-time polymerase chain reaction (PCR). Isolation of genomic DNA from feces was performed using the MagMax Total Nucleic Acid Isolation kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, Lissieu, France). For detection of MAP DNA, the LSI VetMax Triplex real-time PCR was used according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, Lissieu, France). The kit enables real-time PCR detection of *Map* IS900 and F57 genes in DNA extracted from feces, liquid cultures, and tissues or colonies. Real-time PCR amplifications were performed using the MX3000P Real-Time PCR system (Stratagene, San Diego, USA) detection system with the following conditions: 1 cycle at 50 °C for 2 min, 1 cycle of 95 °C for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing/extension at 60 °C for 60 s.

Fecal quantitative real-time PCR (qPCR). PCR-positive samples were also tested by real-time qPCR using the ParaTB Kuantif-VK kit following the manufacturer's instructions (Vacunek, Bizkaia, Spain). The kit uses a F57 TagMan probe labeled with the fluorescent reporter dye 5-carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end and primers that specifically amplify the single-copy F57 insertion sequence of MAP. Inhibition of the amplification reaction is ruled out by including in the master mix an internal plasmid control with specific primers and an internal hybridization probe labeled with 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein succinimidyl ester (JOE) at the 5' end. This internal amplification control molecule is co-amplified alongside the F57 diagnostic target in a duplex format. Quantification of MAP titer (F57 copy numbers per gram of feces) was accomplished by preparing a standard curve using serial dilutions of a standard sample containing a known number of MAP DNA copies. Real-time qPCR amplifications were performed using the Step One Plus detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) with the following conditions: 1 cycle at 95 °C for 10 min, 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, and annealing/extensions at 60 °C for 60 s. The results were analyzed with the ABI Prism software version 1.4.

RNA extraction and RNA-Seq library preparation. At the time of slaughter, PB samples were collected from the coccygeal vein of all the cows included in the study in PAXgene Blood RNA tubes (2.5 ml) (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was extracted from the PB samples using the PAXgene blood RNA kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). For RNA isolation, 150–200 mg of ICV of all the animals were harvested and immediately submerged in 2 ml of RNA later (Sigma, St. Louis, MO). Purification of RNA was performed using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Residual genomic DNA was removed using DNase digestion with RNase-free DNase I Amplification grade following the recommended protocol (Invitrogen, Spain). Concentration and quality of the total RNAs were measured using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). All samples had an RNA integrity value of 7 or greater. Approximately 250 ng of RNA were used for each RNA-Seq library creation using the Illumina NEBNext[®] Ultra Directional RNA Library preparation kit following the manufacturer's instructions (Illumina Inc, CA, US). All RNA-Seq libraries were quantified using a Qubit[®] Fluorometer and double stranded DNA high Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, Spain). RNA-Seq libraries quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer and Agilent high sensitivity DNA chip to confirm that the insert sizes were 200–250 bp for all the individual libraries.

RNA sequencing and bioinformatic analysis of RNA-Seq data. RNA-Seq libraries were single-end sequenced in a 1 × 75 format using an Illumina NextSeq500 sequencer at the Genomic Unit of the Scientific Park of Madrid, Spain. The raw reads were filtered by their length (minimum size 60 bp long) and percentage of ambiguous base N less than 5% using Prinseq-lite⁵². Trimmed reads were subsequently mapped to the *Bos Taurus* reference genome (*Bos taurus*.UMD3.1. version 87) with TopHat mapper⁵³. Reads were assigned to a gene if they were not multi-hit reads. The resulting alignment files were provided to Cufflinks to generate a transcriptome assembly for each condition. These assemblies were then merged together using Cuffmerge, which is included in

the Cufflinks package. This merged assembly provided a uniform basis for calculating gene and transcript expression levels in each condition. The reads and merged assembly were fed to Cuffdiff which calculates expression levels and tested the statistical significance of each observed change in expression⁵⁴. The fold change (\log_2 scale), P-values and false discovery rates (FDR) for each gene were obtained. The genes with a FDR-adjusted threshold <0.05 were considered differentially expressed (DE) when compared to the control group. To visualize and integrate all the data produced by the Cufflink analysis, CummeRbund was used for cluster analysis and for handling the transformation of Cuffdiff data into R statistical computing environment. RNA-Seq data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under the accession number (GSE137395).

Gene ontology (GO) and metabolic analysis of the DE genes obtained using RNA-Seq. To identify GO and metabolic routes involved in MAP infection, genes with a significant DE in each comparison were evaluated using the GOseq R Bioconductor^{55–57}. To begin the analysis, GOseq quantifies the length bias present in the DE genes by calculating a probability weighting function (PWF) which gives the probability that a gene will be DE based on its length alone. Next, GOseq analysis requires the use of the Wallenius non-central hypergeometric distribution to approximate the null distribution for GO category membership and to calculate representation of GO categories amongst the set of DE genes. Using the Wallenius approximation, P-values for representation of the DE genes in each GO were generated and a P-value threshold <0.05 selected. GO analysis provided categories of genes involved in different biological processes (BP), molecular functions (MF) and those integral for different cell compartments (CC). KEGG pathways enrichment analysis was also performed using the STRING v11.0⁵⁸.

Protein-protein association networks. The DE genes with \log_2 fold changes >2 or <2 were analyzed using the STRING database v10.5⁵⁹. The STRING database aims to collect, score and integrate all known and predicted protein-protein association data. The basic interaction unit in the STRING database is the functional association, i.e. a link between two proteins that both contribute jointly to a specific function. Network nodes represent proteins and edges protein-protein interactions. For each interaction a combined and final score is computed based on seven evidence channels including neighborhood in the genome, gene fusions, co-occurrence across genomes, co-expression, experimental/biochemical data, association in curated databases, and co-mentioned in PubMed abstracts. Only functional interactions with a high confidence score (>0.7) were included in the networks.

Data Availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Bermudez, L. E., Petrofsky, M., Sommer, S. & Barletta, R. G. 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. *Infect. Immun.* **78**, 3570–3577 (2010).
- Abendaño, N., Juste, R. A. & Alonso-Hearn, M. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: A common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–7 (2013).
- González, J. *et al.* Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* **133**, 184–196 (2005).
- Sweeney, R. W. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* **27**, 537–546 (2011).
- Cheng, A. C. *et al.* *CLEC9A* modulates macrophage-mediated neutrophil recruitment in response to heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
- Ott, S. L., Wells, S. J. & Wagner, B. A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* **40**, 179–192 (1999).
- Hasonova, L. & Pavlik, I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Vet. Med. (Praha)*. **51**, 193–211 (2006).
- Smith, R. L. *et al.* Effect of Johne's disease status on reproduction and culling in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **93**, 3513–3524 (2010).
- McAloon, C. G. *et al.* The effect of paratuberculosis on milk yield—A systematic review and meta-analysis. *J. Dairy Sci.* **99**, 1449–1460 (2015).
- Robertson, R., Hill, B., Cerf, O., Jordan, K. & Venter, P. A commentary on current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease and Crohn's disease: A review by Over *et al.* (2011). *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 183–184 (2012).
- Nielsen, S. S. & Toft, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* **88**, 1–14 (2009).
- Lombard, J. E. Epidemiology and Economics of Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* **27**, 525–535 (2011).
- Juste, R. A. *et al.* Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res. Notes* **2**, 233 (2009).
- Alonso-Hearn, M. *et al.* Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **95**, 618–629 (2012).
- Garrido, J. M. *et al.* Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One* **8**, 2–8 (2013).
- Groenendaal, H. *et al.* A simulation of Johne's disease control. *Prev. Vet. Med.* **54**, 225–245 (2002).
- Garry, F. Control of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.* **27**, 599–607 (2011).
- Kalis, C. H. J., Hesselink, J. W., Barkema, H. W. & Collins, M. T. Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **12**, 547–551 (2000).
- Nielsen, S. S. & Toft, N. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon- γ assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* **129**, 217–235 (2008).
- Capsel, R. T. *et al.* Composition and potency characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* purified protein derivatives. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
- Seth, M. *et al.* Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. *PLoS One* **4**, 4(5), e5478 (2009).
- Casey, M. E. *et al.* Analysis of the bovine monocyte-derived macrophage response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection using RNA-seq. *Front. Immunol.* **6**, 1–15 (2015).

23. Marino, R. *et al.* John's disease in cattle: an *in vitro* model to study early response to infection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using RNA-seq. *Mol. Immunol.* **91**, 259–271 (2017).
24. Hempel, R. J., Bannantine, J. P. & Stabel, J. R. Transcriptional profiling of ileocecal valve of Holstein dairy cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
25. Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M. & Gilad, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* **18**, 1509–17 (2008).
26. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–8 (2008).
27. Casas, E., Garcia, M. D., Wells, J. E. & Smith, T. P. L. Association of single nucleotide polymorphisms in the *ANKRA2* and *CD180* genes with bovine respiratory disease and presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Anim. Genet.* **42**, 571–577 (2011).
28. Cheriya, V., Leaman, D. W. & Borden, E. C. Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6–16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer. *J. Interf. Cytokine Res.* **31**, 173–181 (2010).
29. Tsuji, S. *et al.* Capture of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin by intelectin-1 deposited on cell surfaces. *Glycobiology* **19**, 518–526 (2009).
30. Xu, Z. & Jin, B. A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. *Cell. Mol. Immunol.* **7**, 11–19 (2010).
31. Guler, R., Roy, S., Suzuki, H. & Brombacher, F. Targeting *Batf2* for infectious diseases and cancer. *Oncotarget* **6**, 26575–26582 (2015).
32. Guler, R. *et al.* *Batf2* differentially regulates tissue immunopathology in Type 1 and Type 2 diseases. *Mucosal Immunol.* **12**, 390–402 (2019).
33. Sunil, Y., Ramadori, G. & Raddatz, D. Influence of *NF- κ B* inhibitors on *IL-1 β* -induced chemokine *CXCL8* and *-10* expression levels in intestinal epithelial cell lines: Glucocorticoid ineffectiveness and paradoxical effect of PDTC. *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 323–333 (2010).
34. Jennum, S. *et al.* Added value of *IP-10* as a read-out of *Mycobacterium tuberculosis* specific immunity in young children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **35**, 1336–1338 (2016).
35. Wang, S. *et al.* Evaluation of the diagnostic potential of *IP-10* and *IL-2* as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population. *PLoS One* **7**, 1–10 (2012).
36. Wang, S. *et al.* Evaluation of a whole blood chemiluminescent immunoassay of interferon-gamma inducible protein 10 (*IP-10*) for diagnosis of tuberculosis patients. *Clin. Lab.* **62**, 165–172 (2016).
37. Coad, M. *et al.* Simultaneous measurement of antigen-induced *CXCL10* and *IFN- γ* enhances test sensitivity for bovine TB detection in cattle. *Vet. Microbiol.* **230**, 1–6 (2019).
38. Purdie, A. C., Plain, K. M., Begg, D. J., de Silva, K. & Whittington, R. J. Expression of genes associated with the antigen presentation and processing pathway are consistently regulated in early *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **35**, 151–162 (2012).
39. Gijbbers, K. *et al.* *CXCR1*-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: Down-regulated *IL-8/CXCL8* production by leukocytes in Crohn's disease and selective *GCP-2/CXCL6* expression in inflamed intestinal tissue. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1992–2000 (2004).
40. Shukla, S. K. *et al.* Differential gene expression in *Mycobacterium bovis* challenged monocyte-derived macrophages of cattle. *Microbial Pathogenesis* **113**, 480–489 (2017).
41. Manna, S. K. & Ramesh, G. T. Interleukin-8 induces nuclear transcription factor- κ B through a *TRAF6*-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 7010–7021 (2005).
42. Luppi, F., Longo, A. M., de Boer, W. I., Rabe, K. F. & Hiemstra, P. S. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* **56**, 25–33 (2007).
43. Itoh, Y. *et al.* *IL-8* promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase- cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* **29**, 275–282 (2005).
44. Lin, J. *et al.* Transcriptome changes upon *in vitro* challenge with *Mycobacterium bovis* in monocyte-derived macrophages from bovine tuberculosis-infected and healthy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **163**, 146–156 (2015).
45. Rotta, G. *et al.* Contrasting roles of *SPARC*-related granuloma in bacterial containment and in the induction of anti-*Salmonella typhimurium* immunity. *J. Exp. Med.* **205**, 657–667 (2008).
46. De Buck, J., Shaykhtudinov, R., Barkema, H. W. & Vogel, H. J. Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *PLoS One* **9**, e111872 (2014).
47. Hare, N. J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection manipulates the glycosylation machinery and the N-Glycoproteome of human macrophages and their microparticles. *J. Proteome Res.* **16**, 247–263 (2017).
48. Woo, S. R., Barletta, R. G. & Czuprynski, C. J. ATP release by infected bovine monocytes increases the intracellular survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 365–377 (2009).
49. Johansen, M. D., de Silva, K., Plain, K. M., Whittington, R. J. & Purdie, A. C. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microb. Pathog.* **130**, 44–53 (2019).
50. Stabel, J. R., Reinhardt, T. A. & Hempel, R. J. Short communication: Vitamin D status and responses in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J. Dairy Sci.* **102**, 1594–1600 (2019).
51. Juste, R. A., Marco, J. C., Carmen, S. & Oc, D. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **28**, 385–390 (1991).
52. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **27**, 863–864 (2011).
53. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111 (2009).
54. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
55. Oshlack, A. & Wakefield, M. J. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biol. Direct* **4**, 1–10 (2009).
56. Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K. & Oshlack, A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* **11**, R14 (2010).
57. Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L. & Potier, M. C. Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: Which test? *Bioinformatics* **23**, 401–407 (2007).
58. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2018).
59. Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* **45**, D362–D368 (2017).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) and by European Funds for Regional Development (FEDER) (INIA RTA2014-00009-C02 and RTA2018-094192). The study is partially funded by the Principado de Asturias (PCTI 2018–2020, GRUPIN: IDI2018-000237). Maria Canive and Cristina Blanco-Vazquez are recipients of INIA fellowships. The authors thank ASTEGA Veterinary services for their assistance on sample collection. We are also grateful to Kyle Hearn for the careful editing of the manuscript.

Author Contributions

M.A.H. coordinated the project. M.A.H. and R.C. designed the experiments. R.C. and C.B.V. performed animal sampling. R.C., C.B.V., A.B. and J.A. performed diagnostic tests. R.T. and R.R. performed the RNA-sequencing at the Parque Científico de Madrid sequencing platform. B.M.J. and E.V.M. helped with the bioinformatics analysis. M.A.H. and M.C. interpreted all the results and drafted the manuscript. All the authors carefully read and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51328-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

SUPPLEMENTARY INFORMATION

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

Marta Alonso-Hearn ^{1*}, Maria Canive ¹, Cristina Blanco-Vazquez ², Rosana Torremocha ³, Ana Balseiro ², Javier Amado ⁴, Endika Varela-Martinez ⁵, Ricardo Ramos ³, Begoña M. Jugo ⁵ and Rosa Casais ²

1 NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Animal Health Department, Derio, Bizkaia, Spain,

2 SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Centro de Biotecnología Animal, Deva, Asturias, Spain,

3 Scientific Park of Madrid, Genomic Unit, Campus de Cantoblanco, Madrid, Spain,

4 LSAPA, Animal Health Laboratory of the Principality of Asturias, Department of Microbiology, Gijón, Asturias, Spain

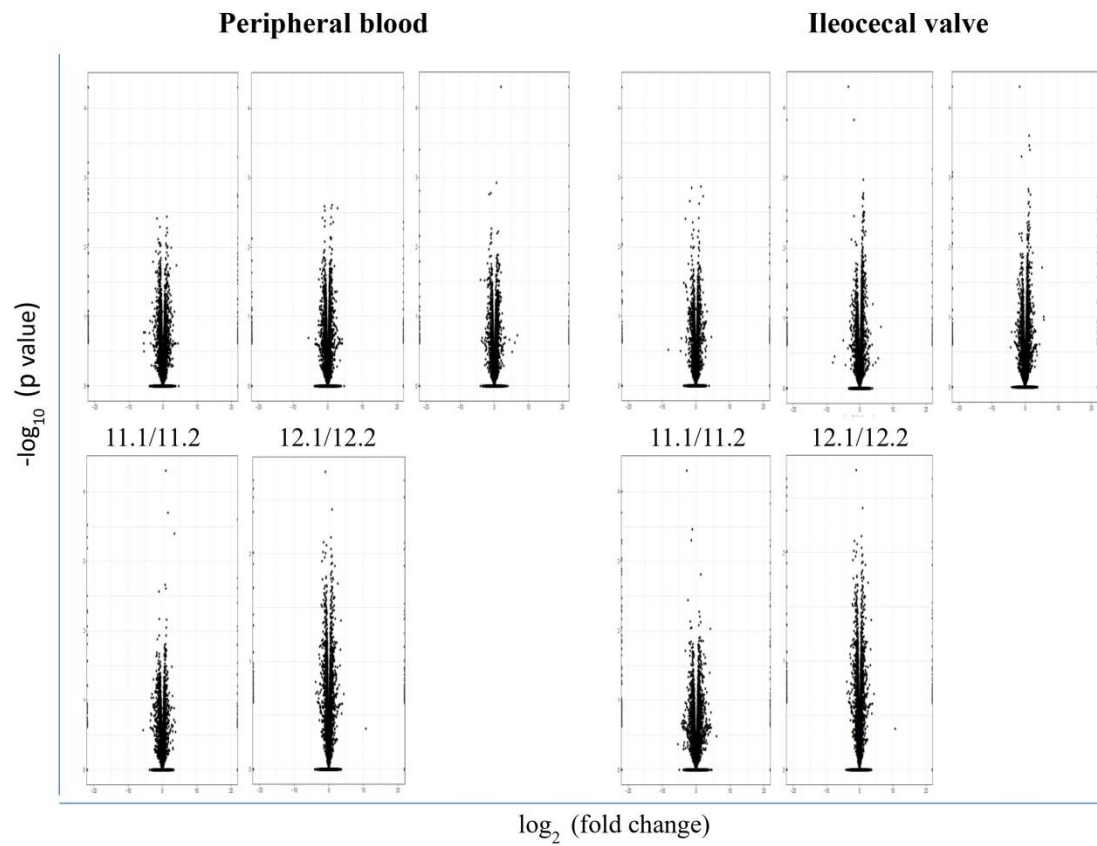
5 University of the Basque Country (UPV-EHU), Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, Faculty of Science and Technology, Bilbao

Supplementary Table 1. Biological samples and experimental replicates RNA Seq data.

Cow ID	Replicate	Sample	Total number of reads	Reds after trimming	Reads after mapping	Mapped reads (%)	Multiple alignments	Multiple alignments (%)
1	–	PB	25378997	25321021	23442982	92,6	1013576	4.0
1	–	ICV	22485395	22448313	20778436	92.6	960728	4.3
2	1	PB	27430862	26221879	24731206	94.3	1348272	5.5
2	2	PB	25423706	24274388	22928902	94.5	1175411	5.1
2	1	ICV	21955291	20865686	19323967	92.6	789040	4.1
2	2	ICV	20328572	19424275	18014936	92.7	883206	4.9
3	–	PB	26328834	26269342	24364551	92.8	1323677	5.0
3	–	ICV	22553960	22509141	20747321	92.2	1048927	4.7
4	–	PB	22298387	22246905	20498481	92.1	873110	3.9
4	–	ICV	21880358	21833012	20326901	93.1	965338	5.2
5	–	PB	26322126	26257852	23915158	91.1	965338	5.7
5	–	ICV	23278256	23231904	21264647	91.5	1096951	4.7
6	1	PB	20051147	17459925	16706238	95.7	1033345	6.2
6	2	PB	20309821	17681238	16935538	95.8	1097540	6.5
6	1	ICV	18754089	17915042	16608514	92.7	815870	4.9
6	2	ICV	20982964	20028587	18542443	92.6	1196745	6.5
7	–	PB	24093748	24039957	22311230	92.8	830200	3.5
7	–	ICV	20544146	20515344	18971171	92.5	927826	4.5
8	1	PB	20329228	17660831	16867545	95.5	770714	4.6
8	2	PB	21073654	18326128	17481457	95.4	762102	4.4
8	1	ICV	20096314	19197461	18004883	93.8	751745	4.2
8	2	ICV	23087897	21995135	20627314	93.8	829144	4.0
9	–	PB	15868370	15831194	14637126	92.5	810996	5.1
9	–	ICV	21946355	21902385	20028060	91.4	1008152	4.6
10	–	PB	23181092	22173624	20866802	94.1	1217332	5.8
10	–	ICV	17870903	17147527	15779357	92.0	816491	5.2
11	1	PB	29153476	27883749	26522168	95.1	1227177	4.6
11	2	PB	24411524	23359067	22248361	95.2	955078	4.3
11	1	ICV	17831469	17102361	15725642	92.0	806102	5.1
11	2	ICV	26194068	25092879	23191445	92.4	1253006	5.4
12	1	PB	19426072	16928040	16147240	95.4	1101792	6.8
12	2	PB	21180755	18462166	17604588	95.4	1177815	6.7
12	1	ICV	26198482	25071815	23346127	93.1	1286444	5.5
12	2	ICV	24072525	23043123	21436647	93.0	1245385	5.8
13	–	PB	19591604	19543700	17648053	90.3	993927	5.1
13	–	ICV	18725483	18661911	16790989	90.0	965338	5.2
14	–	PB	22205068	22154209	20330845	91.8	965338	5.2
14	–	ICV	25017698	24974498	22905236	91.7	1239203	5.0
Mean			22312176	21448832	19963224	93.1	1013904.8	5.0

PB: Peripheral blood; ICV: Ileocecal valve

Supplementary figure 1. Volcano plots showing the DE genes (\log_2 fold change versus $-\log$ (p value) for each sample and correspondent replica. The absence of red spots in the plots indicated the lack of DE genes between each sample and corresponding replica.



ESTUDIO II

**Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and
with the dysregulation of the *MECOM*, *eEF1A2*, and *U1 spliceosomal RNA*
expression**

Canive M, Fernandez-Jimenez N, Casais R, Vázquez P, Lavín JL, Bilbao JR, Blanco-Vázquez C, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M

Scientific Reports, 2021, 11(1):313

Índice de impacto: 4,379

Área: Multidisciplinar

Cuartil: Q1



OPEN Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the *MECOM*, *eEF1A2*, and U1 spliceosomal RNA expression

Maria Canive^{1,2}, Nora Fernandez-Jimenez³, Rosa Casais⁴, Patricia Vázquez^{1,5}, José Luis Lavín⁶, José Ramón Bilbao³, Cristina Blanco-Vázquez⁴, Joseba M. Garrido¹, Ramón A. Juste¹ & Marta Alonso-Hearn^{1✉}

Although genome-wide association studies have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection, only a few functional mutations for bovine paratuberculosis (PTB) have been characterized. Expression quantitative trait loci (eQTLs) are genetic variants typically located in gene regulatory regions that alter gene expression in an allele-specific manner. eQTLs can be considered as functional links between genomic variants, gene expression, and ultimately phenotype. In the current study, peripheral blood (PB) and ileocecal valve (ICV) gene expression was quantified by RNA-Seq from fourteen Holstein cattle with no lesions and with PTB-associated histopathological lesions in gut tissues. Genotypes were generated from the Illumina LD EuroG10K BeadChip. The associations between gene expression levels (normalized read counts) and genetic variants were analyzed by a linear regression analysis using *R Matrix eQTL 2.2*. This approach allowed the identification of 192 and 48 *cis*-eQTLs associated with the expression of 145 and 43 genes in the PB and ICV samples, respectively. To investigate potential relationships between these *cis*-eQTLs and MAP infection, a case-control study was performed using the genotypes for all the identified *cis*-eQTLs and phenotypical data (histopathology, ELISA for MAP-antibodies detection, tissue PCR, and bacteriological culture) of 986 culled cows. Our results suggested that the heterozygous genotype in the *cis*-eQTL-rs43744169 (T/C) was associated with the up-regulation of the MDS1 and EVI1 complex (*MECOM*) expression, with positive ELISA, PCR, and bacteriological culture results, and with increased risk of progression to clinical PTB. As supporting evidence, the presence of the minor allele was associated with higher *MECOM* levels in plasma samples from infected cows and with increased MAP survival in an ex-vivo macrophage killing assay. Moreover, the presence of the two minor alleles in the *cis*-eQTL-rs110345285 (C/C) was associated with the dysregulation of the eukaryotic elongation factor 1- α 2 (*eEF1A2*) expression and with increased ELISA (OD) values. Finally, the presence of the minor allele in the *cis*-eQTL rs109859270 (C/T) was associated with the up-regulation of the U1 spliceosomal RNA expression and with an increased risk of progression to clinical PTB. The introduction of these

¹Department of Animal Health, NEIKER- Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain. ²Doctoral Program in Immunology, Microbiology and Parasitology, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain. ³Department of Genetics, Physical Anthropology and Animal Physiology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Biocruces-Bizkaia HRI, Leioa, Bizkaia, Spain. ⁴SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Grupo NySA, Deva, Asturias, Spain. ⁵SALUVET-Innova S.L., Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. ⁶Department of Applied Mathematics, NEIKER-Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain. ✉email: malonso@neiker.eus

novel functional variants into marker-assisted breeding programs is expected to have a relevant effect on PTB control.

Paratuberculosis (PTB) is a gastrointestinal disease of domestic and wild ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB causes direct economic losses to the dairy farms due to decreased milk production, replacement cost, and premature culling or death from the clinical disease^{1,2}. The most common clinical signs are progressive weight loss, diarrhea, and decreased milk yield³. PTB is a major problem for animal health and must be notified to the World Organization for Animal Health. In addition, MAP is a suspected cause of Crohn's disease (CD) in humans⁴. Colorectal cancer is a complication of the two forms of idiopathic inflammatory bowel disease (IBD); colonic CD and ulcerative colitis. Interestingly, MAP bacilli have been detected in the intestines of patients with CD, ulcerative colitis, and IBD-associated colorectal cancer^{5,6}.

Improving host genetics through selective breeding could enhance natural resistance to MAP infection and complement existing control strategies^{7–9}. Over the last decade, different strategies including case–control studies in candidate genes and genome-wide association studies (GWAS) identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with susceptibility to bovine PTB^{10–16}. However, few SNPs were identified with consistent association across studies and the molecular mechanisms by which they contribute to disease remain largely unknown. Recent studies using RNA next-generation sequence technology (RNA-Seq) have been conducted to gain a better understanding of the molecular mechanisms involved in the circulating and local response against a natural MAP infection^{17–19}. While transcriptomic studies provide insight into the genes and mechanisms involved in the response to MAP infection, they do not reveal whether there is variation in the transcriptional response among individuals and how this might influence PTB outcome.

Jansen and Nap²⁰ introduced the concept of “genetical genomics” where genomic variants were associated with transcript abundance which acts as a heritable endophenotype. This concept supported the idea that integrating genomic variants and gene expression data could contribute to a better understanding of the genetic architecture underlying disease outcome (an endpoint phenotype)^{21,22}. Polymorphisms associated with gene expression are known as expression quantitative trait loci (eQTLs). In a *cis* position (within 1 Mb upstream of the transcription start site of a gene locus), *cis*-eQTLs might alter transcription regulation, mRNA stability, or mRNA splicing^{23,24}. This leads to changes in the level, timing, and/or localization of gene expression which can significantly influence variations in individual phenotype. In the current study, we hypothesized that individual genetic variation in the transcriptional response to PTB infection might have implications in disease outcome. The main objective was to identify *cis*-eQTLs significantly associated with changes in gene expression levels in peripheral blood (PB) and ileocecal valve (ICV) samples collected from Holstein cattle with no lesions and with PTB-associated lesions in gut tissues. Next, we assessed whether the genes with *cis*-eQTLs were DE in PTB-infected cows versus control cows. Finally, to test whether the identified *cis*-eQTLs affected not just gene expression but also the PTB risk, a case–control study using the genotypes of all the identified *cis*-eQTLs and the phenotypical data of a cohort of 986 culled cattle was performed. The workflow of the study is presented in Fig. 1.

Results

RNA-Seq data and genotypes. Samples from the animals included in this study were tested by ELISA for the detection of MAP-specific antibodies, qPCR for MAP DNA detection, bacteriological culture, and histopathological analysis, as previously described (Table 1)¹⁸. All control animals (N = 4) were negative for all the diagnostic tests. In contrast, the infected cows had detectable lesions in gut tissues with distinct severity; focal/multifocal (N = 6) or diffuse (N = 4). RNA-extraction from PB and ICV samples of the fourteen cows, RNA-Seq libraries preparation, and sequencing using an Illumina NextSeq500 sequencer were performed as previously described¹⁸. The raw reads were filtered by their length (minimum size 75 bp long) and percentage of ambiguous base N less than 10% using *Prinseq-lite 0.20.4*²⁵. Then, the trimmed sequences were mapped to the *Bos Taurus* reference genome (*Bos_taurus.UMD3.1*, version 87) with *TopHat 2.1.1*²⁶. In the current study, the mapped reads were quantified with *RSubread* to calculate gene expression levels (read counts)²⁷. In addition, genomic DNA was extracted from PB samples of the fourteen animals and subsequently genotyped using the Illumina MD EuroG10K BeadChip (54,609 SNPs) as previously described²⁸. Altogether the study is comprised of 54,609 genetic variants and expression values of 24,616 genes in 28 samples.

***cis*-eQTL analysis.** Gene expression data (read counts) were normalized with the mean-of-ratios method included in the *DESeq 2* package²⁹. Our integrated genomic-transcriptomic dataset was analyzed for associations between SNPs-normalized read counts using *R Matrix eQTL 2.2*³⁰ including the age of slaughter as a covariate. *Matrix eQTL* tests for associations between SNPs-normalized read counts by modeling the effect of genotype as additive linear (least square model). *cis*-eQTLs were identified by including all the variants on the same chromosome that are located 1 Mb upstream of the transcription start site (TSS) of a gene locus. A genetic variant was regarded as a significant *cis*-eQTL for a given gene if $P_{FDR} \leq 0.05$. For the PB samples, two analyses were performed including all the tested genetic variants located within 0.5 and 1 Mb upstream of the TSS of a gene locus; Fig. 2a,b respectively. Using the 24,616 mapped genes, we identified 96 and 192 *cis*-eQTLs which were associated with 76 and 145 genes, respectively. As expected, all the *cis*-eQTLs identified in the first analysis were validated when the analysis was extended 1 Mb upstream of the TSS of a gene locus. Using the ICV datasets, the SNPs-reads association analysis allowed the identification of 48 *cis*-eQTLs located within 0.5 Mb upstream of a TSS and associated with the expression of 43 genes (Fig. 2c). As expected, all the identified *cis*-eQTLs were located on the same chromosome as the associated gene. Most of the identified *cis*-eQTLs were located in intronic or

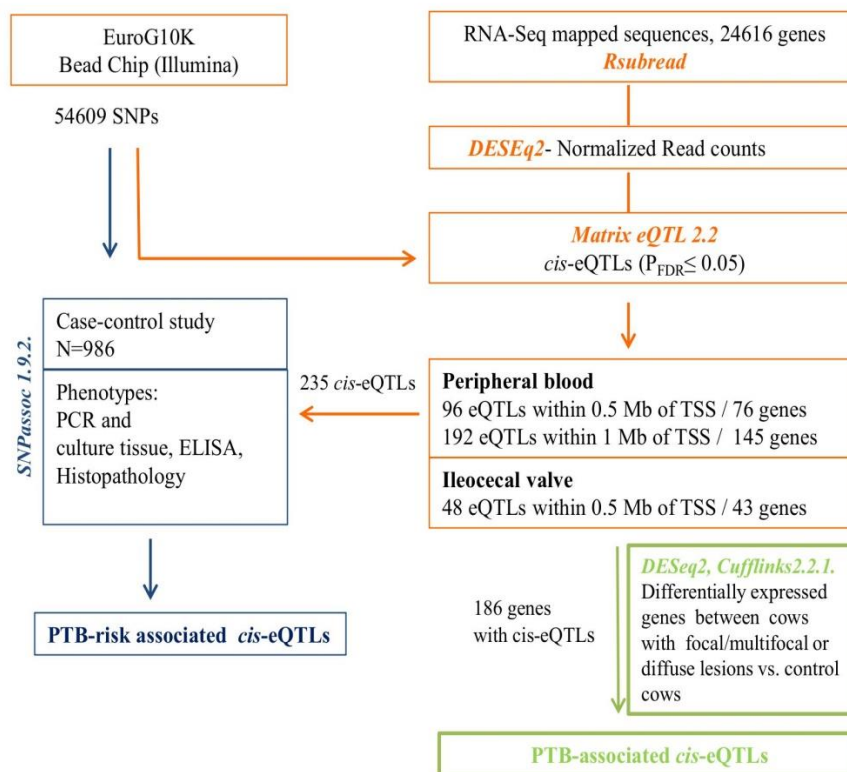


Figure 1. Study design. The approach starts from the individual expression levels, then identifies genetic variants controlling differences in gene expression, and finally checks that the identified *cis*-eQTLs are indeed associated with disease outcome.

Animal ID	Histopathological analysis			ELISA (OD)	Fecal PCR (DNA copies/g 10 ²)	Fecal culture	Tissue PCR (DNA copies/g 10 ²)	Tissue culture
	Macroscopic	Microscopic	ZN					
1	No	Negative	Negative	Negative (1.93)	Negative	Negative	Negative	Negative
2	No	Negative	Negative	Negative (8.54)	Negative	Negative	Negative	Negative
3	No	Negative	Negative	Negative (2.45)	Negative	Negative	Negative	Negative
15	No	Negative	Negative	Negative (1.72)	Negative	Negative	Negative	Negative
4	No	Focal	Negative	Negative (2.71)	Negative	Negative	Positive (0.38)	Negative
5	No	Focal	Negative	Negative (1.03)	Negative	Negative	Positive (7.50)	Low
6	No	Focal	Negative	Negative (5.51)	Negative	Negative	Positive (305.28)	Negative
7	No	Focal	Negative	Negative (0.74)	Negative	Negative	Positive (12.26)	Negative
8	No	Focal	Negative	Positive (133.17)	Positive	Negative	Positive (70.54)	Medium
9	No	Multifocal	Positive	Negative (2.97)	Negative	Negative	Negative	Negative
10	Yes	Diffuse	Positive	Positive (283.13)	Positive	Negative	Positive (667.65)	Heavy
11	Yes	Diffuse	Positive	Positive (187.69)	Positive (0.14)	Negative	Positive (3896.19)	Heavy
12	Yes	Diffuse	Positive	Positive (241.18)	Positive (114.00)	Heavy	Positive (104,032)	Heavy
14	Yes	Diffuse	Positive	Positive (255.55)	Positive (2832.00)	Negative	Positive (173,316.00)	Heavy

Table 1. Histopathological analysis, ELISA, PCR, and bacteriological culture results from all the animals included in the current study. DNA samples with a PCR-positive result using the LSI VetMax Triplex real-time PCR were quantified using the ParaTB Kuantu-VK kit. qPCR results are expressed as MAP DNA copies per gram of feces or tissues $\times 10^2$. Bacterial load was classified as low (<10 CFU), medium (between 10 to 50 CFU) or heavy (> 50 CFU). ZN Ziehl-Neelsen, OD optical density, CFU colony forming units.

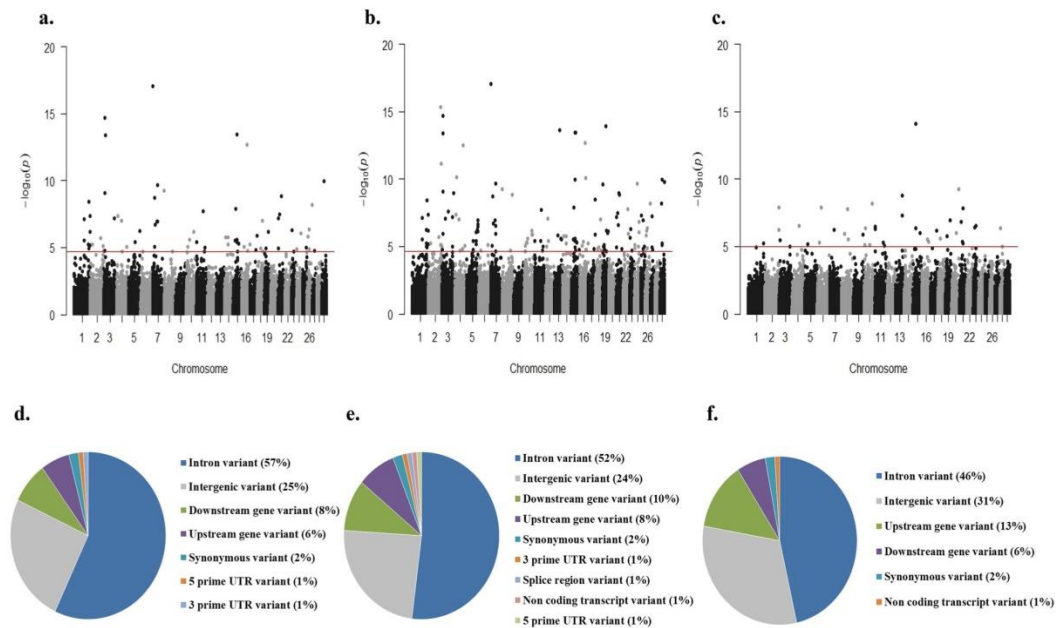


Figure 2. *cis*-eQTL analysis. (a,b) PB *cis*-eQTLs identified within 0.5 (a) and 1 Mb (b) upstream of a TSS. (c) ICV *cis*-eQTLs identified within 0.5 Mb upstream of a TSS. The plots show the $-\log_{10}$ (P-values) of the most significant variants for each of the 24,616 analyzed genes. The red line represents the threshold of $P=2.03E-05$ (a), $P=2.14E-05$ (b) and $P=1.02E-05$ (c). (d,e) The chart depicts the genomic distribution of the PB-*cis*-eQTLs identified within 0.5 (d) and 1 Mb (e) upstream a TSS according to the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). (f) Genomic distribution of the ICV *cis*-eQTLs according to the VEP.

intergenic regions (Fig. 2d–f). The complete *cis*-eQTL discovery in the PB and ICV samples is presented in Tables S1–S3.

The *cis*-eQTL (rs109475758) with the lowest P_{FDR} ($P_{FDR}=4593E-14$) in the PB dataset was associated with the *obscurin* (*OBSC*) gene (Table S1), a highly mutated gene in different types of cancer. The rs109475758 heterozygous genotype (T/G) resulted in increased counts of the *OBSC* gene while the most frequent homozygous genotype (T/T) correlated with low levels of *OBSC* gene expression (Fig. 3a). In the ICV samples, the gene with the strongest *cis*-eQTL (rs41753850) association was the *apolipoprotein A4* gene (*APOA4*; $P_{FDR}=8413E-11$) (Table S3). *APOA4* is associated with circulating high-density lipoproteins (HDL) and plays an important role in cholesterol transport and lipid metabolism. Interestingly, the rs41753850 was also associated with the *apolipoprotein C3* (*APOC3*) gene expression ($P_{FDR}=0.0031$). *APOC3* plays an important role in regulating the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and has been regarded as a main component of chylomicrons and very-low-density lipoproteins (VLDL). The heterozygous genotype in the rs41753850 (C/A) resulted in increased levels of *APOA4* and *APOC3* expression, while the most frequent homozygous (C/C) correlated with lower levels of *APOA4* and *APOC3* gene expression (Fig. 3b,c).

Association between the genes with *cis*-eQTLs and MAP infection. We assessed whether the genes with *cis*-eQTLs were DE in PTB-infected cows versus controls (Table 2) using the differential expression information generated with the *Cufflinks* package 2.2.1. in our previous study¹⁸ and with *DESeq2* in the current study. Despite the small number of control cows, we found that 24 of the genes with *cis*-eQTLs were DE in the PB samples from MAP-infected cows with focal/multifocal ($N=6$) or diffuse lesions ($N=4$) versus control cows ($N=4$) (Table 2). Some of these *cis*-eQTLs-associated genes play key roles in tumorigenicity (*OBSC*, *GSTO1*), the apoptotic process (*CD5L*, *BNIP3*), transcription regulation (*PERM1*), cell adhesion (*NRCAM*), platelet aggregation (*GP1B β* , *MRVII*), G-protein coupled receptor signaling pathway (*ADCY8*, *ACKR1*), lymphocyte activation (*HS1BP3*), adhesion of blood neutrophils in cytokine-activated endothelium (*Selectin E*) and in the regulation of hypoxia-induced autophagy (*ANKRD37*) in MAP-infected cattle. In addition, we found that fourteen genes with *cis*-eQTLs were DE in the ICV samples from MAP-infected cows with focal/multifocal or diffuse lesions versus control cows (Table 2). Some of these *cis*-eQTLs-associated genes play key roles in the extracellular matrix structure (*ACAN*), negative regulation of *NF- κ B* (*TRIM40*), innate immune response (*NEURL3*, *ARSB*, *Duosenase-1 like*), tumorigenicity (*PROM2*), G-protein coupled receptor signaling pathway (*ACKR1*), and oxidative stress (*PRDX1*) in MAP-infected cattle.

To identify common biological functions, enrichment analysis of biological processes was performed with the *cluster Profiler Bioconductor package* 3.10.1.³¹ using all genes with *cis*-eQTLs. The rationale is that any change

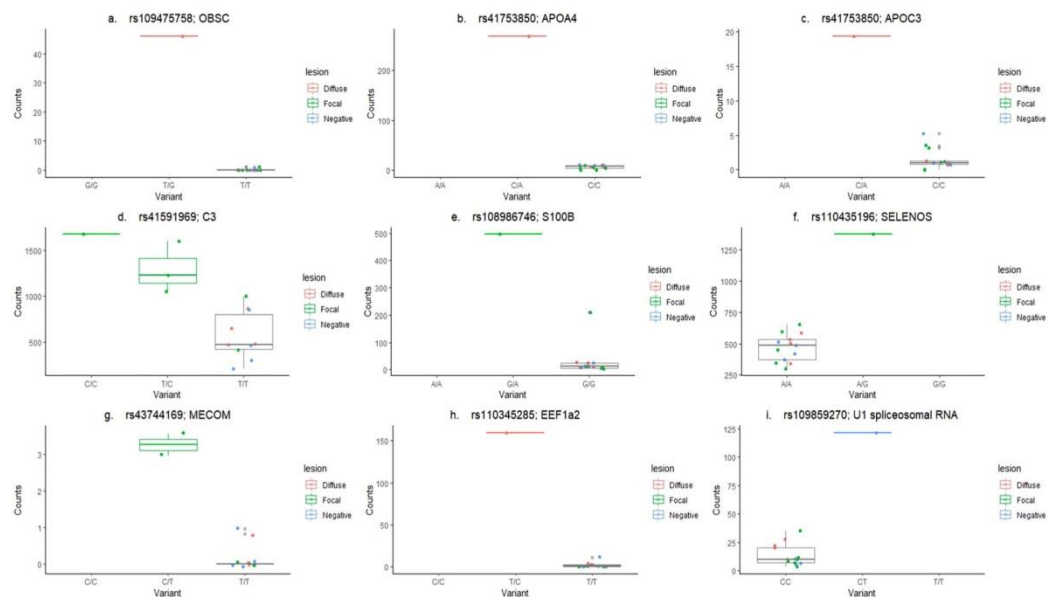


Figure 3. Boxplots for nine significant *cis*-eQTLs associations with gene expression. The rs109475758 (a), rs41753850 (b,c), rs41591969 (d), rs108986746 (e), rs110435196 (f), rs43744169 (g), rs110345285 (h) and rs109859270 (i) were associated with the *OBSC*, *APOA4*, *APOC3*, *C3*, *S100B*, *SELENOS*, *MECOM*, *EEF1A2* and U1 spliceosomal RNA expression, respectively. Gene variants are presented on the horizontal axis and gene expression levels, normalized gene counts, on the vertical axes. Samples were grouped according to the absence of lesions (negative) or the presence of focal/multifocal and diffuse lesions in gut tissues. The median and the upper and lower quartiles of each group are represented by horizontal and vertical lines, respectively. The lowest point is the minimum of the data set and the highest point is the maximum of the data set.

to a single gene involved in a process could alter many genes in a biological process and thus the phenotype of the animal. Gene ontology enrichment analysis indicated that three genes (*C3*, *S100B*, *SELENOS*) with *cis*-eQTLs were associated with the regulation of acute inflammatory response (GO:002673) which was significantly enriched ($P_{FDR} \leq 0.05$). The heterozygous genotype in the *cis*-eQTLs of the *C3* (Fig. 3d), *S100B* (Fig. 3e), and *SELENOS* (Fig. 3f) genes resulted in higher gene expression levels; $P_{FDR} = 0.0254$, $P_{FDR} = 0.0315$ and $P_{FDR} = 0.0320$, respectively. In addition, the functional analysis revealed that the cholesterol metabolic route (bt04979) was significantly enriched, with the *APOA4* and *APOC3* genes involved in this route ($P_{FDR} = 0.009$, Gene ratio: 2/46). This finding reinforced the idea that the *APOA4*-*APOC3* gene cluster may be associated with the PTB risk.

Case-control association study. If the expression levels of a *cis*-eQTL have any effect on the PTB risk, we should observe differences in disease phenotypes among the different genotypes. To address this hypothesis, a case-control association study using the genotypes for the 235 identified *cis*-eQTLs and phenotypical data of 986 cull Holstein Friesian cows was performed. The infection status of these cows was previously determined by histopathological analysis, ELISA, PCR, and bacteriological culture³². Cattle were classified as cases if they were positive for ELISA, PCR culture, and/or if they had PTB-associated lesions in gut tissues. The 986 cows were genotyped for the identified *cis*-eQTLs and cows with a genotyping rate < 80% were excluded. SNPs deviated significantly from the Hardy-Weinberg equilibrium were removed³³. Case-control associations were analyzed with the *WG*association function of *SNPassoc 1.9.2* under five different genetic models (co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive)³⁴. P-values were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction. As seen in Table 3, the rs43744169, rs110345285, and rs109859270 showed significant associations with PTB phenotypes. The association analysis using the *cis*-eQTLs identified with the PB dataset and a minor allele frequency (MAF) > 20% revealed significant associations between the *cis*-eQTL-rs43744169 (T/C) located on chromosome 1 and several disease phenotypes including histopathology, ELISA (OD), and ELISA, PCR, and bacteriological culture results. The heterozygous genotype (T/C) in the *cis*-eQTL-rs43744169 was associated with the up-regulation of the MDS1 and EVII complex (*MECOM*) expression (Fig. 3g; $P_{FDR} = 0.00003$).

Using a MAF > 10%, an association between the *cis*-eQTL-rs110345285 (T/C) and mean ELISA (OD) values was observed under the codominant and recessive genetic models. The presence of the two minor alleles in the *cis*-eQTL-rs110345285 (C/C) regulating the eukaryotic elongation factor 1- $\alpha 2$ (*EEF1A2*) expression was associated with a significant increase in mean OD values (OD = 0.80) when compared with cows with the most frequent homozygous genotype (T/T) (OD = 0.29) or with the heterozygous genotype (T/C) (OD = 0.26). The heterozygous genotype in the *cis*-eQTL-rs110345285 (T/C) was associated with the up-regulation of the *EEF1A2* expression

Dataset	eQTL	Gene	Cufflinks 2.2.1-fold change (log ₂)		DESeq2-fold change (log ₂)	
			Focal vs control	Diffuse vs control	Focal vs control	Diffuse vs control
PB	rs109475758	<i>Obscurin (OBSC)</i>		5.6		
	rs29014816	<i>CD5 molecule like (CD5L)</i>			-3.6	-4.2
	rs109079658	<i>PPARGC1 and ESRR induced regulator (PERM1)</i>		4.7		
	rs109744678	<i>BCL2 interacting protein 3 (BNIP3)</i>				-1.9
	rs41587635	<i>Neuronal cell adhesion molecule (NRCAM)</i>	1.7			
	rs110756953	<i>Glycoprotein Ib platelet subunit beta (GB1BB)</i>		-1.8	-1.7	
	rs109820008	<i>Adenylate cyclase 8 (ADCY8)</i>		1.7		
	rs109230217	<i>Desmin (DES)</i>		4.1		3.7
	rs108972532	<i>Desmin (DES)</i>		4.1		3.7
	rs110397138	<i>Murine retrovirus integration site 1 (MRV1)</i>	-1.4	-1.8		
	rs41665220	Protein coding (ENS-BTAG00000009359.6)		-1.2		
	rs109535431	<i>Calpain 5 (CAPN5)</i>		-1.2		-2.0
	rs110203175	<i>Chimerin 1 (CHN1)</i>		-2.5		
	rs41658581	<i>Calpain 2 (CAPN2)</i>		-0.6		
	rs41591969	<i>Complement C3</i>	1.0		1.3	
	rs108986746	<i>S100 calcium binding protein B (S100B)</i>		-2.1		
	rs110435196	<i>Selenoprotein S (SELENOS)</i>	-0.8	-0.7		
	rs42094373	<i>Glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1)</i>				3.0
	rs110866743	<i>HCLS1 binding protein 3 (HSIBP3)</i>		-0.9		
	rs41579631	<i>Selectin E (SELE)</i>		-2.8		
	rs41636355	<i>Selectin E (SELE)</i>		-2.8		
	rs41646333	<i>Epiregulin (EREG)</i>		-4.8		
	rs110380638	<i>Ankyrin repeat domain 37 (ANKRD37)</i>	-2.0	-2.4		
rs109003203	<i>N-acetylneuraminatase pyruvate lyase (NPL)</i>	-2.7				
ICV	rs41753850	<i>Apolipoprotein A 4 (APOA4)</i>		4.0		3.6
	rs109464338	<i>Kelch domain containing 7A (KLHDC7A)</i>	2.0			
	rs41621303	<i>Aggrecan (ACAN)</i>				-2.5
	rs111006498	<i>Tripartite motif containing 40 (TRIM40)</i>		3.0		
	rs29014822	<i>Neutralized E3 ubiquitin protein ligase 3 (NEURL3)</i>				3.4
	rs41257569	<i>Arylsulfatase B (ARSB)</i>	-0.8			
	rs41753850	<i>Apolipoprotein C3 (APOC3)</i>		4.2		4.5
	rs43708883	<i>Actinin alpha 2 (ACTN2)</i>		-2.1		
	rs110406596	<i>Prominin 2 (PROM2)</i>				-2.5
	rs109082401	<i>TLC domain containing 2 (TLCD2)</i>	-2.0	-2.8		
	rs109080794	<i>Metallothionein 1E (MT1E)</i>		3.8		2.6
	rs109502147	<i>Atypical chemokine receptor 1 (ACKR1)</i>	-0.8	-1.2		-2.0
	rs41976219	<i>Duodenase-1-like (LOC786126)</i>	-3.6	-2.0		
	rs42581502	<i>Peroxisomal protein 1 (PRDX1)</i>		-0.7		

Table 2. Genes with cis-eQTLs that are differentially expressed in response to MAP infection.

when compared with cows with the most frequent homozygous genotype (T/T) (Fig. 3h; $P_{FDR} = 1.23E-10$). Using the ICV-identified cis-eQTLs and a MAF > 10%, a significant association between the cis-eQTL-rs109859270 (C/T) and the absence or presence of PTB-associated lesions was observed. The heterozygous genotype in the cis-eQTL-rs109859270 (C/T) located in the bovine chromosome 8 was associated with higher expression levels of the U1 spliceosomal RNA (Fig. 3i; $P_{FDR} = 0.0068$).

Sample	eQTL	Phenotype	SNPassoc1.9.2-P values ^a				
			Codominant	Dominant	Recessive	Overdominant	Log-additive
PB	rs43744169 (T/C)	Histopathology ^b	0.00011	0.00209	0.00028	0.09028	0.00011
		ELISA (OD)	0.00003	0.00059	0.00021	0.04284	0.00002
		ELISA + PCR + Cultive	0.00026	0.00012	0.01932	0.00494	0.00005
	rs110345285 (T/C)	ELISA (OD)	0.00007	0.81100	0.00001	0.26584	0.16103
ICV	rs109859270 (C/T)	Histopathology ^c	0.00226	0.00049	0.45219	0.00098	0.00112

Table 3. Associations between the rs43744169, rs110345285, rs109859270, and PTB diagnostic results. ^aStatistically significant P-values after Bonferroni correction are shown in bold. ^bPTB-associated histopathological lesion were classified as focal, multifocal, diffuse paucibacillary, diffuse intermediate, diffuse multibacillary. ^cPresence or absence of PTB-histopathological lesions.

Sample	eQTL	Phenotype	Genetic model	Genotype	Phenotype frequency		OR (95% CI)
					Case (%)	Control (%)	
PB	rs43744169 (T/C)	ELISA/tissue PCR/tissue culture	Co-dominant	TT	22 (39.3)	592 (63.7)	1.00
				TC	27 (49.1)	308 (33.1)	2.71 (1.50–4.88)
				CC	6 (10.7)	31 (3.3)	5.36 (1.99–14.41)
			Dominant	TT	22 (39.3)	592 (63.7)	1.00
				TC-CC	33 (60)	339 (36.4)	2.98 (1.70–5.24)
			Log-additive	0,1,2	55(5.7)	931 (94.3)	2.45 (1.63–3.74)
ICV	rs109859270 (C/T)	Histopathology	Co-dominant	CC	279 (63.0)	367 (73.4)	1.00
				CT	148 (33.4)	119 (23.8)	1.65 (1.23–2.19)
				TT	16 (3.6)	14 (2.8)	1.54 (0.74–3.22)
			Dominant	CC	279 (63.0)	367 (73.4)	1.00
				CT-TT	164 (37.0)	133 (26.6)	1.64 (1.24–2.16)
			Recessive	CC-CT	427 (96.4)	486 (97.2)	1.00
				TT	16 (3.6)	14 (2.8)	1.32 (0.64–2.75)
			Log-additive	0,1,2	443 (47.0)	500 (53.0)	1.49 (1.17–1.89)

Table 4. Frequencies of the rs43744169 and rs109859270 genotypes and the odds ratio for each genetic model. PB peripheral blood, ICV ileocecal valve, OR odds ratio, 95% CI 95% confidence interval.

The distribution of the rs43744169 and rs109859270 genotypes and odds ratio (OR) for each statistically significant genetic model and binary phenotype are presented in Table 4. For the rs43744169, the OR with 95% confidence interval (CI) under the codominant genetic model for the T/C and C/C genotypes versus the T/T genotype were 2.71 (95% CI 1.50–4.88) and 5.36 (95% CI 1.99–14.41) respectively. These results indicated that the proportion of T/C heterozygotes and C/C homozygotes with a positive ELISA, culture, and PCR result were significantly higher in the cases as compared to control cows. Under the dominant model, the genotypes T/C and C/C increased the risk of PTB compared to the genotype T/T; OR = 2.98 (95% CI 1.70–5.24). For the rs109859270 locus, the OR for the C/T and T/T genotypes versus the C/C genotype was 1.64 (95% CI 1.24–2.16), which indicated that the proportion of animals with one or two copies of the minor allele was significantly higher in animals with PTB-associated lesions as compared to control animals without lesions. Overall, the presence of the minor alleles in the rs43744169 and rs109859270 increased the PTB risk. Consequently, selecting against the rs43744169 and rs109859270 minor alleles may reduce the risk of PTB in cattle.

The presence of the minor allele in the cis-eQTL-rs43744169 (T/C) resulted in increased MECOM protein levels. The heterozygous genotype (T/C) in the cis-eQTL-rs43744169 was associated with higher MECOM gene expression levels (Fig. 3g, $P_{FDR} = 0.00003$). Using a bovine MECOM quantitative sandwich ELISA, we tested the MECOM protein levels in plasma samples from cows with focal lesions in gut tissues and with the three different rs43744169 genotypes (T/T, T/C, C/C). As seen in Fig. 4, the heterozygous (T/C) genotype and the minor allele homozygous (C/C) genotype were associated with significantly higher MECOM protein expression (19.60 and 8.62 ng/ml, respectively) compared with the concentration of MECOM in plasmas from cows with the major allele homozygous genotype (T/T, 3.90 ng/ml). This finding confirmed that increases in MECOM gene counts did correlate with higher levels of protein expression.

Association between MAP survival and the cis-eQTL-rs43744169 genotypes using a macrophage killing assay. The association between susceptibility to MAP and the cis-eQTL-rs43744169 genotypes (T/T and T/C) was tested using an ex vivo monocyte-derived macrophages (MDM) killing assay. MDM were purified from peripheral blood of uninfected Holstein cattle with the cis-eQTL-rs43744169 genotypes T/T (N=8) and T/C (N=8) and infected in vitro with a virulent strain of MAP (K10 isolate). Bacterial load (log

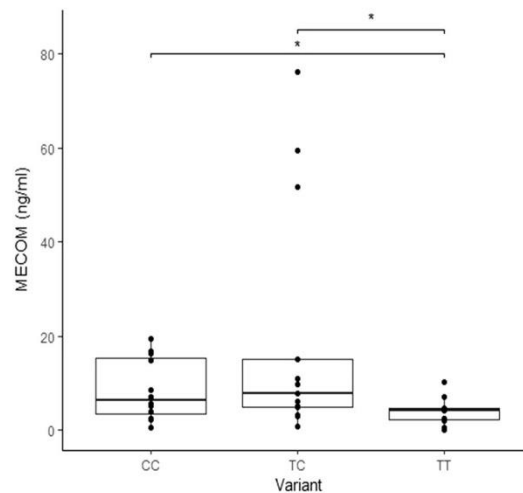


Figure 4. The *MECOM* expression is associated with the rs43744169. *MECOM* protein levels in plasmas from homozygous and heterozygous cows in the rs43744169 were measured with a bovine ELISA. Samples were selected from the case–control population and grouped according to the rs43744169 genotypes. Cows with the alleles T/C (N = 13) and C/C (N = 12) were associated with elevated *MECOM* protein levels when compared with the *MECOM* levels in the plasmas from cows with the two major alleles T/T (N = 11); $P = 0.05$ and $P = 0.03$, respectively. The median and the upper and lower quartiles of each group are represented by horizontal and vertical lines, respectively. The lowest point is the minimum of the data set and the highest point is the maximum of the data set. P-values were calculated using an unpaired t-test. *P-value ≤ 0.05 . Each sample is represented by a circle on the dot plot.

rs43744169	Mean log CFU-2 h p. i. (SD)	Mean log CFU-7 days p. i. (SD)	Ratio (%)	MAP survival index (SD)	P-value
T/T	4.90 (0.08)	3.51 (0.14)	71	8.46 (0.17)	0.020
T/C	4.77 (0.14)	3.53 (0.11)	74	8.60 (0.15)	

Table 5. Genotype effect on MAP survival using a macrophage killing assay. SD standard deviation, CFU colony forming units.

colony-forming units, log CFU) at 2 h and 7 days post-infection (p. i.) was estimated as previously described³⁵. The genotype T/T showed higher MAP uptake at 2 h p.i. ($P = 0.0031$) and more successful MAP killing at 7 days p.i. when compared with the T/C genotype ($P = 0.020$) (Table 5). These results suggested a significant effect of the *cis*-eQTL-rs43744169 heterozygous genotype on bacterial survival within macrophages and confirmed that *cis*-regulatory variation modulates susceptibility to MAP infection.

Discussion

The association between expression and genotype can be tested using linear regression and ANOVA models, as well as non-linear techniques including generalized linear and mixed models, Bayesian regression, and models accounting for pedigree³⁰. In the current study, we integrated gene expression data quantified by RNA-Seq and SNP data for a cohort of cows naturally exposed to MAP infection and maintained in the same environment. Using linear regression analysis, we identified 192 and 48 *cis*-eQTLs associated with the expression of 145 and 43 genes in PB and ICV, respectively. Only one of the identified *cis*-eQTLs, the rs109604269 ($P_{FDR} = 0.011$), was previously found to be associated with susceptibility to MAP infection³⁶. Although the number of individual samples in this first part of the study was limited (N = 28), three of the identified *cis*-eQTLs were associated with PTB susceptibility in a larger cattle population (N = 986). Our study provides first insights into the role of *cis*-eQTLs in gene transcription regulation and PTB susceptibility. Since RNA-Seq technology is becoming increasingly affordable and provides direct information on the presence of genetic variations at the sequence level, further studies should be directed to call SNPs from RNA-Seq data. This approach would provide a secondary confirmation of the *cis*-eQTLs identified in the current study.

Functional analysis of the 235 genes under *cis*-regulation revealed that there was a significant enrichment of the regulation of the acute inflammatory response (GO:0002673) with three genes (*C3*, *S100B*, *SELENOS*) involved in this biological process. Heterozygosity in the *cis*-eQTLs regulating these three genes resulted in increased *C3*, *S100B*, and *SELENOS* expression. Higher *C3* levels may allow increased opsonophagocytosis and effective bacterial clearance of several microorganisms including mycobacteria³⁷. *SELENOS* is involved in the degradation process of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum, and may also have a role in inflammation control³⁸. Since inflammation control depends largely on the recruitment of granulocytes (i.e., neutrophils,

eosinophils, and basophils) to the inflammatory site, chemokine signaling is involved in this process. Neutrophils then secrete antibacterial proteins such as the *S100* family to destroy microbes. It is well recognized that chronic inflammatory diseases develop only when prompt and active innate immunity mechanisms, like granulocytes recruitment to the sites of infection, are ineffective or defective³⁹. In fact, our recent RNA-Seq analysis from PB samples of Holstein cattle infected with MAP revealed down-regulation of the *C3*, *S100B*, *SELENOS* genes, and of the *CXCL8/IL8* signaling pathway, a pathway involved in neutrophils recruitment and resolution of inflammation¹⁸. Similarly, patients with CD have decreased secretion of *CXCL8/IL8* and reduced neutrophils migration to the sites of infection compared with healthy individuals⁴⁰. The results presented in the current study provide evidence that genetic variants in regulatory regions (*cis*-eQTLs) can up-regulate the *C3*, *S100B*, and *SELENOS* gene expression which might activate a prompt resolution of the infection. However, we did not find any association between the *cis*-eQTLs regulating the *C3*, *S100B*, and *SELENOS* gene expression and PTB resistance in our case–control study. Further studies are needed to make sure that the regulation of the *C3*, *S100B*, and *SELENOS* gene expression has not a functional role in PTB resistance or tolerance.

When a functional analysis with the identified *cis*-regulated genes was performed, the cholesterol metabolic route (bta04979) was significantly enriched with the apolipoproteins *APOA4* y *APOC3* involved in this route ($P_{FDR} = 0.009$, Gene ratio: 2/46). The genes coding for the *APOA1* and *APOC3* are closely linked on the bovine chromosome 15 and have synergistic functions. We found that the heterozygous genotype in the rs41753850 (C/A) resulted in higher levels of *APOA4* and *APOC3* expression, while its absence correlated with lower levels of gene expression. Recent reports have demonstrated that MAP can manipulate the host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages which might favor MAP persistence⁴¹. Our results reinforce the notion that the lipoprotein metabolism plays an important role in PTB pathogenesis and that PTB-susceptible cows might carry alleles that increase lipoprotein production and transport. Consequently, *cis*-eQTLs associated with the *APOA4* and *APOC3* gene expression may be associated with the PTB risk. In humans, genetic variants in the *APOA1*–*APOC3*–*APOA4* cluster has been associated with the risk of Alzheimer disease, polycythemia induced gastric injury, and metabolic syndrome^{42–44}. However, we did not find any association between the *cis*-eQTLs regulating *APOA4* and *APOC3* gene expression and PTB risk in our case–control study.

Although the number of normalized reads was low, *Matrix eQTL* found a significant association between the rs43744169 (T/C) and the *MECOM* gene expression ($P_{FDR} = 0.00003$). Next, we found that the presence of the minor allele in the rs43744169 (T/C) was associated with positive ELISA, PCR, and bacteriological culture results, and with increased risk of clinical PTB. Since our findings provided compelling evidence for the critical role of the *MECOM* in the progression to clinical PTB, it was prioritized in functional studies. Using a *MECOM* quantitative ELISA, we observed that the presence of the minor allele in the rs43744169 was associated with higher levels of the *MECOM* protein in plasma samples from infected cows and with increased MAP survival in an ex vivo macrophage killing assay. These findings should be confirmed in a larger population study and, additionally, by performing in vivo challenges. Allelic variants affecting the human *MECOM* gene have been associated with human inflammatory bowel disease⁴⁵. Mutations resulting in aberrant expression of the *MECOM* have also been found in many types of solid cancers, including colorectal cancer, as well as in acute myeloid leukemia^{46,47}. Previous scientific evidence showed that the *MECOM* acts as an oncogene regulating signaling pathways that lead to increased tumor proliferation⁴⁸. More specifically, cell line assays have demonstrated a role for the *MECOM* in the transcriptional control of *c-fos*, transforming growth factor β (*TGF- β*) and the *activator protein 1* (*API*) proliferative pathway⁴⁹. The *MECOM* also binds to the promoter regions of the majority of genes involved in the *JAK-STAT* signaling pathway⁵⁰. Excessive *JAK-STAT* signaling activation results in numerous inflammatory and hematopoietic disorders. Recent findings indicate that the *MECOM* is up-regulated by inflammatory stimuli, including bacteria, and that mutations in the *MECOM* made mice more susceptible to bacterial infections⁵¹. The *MECOM* has also a recognized function as a crucial regulator of the nuclear factor-kappa β (*NF- κ B*)-mediated inflammatory response⁵². *NF- κ B* is a critical factor in the gut immune responses to pathogens and in promoting inflammation-associated carcinoma in the gastrointestinal tract⁵³. Our findings suggest that genetic variants in a *cis*-eQTL affecting the expression of the *MECOM*, a transcriptional regulator of the *NF- κ B* inflammatory response, may cause an uncontrolled and aberrant inflammatory response which might exacerbate tissue injury in PTB-infected cattle. This is in agreement with Kiser et al., who found an association between seven genes linked to the *NF- κ B* pathway (*DUSP10*, *IKBKB*, *NR4A1*, *PRKCA*, *SLC2A5*, *TGFB2*, and *PIK3R1*) and MAP tissue infection in two Holstein populations using gene set enrichment analysis-SNP (GSEA-SNP)¹⁶.

Our case–control association study revealed a second *cis*-eQTL, the rs110345285 (T/C), associated with the up-regulation of the *eEF1A2* gene expression and with high levels of MAP antibodies. More specifically, increased ELISA (OD) values were associated with the less frequent homozygous genotype (C/C) in the *cis*-eQTL-rs110345285. The *eEF1A2* is a protein translation factor involved in protein synthesis and with important anti-apoptotic, migration and pro-metastasis functions on cancer development^{54,55}. Mechanistic studies revealed that the *PI3K/Akt/NF- κ B* and *JAK/STAT* signaling pathways play an important role in mediating the effects of the *eEF1A2*⁵⁶. *eEF1A2* expression increases the formation of filopodia structures that have an important role in driving cell migration and invasion⁵⁷. High *eEF1A2* expression is associated with severe tumor grades and metastasis in several cancer cell lines and with some cases of multiple myeloma, a plasma cell neoplasm of humans⁵⁸. Furthermore, the *eEF1A2* blocks apoptosis and favors viral replication⁵⁹. In agreement with this, our results suggested that PTB-infected cows carrying the risk allele in the rs110345285 (C) and exhibiting high levels of *eEF1A2* might have a reduced probability of survival compared to their non-*eEF1A2*-expressing counterparts.

Our case–control association analysis revealed a third significant association between the *cis*-eQTL-rs109859270 (C/T) and the absence or presence of PTB-histopathological lesions. For the rs109859270 locus, the OR for the C/T and T/T genotypes versus the C/C genotype was 1.64 (95% CI 1.24–2.16), which indicated that the proportion of animals with one or two copies of the minor allele were significantly higher in animals with PTB-associated lesions as compared to control animals without lesions. In addition, the heterozygous genotype

in the *cis*-eQTL-rs109859270 was associated with the up-regulation of the U1 spliceosomal RNA expression. Splicing is performed by a spliceosome that assembles on each intron and predominantly comprises U1, U2, U4, and U5, and U6 uridyl-rich small nuclear RNPs (snRNPs) in equal stoichiometry^{60,61}. U1 snRNPs plays an essential role in defining the 5' end splice site by RNA-RNA base pairing. Besides its splicing role, U1 snRNPs protects pre-mRNAs from drastic premature termination by premature cleavage and polyadenylation (PCPA) at more proximal alternative polyadenylation sites, which has already been proved in activated immune, neuronal, and cancer cells⁶². U1 snRNA abnormalities can cause defects in pre-mRNA splicing, which are considered as a primary cause of several diseases⁶³. In other words, mammalian cells require U1 snRNA with expression levels in a restricted range to prevent drastic premature termination of the nascent pol II transcripts by PCPA⁶⁴. In human macrophages, U1 snRNA over-expression has been associated with impairment of autophagosome-lysosome fusion⁶⁵. Recent studies reported that the infection of human macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) results in massive alterations in the pattern of RNA splicing in the host^{66,67}. Furthermore, two genes related to macrophage function, the monocyte to macrophage differentiation gene (*MDM*) and adenosine deaminase (*ADA*) genes, were differentially spliced in MAP-infected ileum suggesting a possible mechanism by which MAP escapes the host innate immune response⁶⁸. Our findings suggested that the heterozygous genotype in the *cis*-eQTL-rs109859270 (C/T) resulted in increased U1 spliceosomal RNA expression levels. In contrast, the most frequent homozygous genotype (C/C) maintained the U1 snRNA expression levels in a restricted range and was associated with a more controlled risk of infection. Further studies are required to understand the mechanisms of splicing and alternative splicing regulation upon MAP infection and how they can impact immune responses in cattle.

Conclusions

The identification of functional variants (*cis*-eQTLs) followed by a case-control association analysis allowed the identification of three *cis*-eQTLs regulating the expression of the *MECOM*, *eEF1A2*, and U1 spliceosomal RNA expression and their validation as significantly associated with PTB susceptibility in a larger cattle population. It should be emphasized that *MECOM*, *eEF1A2*, and U1 risk alleles have shown detrimental effects in other inflammatory diseases including human IBD and colorectal cancer. Furthermore, the introduction of the *cis*-eQTLs described in the current study into marker-assisted breeding programs might reduce the disease through selection, reduce economic losses, and improve animal health.

Materials and methods

Ethics statement. Experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) and authorized by the Regional Consejería de Agroganadería y Recursos Autoctonos of the Principality of Asturias (authorization code PROAE 29/2015). All the procedures were conducted following 2012/63/EU of the European Parliament. Blood, fecal, and tissue samples were collected by trained personnel and following good veterinary practice. Animals used in the case-control study were sampled under pertinent legislation for safeguarding animal welfare (Basque Government Decree 454/1994, Spanish Government Law 32/2007, Royal decree 731/2007, and European council regulation number 1099/2009).

Animals and PTB diagnosis. PB and ICV samples were collected from fourteen Holstein Friesian cows from a single commercial dairy farm in Asturias (Spain) at the time of slaughter. This farm was selected for sample collection based on PTB clinical cases, with some cows confirmed by necropsy examination. The mean prevalence of the disease in the farm (period 2016 to 2019) was estimated at 6.29% by ELISA for the detection of MAP antibodies. Infection status was determined by histopathological analysis of gut tissues, ELISA, bacteriological culture, and PCR assays as previously described²⁸. For the case-control study, the infection status of 986 Holstein Friesian cattle from eight Northeast Spain regions was determined by histopathological analysis of gut tissues, ELISA for MAP antibodies detection, and tissue culture and PCR for MAP detection³². Animals were 5.5 years old on average. Except for six animals that were aged between 18 and 23.2 months, the majority of the animals were adults (2 years or older).

Genotyping. Blood samples were collected from the coccygeal (tail) vein into EDTA Vacutainer tubes (BD Vacutainer System, Becton, Dickinson, and Company, Sparks, MD, USA). Blood samples were centrifuged at 2500×g for 20 min at 4 °C and buffy layers containing white blood cells were collected. Genomic DNA was extracted from the blood buffy coat using the QIAmp DNA Blood Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Purified genomic DNA was quantified spectrophotometrically and subsequently genotyped on the EuroG10K BeadChip at the molecular genetic laboratory service of the Spanish Federation of Holstein Cattle (CONAFE) using the *Infinium iScan* software for allele assignment (Illumina, San Diego, CA) as previously described²⁸. The EuroG10K BeadChip is a development by EuroGenomics and its collaborators.

Gene expression data. In the current study, the alignment files from our previous RNA-Seq study were used¹⁸. Briefly, PB samples were collected by venipuncture of the coccygeal vein using PAXgene Blood RNA tubes (2.5 ml) (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA was purified from the PB samples using the PAXgene blood RNA kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). For RNA isolation, 150–200 mg of ICV were harvested and immediately submerged in 2 ml of RNA later (Sigma, St. Louis, MO). Purification of RNA was performed using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Residual genomic DNA was removed using DNase digestion with RNase-free

DNase I amplification grade following the recommended protocol (Invitrogen, Spain). The concentration and quality of the total RNAs were measured using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). All samples had an RNA integrity value of 7 or greater. Approximately 250 ng of RNA were used for RNA-Seq library preparation using the Illumina NEBNext Ultra Directional RNA Library preparation kit following the manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, US). Libraries quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer and Agilent high sensitivity DNA chip to confirm that the insert sizes were 188–274 bp for all the individual libraries. RNA-Seq libraries were single-end sequenced in a 1 × 75 bp format using an Illumina NextSeq 500 sequencer at the Genomic Unit of the Scientific Park of Madrid, Spain. All the libraries were sequenced generating an average of 22.31 million raw reads per library with a Phred quality score > 30. The raw reads were filtered by their length (minimum size 75 bp long) and percentage of ambiguous base N less than 10% using *Prinseq-lite 0.20.4*²⁵. After quality control, reads were subsequently mapped to the *Bos Taurus* reference genome (*Bos_taurus.UMD3.1*, version 87) with *TopHat 2.1.1*²⁶. The resulting alignment files (.bam) were provided to the *Cufflinks* package 2.2.1⁶⁹ to calculate gene expression levels and genes differentially expressed in the infected animals with focal/multifocal or diffuse lesions versus the control group.

In the current study, the alignment files (.bam) from our previous RNA-Seq study¹⁸ were used to generate a table of reads for each sample using *Rsubread*²⁷. The number of reads mapped to 24,616 genes was counted using the function `featureCounts` in the *Rsubread* package. Next, the analysis of differential expression between the cows with focal/multifocal or diffuse lesions versus control cows was conducted using *DESeq2*²⁹. The differentially expressed genes were selected as those with an adjusted P-value ($P_{FDR} \leq 0.05$).

cis-eQTL analysis. Gene expression data (read counts) were normalized with the mean-of-ratios method included in the *DESeq2* package²⁹. Then, *R Matrix eQTL 2.2* was used to test for associations between each SNP-normalized counts by modeling the effect of genotype as additive linear (least square model), where the null hypothesis is no association between genotype and gene expression. This tool implements matrix covariance calculation and efficiently runs linear regression analysis for cis-eQTL discovery³⁰. cis-eQTLs were calculated by selecting gene variants on the same chromosome that are located within 1 Mb upstream of the TSS of a gene locus. Specific details regarding the matrix structure in *Matrix eQTL* have been previously described⁷⁰. Briefly, S and G denote the genotype matrix and the gene expression matrix, respectively. Each row of these matrices holds different measurements for a single SNP among samples and a single gene across samples, respectively. Data matrices are sliced into blocks of up to 10,000 variables. Then, gene expression and genotype matrices are standardized. For each pair of blocks, the correlation matrix for a relevant block is calculated and *Matrix eQTL* checks if the absolute value of any correlation exceeds a predefined threshold. Then, *Matrix eQTL* calculates the P-values only for those SNP-normalized counts associations selected based on their correlations being larger than the threshold. *Matrix eQTL* uses the false discovery rate (FDR)⁷¹ to adjust for multiple hypotheses testing and to identify significant cis-eQTLs ($P_{FDR} \leq 0.05$). FDR is the expected proportion of false positives among all the significant tests.

Functional enrichment analysis. Genes with significant cis-eQTLs were investigated for enrichment of biological processes using gene ontology categories⁷² within the *cluster Profiler Bioconductor package 3.10.1*³¹ and Panther database⁷³. A threshold for significant enrichment was set at $P_{FDR} \leq 0.05$ after adjustment with the Benjamini–Hochberg procedure⁷¹.

Case–control study. Associations between genotypes–phenotypes were assessed by logistic regression analysis using the WGassociation function of *SNPassoc 1.9.2* under five different genetic models (co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive)³⁴. The response variable can be binary (positive or negative diagnostic result) or continuous (ELISA OD values and PTB-associated lesions classified according to their severity in five grades). The genotypes of the cis-eQTLs were included as possible explanatory variables. The WGassociation function fits individual logistic regression models to each of the class variables (genotypes) using age as a covariate. P-values were adjusted using the Bonferroni correction (based on the total number of markers tested) for multiple comparisons. For each cis-eQTL and genetic model, the function `WGstats` of *SNPassoc 1.9.2* provided genotype frequencies, OR (or mean differences for quantitative traits), and 95% CI with the major homozygous genotype deemed as the baseline.

Bovine MECOM ELISA kit. The levels of MECOM protein in plasma samples (50 µl) were assessed by using a quantitative sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions (MyBioSource, San Diego, US). The sensitivity of the kit is 1.0 ng/ml and the detection range is 3.12–100 ng/ml. Briefly, standards and samples (50 µl) were added in duplicate into an appropriate ELISA plate. One hundred microliters of the horseradish peroxidase-conjugated antibody was added to each well. After incubation for 60 min at 37 °C, the plate was washed four times with 350 µl of wash solution and incubated with 50 µl of 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine for 15 min at 37 °C in the dark. After adding 50 µl of stop solution into each well, the OD values were measured in an ELISA reader at 450 nm (Thermo Scientific Multiskan, US). We average the duplicate readings for each standard and sample to subtract the average OD of the blank. A standard curve was generated by plotting the mean OD values of each standard on the vertical axis and the corresponding concentration on the horizontal axis. The concentration level of the MECOM in each sample was interpolated from the standard curve. Statistical analysis was performed using an unpaired t-test for comparison between two groups (*GraphPad Prism 8*, San Diego, California, US). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Macrophage killing assay. Peripheral blood was drawn from healthy Holstein cows into heparinized Vacutainer tubes (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), diluted 1:2 in Hanks balanced salt solution

(HBSS), layered over 10 ml of Ficoll-Paque gradient (1.084 g/cm³) (GE HealthCare, Uppsala, Sweden) and centrifuged at 900×g for 30 min. The cell interphase was collected and centrifuged at 400×g for 10 min to remove platelets from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were resuspended in RPMI-1640 supplemented with 20 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated bovine serum, 100 U/ml penicillin G, and 100 mg/ml streptomycin sulfate (Lonza, Spain) and seeded at a density of 1 × 10⁶ PBMC/ml into 24-well tissue culture plates. After 2 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator, non-adherent cells were removed. Adherent cells were incubated for 7 days at 37 °C to allow differentiation to MDM before infection. Differentiated MDM were inoculated in triplicate with a single-cell suspension of MAP reference strain K10 at a multiplicity of infection (bacteria:cells) of 10:1. After 2 h, the supernatant was removed, and the cells were washed twice with HBSS to remove extracellular bacteria. Infected MDM were lysed at this time (2 h p.i.) or cultured at 37 °C for 7 days in fresh medium. At each time point, the supernatant was aspirated and infected MDM were lysed by vigorous pipetting with 0.5 ml of 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in sterile water for 10 min. Supplemented Mycobacteria Growth indicator tubes (MGIT) (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, US) were inoculated with 0.1 ml of each initial bacterial suspension and with the 2 h and 7 d p. i. cell lysates. The tubes were incubated at 37 ± 2 °C for up to 41 days in a Bactec MGIT 960 instrument (Becton, Dickinson and Company). The earliest instrumental indication of positivity (i.e., time to detection [TTD]) for each tube was recorded. The predicted number of bacteria in each positive tube was calculated using previously generated mathematical equations that relate TTD (in days) to the estimated log CFUs³⁵. The CFU ratios between 2 h and 7 days p.i. were calculated by dividing the estimated log CFUs at day 7 by that at 2 h p.i. MAP survival index was estimated as the square root CFU ratio × 100. Higher values of the MAP survival index reflect higher susceptibility to infection. A student's *t*-test was performed for comparison of the survival indexes between two groups (*GraphPad Prism 8*, San Diego, CA, US). Differences were considered significant when P-values were ≤ 0.05.

Data availability

RNA-Seq raw data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under the accession number GSE137395. SNPs datasets will not be made publicly available as the data were generated from private-owned cattle, with a legal commitment to confidentiality. Researchers may request access to the data and consideration will be given to individuals following the conclusion of a confidentiality agreement.

Received: 10 July 2020; Accepted: 7 December 2020

Published online: 11 January 2021

References

- Ott, S. L., Wells, S. J. & Wagner, B. A. Herd-level economic losses associated with John's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* **40**, 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00037-9) (1999).
- Hasonova, L. & Pavlik, I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Vet. Med.* **51**, 193–211. <https://doi.org/10.17221/5539-VETMED> (2006).
- Sweeney, R. W. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **27**, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001> (2011).
- Juste, R. A. *et al.* Association between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis DNA in blood and cellular and humoral immune response in inflammatory bowel disease patients and controls. *Int. J. Infect. Dis.* **13**, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.06.034> (2009).
- Jeyanathan, M. *et al.* Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes Infect.* **9**, 1567–1573. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.001> (2007).
- Pierce, E. S. Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer?. *Infect. Agent Cancer* **13**, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3> (2018).
- Groenendaal, H. *et al.* A simulation of John's disease control. *Prev. Vet. Med.* **54**, 225–245. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(02\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(02)00027-2) (2002).
- Garry, F. Control of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **27**, 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.006> (2011).
- Alonso-Hearn, M. *et al.* Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **95**, 618–629. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2860> (2012).
- Purdie, A. C., Plain, K. M., Begg, D. J., de Silva, K. & Whittington, R. J. Candidate gene and genome-wide association studies of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in cattle and sheep: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.12.003> (2011).
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* **41**, 652–655. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02055.x> (2010).
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* SP110 as a novel susceptibility gene for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in cattle. *J. Dairy Sci.* **93**, 5950–5958. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3340> (2010).
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **93**, 1713–1721. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2438> (2010).
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle. *J. Dairy Sci.* **94**, 3635–3641. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3788> (2011).
- Ruiz-Larrañaga, O. *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in the bovine CD209 candidate gene for susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Anim. Genet.* **43**, 646–647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02316.x> (2012).
- Kiser, J. N., Neupane, M., White, S. N. & Neiberghs, H. L. Identification of genes associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) tissue infection in Holstein cattle using gene set enrichment analysis–SNP. *Mamm. Genome* **29**, 539–549. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9725-4> (2018).
- Hempel, R. J., Bannantine, J. P. & Stabel, J. R. Transcriptional profiling of ileocecal valve of Holstein dairy cows infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *PLoS ONE* **11**, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153932> (2016).
- Alonso-Hearn, M. *et al.* RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Sci. Rep.* **9**, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51328-0> (2019).

19. Ariel, O. *et al.* Transcriptome Profiling of bovine macrophages infected by *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* depicts foam cell and innate immune tolerance phenotypes. *Front. Immunol.* **10**, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02874> (2020).
20. Jansen, R. C. & Nap, J. P. Genetical genomics: The added value from segregation. *Trends Genet.* **17**, 388–391. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02310-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02310-1) (2001).
21. Fairfax, B. P. & Knight, J. C. Genetics of gene expression in immunity to infection. *Curr. Opin. Immunol.* **30**, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.07.001> (2014).
22. Cloney, R. Complex traits: Integrating gene variation and expression to understand complex traits. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 194. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.18> (2016).
23. Wittkopp, P. J. Genomic sources of regulatory variation in *cis* and in *trans*. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1779–1783. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5064-9> (2005).
24. Westra, H. J. & Franke, L. From genome to function by studying eQTLs. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1896–1902**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.024> (1842).
25. Schmieder, R. & Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **27**, 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026> (2011).
26. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120> (2009).
27. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214> (2013).
28. Canive, M. *et al.* Correlations between single nucleotide polymorphisms in bovine CD209, SLC11A1, SP110 and TLR2 genes and estimated breeding values for several traits in Spanish Holstein cattle. *Heliyon* **6**, e04254. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04254> (2020).
29. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> (2014).
30. Shabalin, A. A. Matrix eQTL: Ultra-fast eQTL analysis via large matrix operations. *Bioinformatics* **28**, 1353–1358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts163> (2012).
31. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118> (2012).
32. Vázquez, P. *et al.* Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian cattle. *Vet. Med. Int.* <https://doi.org/10.1155/2014/321327> (2014).
33. Wigginton, J. E., Cutler, D. J. & Abecasis, G. R. A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 887–893. <https://doi.org/10.1086/429864> (2005).
34. González, J. R. *et al.* SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **23**, 644–645. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm02> (2007).
35. Abendaño, N. *et al.* Quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains representing distinct genotypes and isolated from domestic and wildlife animal species by use of an automatic liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2609–2617. <https://doi.org/10.1128/JCM.00441-12> (2012).
36. Gao, Y. *et al.* Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics* **19**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5385-3> (2018).
37. De La Fuente, J., Gortázar, C. & Juste, R. Complement component 3: A new paradigm in tuberculosis vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 275–277. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1125294> (2016).
38. Curran, J. E. *et al.* Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat. Genet.* **37**, 1234–1241. <https://doi.org/10.1038/ng1655> (2005).
39. Rogler, G. Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 521–530. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30031-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30031-6) (2017).
40. Marks, D. J. B. *et al.* Defective acute inflammation in Crohn's disease: A clinical investigation. *Lancet* **367**, 668–678. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68265-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68265-2) (2006).
41. Johansen, M. D., de Silva, K., Plain, K. M., Whittington, R. J. & Purdie, A. C. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microb. Pathog.* **130**, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.031> (2019).
42. Li, K. *et al.* Transcriptome reveals 1400-fold upregulation of APOA4-APOC3 and 1100-Fold downregulation of GIF in the patients with polycythemia-induced gastric injury. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140534> (2005).
43. Lin, Q. Decreased expression of the APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster is associated with risk of Alzheimer's. *Drug Des. Dev. Therapy* **9**, 5421–5431. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S89279> (2015).
44. Wu, Y. *et al.* Interactions of environmental factors and APOA1-APOC3-APOA4-APOA5 gene cluster gene polymorphisms with metabolic syndrome. *PLoS ONE* **11**, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147946> (2016).
45. Naito, T. *et al.* Clinical and genetic risk factors for decreased bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **33**, 1873–1881. <https://doi.org/10.1111/jgh.14149> (2018).
46. Fehring, G. *et al.* Cross-cancer genome-wide analysis of lung, ovary, breast, prostate, and colorectal cancer reveals novel pleiotropic associations. *Cancer Res.* **76**, 5103–5114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2980> (2016).
47. Glass, C. *et al.* Global identification of EVI1 target genes in acute myeloid leukemia. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067134> (2013).
48. Yoshimi, A. & Kurokawa, M. Evi1 forms a bridge between the epigenetic machinery and signaling pathways. *Oncotarget* **2** (7), 575–586. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.304> (2011).
49. Tanaka, T. *et al.* Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 24020–24026. <https://doi.org/10.1038/382816a0> (1994).
50. Kiu, H. & Nicholson, S. E. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* **30**, 88–106. <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.660936> (2012).
51. Hood, D. *et al.* A new model for non-typeable *Haemophilus influenzae* middle ear infection in the Junbo mutant mouse. *DMM Dis. Model. Mech.* **9**, 69–79. <https://doi.org/10.1242/dmm.021659> (2016).
52. Xu, X. *et al.* EVI1 acts as an inducible negative-feedback regulator of NF- κ B by inhibiting p65 acetylation. *J. Immunol.* **188**, 6371–6380. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103527> (2012).
53. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23> (2017).
54. Xu, C., Hu, D. M. & Zhu, Q. EEF1A2 promotes cell migration, invasion and metastasis in pancreatic cancer by upregulating MMP-9 expression through Akt activation. *Clin. Exp. Metast.* **30**, 933–944. <https://doi.org/10.1007/s10585-013-9593-6> (2013).
55. Sun, Y. *et al.* Up-regulation of eEF1A2 promotes proliferation and inhibits apoptosis in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.045> (2014).
56. Li, Z. *et al.* Eef1a2 promotes cell growth, inhibits apoptosis and activates JAK/STAT and AKT signaling in mouse plasmacytomas. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010755> (2010).
57. Amiri, A. *et al.* eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene* **26**, 3027–3040. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210101> (2007).

58. Lee, M. H. & Surh, Y. J. eEF1A2 as a putative oncogene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 87–93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04909.x> (2009).
59. Abbas, K. A. & Herbein, G. The eEF1A proteins: At the crossroads of oncogenesis, apoptosis, and viral infections. *Front. Oncol.* **5**, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00075> (2015).
60. Nilsen, T. W. The spliceosome: The most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* **25**, 1147–1149. <https://doi.org/10.1002/bies.10394> (2003).
61. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The spliceosome: Design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009> (2009).
62. Kaida, D. et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* **468**, 664–668. <https://doi.org/10.1038/nature09479> (2010).
63. Faustino, N. A. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**, 419–437. <https://doi.org/10.1101/gad.1048803> (2003).
64. Cheng, Z., Shang, Y., Gao, S. & Zhang, T. Overexpression of U1 snRNA induces decrease of U1 spliceosome function associated with Alzheimer's disease. *J. Neurogenet.* **31**, 337–343. <https://doi.org/10.1080/01677063.2017.1395425> (2017).
65. Cheng, Z., Du, Z., Zhai, B., Yang, Z. & Zhang, T. U1 small nuclear RNA overexpression implicates autophagic-lysosomal system associated with AD. *Neurosci. Res.* **136**, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.01.006> (2018).
66. Kalam, H., Fontana, M. F. & Kumar, D. Alternate splicing of transcripts shape macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Pathog.* <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006236> (2017).
67. Kalam, H., Singh, K., Chauhan, K., Fontana, M. F. & Kumar, D. Alternate splicing of transcripts upon *Mycobacterium tuberculosis* infection impacts the expression of functional protein domains. *IUBMB Life* **70**, 845–854. <https://doi.org/10.1002/iub.1887> (2018).
68. Liang, G. et al. Altered microRNA expression and pre-mRNA splicing events reveal new mechanisms associated with early stage *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Sci. Rep.* **6**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24964> (2016).
69. Trapnell, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016> (2012).
70. Moradi, F., Hajihosseini, M., Khodayari-Moez, E. & Dinu, I. An application of matrix eQTL to billions hypothesis testing to identify expression quantitative trait loci in genome wide association studies of inflammatory bowel disease. *J. Cancer Prev. Curr. Res.* **11**, 41–46. <https://doi.org/10.15406/jcpr.2020.11.00424> (2020).
71. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **57**, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x> (1995).
72. Ashburner, M. et al. The gene ontology consortium. *Nat. Genet.* **25**, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556> (2000).
73. Thomas, P. D. et al. PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **13**, 2129–2141. <https://doi.org/10.1101/gr.772403> (2003).

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by a grant from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (MICINN, <https://sede.micinn.gob.es/>, project code: RTI2018-094192-R-C21) and by European Regional Development Funds (FEDER) to MAH. This study was co-funded by a grant from the Plan of Science, Technology, and Innovation of the Principality of Asturias, Regional funds PCTI 2018–2020 (www.ficyt.es/pcti/), project code: IDI2018-000237. MC and CBV have been awarded fellowships from the National Institute for Agricultural Research (INIA) program. Special thanks are due to the dairy producers and veterinarians for their collaboration. We are also grateful to Medelin Ocejo from NEIKER for assistance with data analysis. We are grateful to Kyle Hearn for the careful editing of the manuscript.

Author contributions

M.C. generated and analyzed the datasets and wrote the manuscript. P.V., R.C., C.B.V., J.G., R.A.J. and M.A.H. participated in sample collection and phenotypic characterization of the animals. N.F. and J.M.B. supervised the analysis and contributed to the interpretation of the results. J.L.L. performed differential expression and functional analysis. R.A.J. helped with the statistical analysis of the data. M.A.H. conceived and coordinated the project, supervised the data analysis, and wrote the manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79619-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.-H.

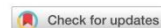
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021, corrected publication 2021



OPEN **Author Correction:**

Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the *MECOM*, *eEF1A2*, and U1 spliceosomal RNA expression

Published online: 25 October 2021

María Canive, Nora Fernandez-Jimenez, Rosa Casais, Patricia Vázquez, José Luis Lavín, José Ramón Bilbao, Cristina Blanco-Vázquez, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste & Marta Alonso-Hearn

Correction to: *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79619-x>, published online 11 January 2021

The original version of this Article omitted an affiliation for Maria Canive. The correct affiliations are listed below.

Department of Animal Health, NEIKER- Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain.

Doctoral Program in Immunology, Microbiology and Parasitology, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain.

The original Article and accompanying Supplementary Information files have been corrected.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

ESTUDIO III

Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data

Canive M, González-Recio O, Fernández A, Vázquez P, Badia-Bringué G, Lavín JL, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

Plos One, 2021, 16(8):e0256091.

Índice de impacto:3,240

Área: Multidisciplinar

Cuartil: Q1

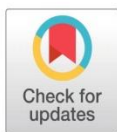
RESEARCH ARTICLE

Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data

Maria Canive^{1,2}, Oscar González-Recio^{3,4}, Almudena Fernández³, Patricia Vázquez¹, Gerard Badia-Bringué^{1,5}, José Luis Lavín⁶, Joseba M. Garrido¹, Ramón A. Juste¹, Marta Alonso-Hearn^{1*}

1 Department of Animal Health, NEIKER- Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain, **2** Doctoral Program in Immunology, Microbiology and Parasitology, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain, **3** Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, CSIC, Madrid, Spain, **4** Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, Madrid, Spain, **5** Doctoral Program in Molecular Biology and Biomedicine, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain, **6** Department of Applied Mathematics, NEIKER- Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain

* malonso@neiker.eus



OPEN ACCESS

Citation: Canive M, González-Recio O, Fernández A, Vázquez P, Badia-Bringué G, Lavín JL, et al. (2021) Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. PLoS ONE 16(8): e0256091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091>

Editor: Rebecca Lee Smith, University of Illinois College of Veterinary Medicine, UNITED STATES

Received: December 28, 2020

Accepted: July 29, 2021

Published: August 27, 2021

Copyright: © 2021 Canive et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Sequence data used in this study are owned by the 1000 Bull Genomes Project Consortium. The sequence variants for 1800 animals from Run8 are public at the European Variation Archive under project number PRJEB42783. The SNPs associated with the ELISA-tissue PCR-tissue culture results have been deposited in the animal genome database (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/RTLdb/BT/>)

Abstract

Bovine paratuberculosis (PTB) is a chronic inflammatory disease caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Genome-wide association studies (GWAS) have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) significantly associated with susceptibility to bovine PTB. The main objective of this study was to identify quantitative trait loci (QTLs) associated with MAP infection in Spanish Holstein cows (N = 983) using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence (WGS) data. The infection status of these animals was defined by three diagnostic methods including ELISA for MAP-antibodies detection, and tissue culture and PCR for MAP detection. The 983 cows included in this study were genotyped with the Bovine MD SNP50 Bead Chip, and the corresponding genotypes were imputed to WGS using the 1,000 Bull genomes reference population. In total, 33.77 million SNP variants per animal were identified across the genome. Linear mixed models were used to calculate the heritability (h^2) estimates for each diagnostic test and test combinations. Next, we performed a case-control GWAS using the imputed WGS datasets and the phenotypes and combinations of phenotypes with h^2 estimates > 0.080. After performing the GWAS, the test combinations that showed SNPs with a significant association ($P_{FDR} \leq 0.05$), were the ELISA-tissue PCR-tissue culture, ELISA-tissue culture, and ELISA-tissue PCR. A total of twelve quantitative trait loci (QTLs) highly associated with MAP infection status were identified on the *Bos taurus* autosomes (BTA) 4, BTA5, BTA11, BTA12, BTA14, BTA23, BTA24, and BTA28, and some of these QTLs were linked to immune-modulating genes. The identified QTLs on BTA23 spanning from 18.81 to 22.95

pubtails?PUBMED_ID=ISU0121). Individual genotype data used in this study is managed by a third party, the Spanish Friesian Cattle National Federation (CONAFE). Requests for genotype data can be made to CONAFE, Ctra. de Andalucía, km. 23,600 - 28340 Valdemoro, Madrid, Spain; email: conafe@conafe.com; phone: +34 (91) 8952412; website: www.conafe.com. The authors confirm they had no special access privileges.

Funding: Financial support for this study was provided by a grant from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (MICINN, <https://sede.micinn.gob.es/>, project code: RTI2018-094192-R-C21) and by European Regional Development Funds (FEDER) to MAH. MC and GBB have been awarded fellowships from the National Institute for Agricultural Research (INIA) and MICINN, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Mb of the *Bos taurus* genome overlapped with several QTLs previously found to be associated with PTB susceptibility, bovine tuberculosis susceptibility, and clinical mastitis. The results from this study provide more clues regarding the molecular mechanisms underlying susceptibility to PTB infection in cattle and might be used to develop national genetic evaluations for PTB in Spain.

Introduction

Paratuberculosis (PTB) or Johne's disease is a chronic enteritis of domestic and wild ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB is a major problem for animal health and must be notified to the World Organization for Animal Health. In Europe and North America, PTB is considered endemic in dairy cattle, with herd prevalence estimates higher than 50% [1]. This can result in great economic losses to the dairy industry due to decreased milk production, weight loss, replacement cost, reduced slaughter value, a greater risk to other health problems, premature culling or death from the clinical disease, and the costs of veterinary expenses and control measures [2,3]. The most common clinical signs are progressive weight loss, diarrhea, and decreased milk yield [4]. However, most infected animals do not develop clinical disease, and microbiological and immunological diagnostic tests are not sensitive enough to identify them [5]. MAP is also a suspected cause of Crohn's disease (CD) in humans, making it a potential zoonotic agent [6]. Colorectal cancer is a complication of the two forms of idiopathic inflammatory bowel disease (IBD); colonic CD and ulcerative colitis. Interestingly, MAP bacilli have been detected in the intestines of patients with CD, ulcerative colitis, and IBD-associated colorectal cancer [7,8].

Once a cow shows clinical signs of PTB, there is no effective treatment and the animal is culled. Commercial inactivated vaccines against bovine PTB are very successful in reducing MAP presence in feces and tissues, and in increasing both milk production and cattle productive life in infected farms [9,10]. However, PTB vaccination with heat-killed inactivated vaccines is not allowed in most European countries due to its interference with *Mycobacterium bovis* (Mb) detection tests [11]. Therefore, PTB control is currently based on testing and culling infected animals plus preventing MAP transmission to susceptible animals using voluntary hygiene and management practices [12,13]. PTB infection is commonly detected using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) that detects serum and milk antibodies against MAP. Although serum ELISA is a simple, fast, and cost-effective method for diagnosis clinical PTB, it is known to have low sensitivity for MAP-infected animals that do not show clinical signs and could yield erroneous false-negative results [14]. Therefore, repeating testing or complementary methods (culture or PCR) are required to achieve reasonable sensitivity for PTB diagnosis.

Genomic selection could enhance natural resistance to MAP infection and complement existing control strategies [15]. Genetic improvement of disease resistance is a long-term process; however, the results are permanent and cumulative over generations and could result in disease eradication. Previous studies showed heritability (h^2) estimates of susceptibility to MAP in Friesian cattle ranging from 0.03 to 0.27 [16–18]. Genome-wide association studies (GWAS) using genotyping of SNPs at low density (LD) [19], medium density (MD) [20–26], and high density (HD) [27–29], as well as imputed whole-genome sequences (WGS) [30–32], have identified quantitative trait loci (QTLs) in the *Bos taurus* genome associated with MAP infection. However, few QTLs have been identified with consistent association across studies

due to multiple factors including differences in genetic backgrounds and variable disease prevalence in the studied populations, different samples size, different statistical models, differences in sensitivity of the various diagnostic methods used for infection status classification, different definitions for the cases and controls phenotypes, and the low heritable nature of these phenotypes. Given that different populations across the world can have differences in genetic backgrounds, it is entirely reasonable for some genes to be monomorphic in some populations (these would therefore not be associated with PTB in these populations) even when they have a major physiological role in the defense against PTB. Previous GWAS in Holstein cattle defined phenotypes based on ante-mortem tests such as serum ELISA, milk ELISA, MAP fecal culture, or fecal PCR. The ELISA test is most commonly used for the detection of MAP-specific antibodies in infected animals. This test is cost-effective and simple to perform as compared with detection by bacteriological culture. However, the drawback of this method is its low sensitivity for detection during the subclinical phase of infection and could yield false-negative results. Tissue culturing is considered to be the gold standard due to its increased sensitivity and ability to detect viable MAP in subclinical stages of PTB that can be missed with other diagnostic methods [33]. However, tissue PCR and culture are post-mortem tests that can be taken at a single point and are laborious to conduct on a large number of animals.

The first objective of the current study was to calculate the genetic parameters, variance, and h^2 estimates, for MAP-specific humoral response and/or tissue MAP infection in Spanish Holstein cattle ($N = 983$) using different diagnostic methods including ELISA for MAP antibodies detection, and culture and PCR for MAP detection in gut tissues. The second objective was to identify genomic regions and candidate genes associated with MAP infection using imputed WGS data and the individual test results or test combinations with h^2 estimates > 0.08 .

Materials and methods

Ethics statement

Animals used in this study were not submitted to any *in vivo* experimentation before stunning for slaughter and, therefore, no specific ethics committee authorization was required. The cows were slaughtered in the Bilbao and Donostia municipal slaughterhouses (Basque Country, Spain) under the pertinent Basque (Basque Government Decree 454/1994), Spanish (Spanish Government Law 32/2007 and Royal decree 731/2007), and European (Council Regulation (EC) No 1099/2009) legislation on animal welfare.

Animals and PTB diagnosis

The Spanish Holstein population included in this study consisted of 983 culled Holstein cattle from several herds located in eight regions: Basque Country ($N = 415$, 42.21%), Catalonia ($N = 220$, 22.38%), Navarre ($N = 204$, 20.75%), Cantabria ($N = 70$, 7.12%), Aragon ($N = 38$, 3.87%), Castile and Leon ($N = 25$, 2.54%), La Rioja ($N = 7$, 0.71%) and Asturias ($N = 4$, 0.41%). Only cows (2 years or older, 5.6 years mean age) were included in the analyses as PTB has a long incubation period and older animals are, therefore, more likely to show clinical signs and positive diagnostic results. The cows were slaughtered in two abattoirs located in the Basque country from March 2007 to May 2010. The infectious status of the animals was determined by ELISA for MAP antibodies detection, and tissue culture and PCR for MAP detection [34]. Sampling was systematically performed once a week at the slaughterhouse. In each visit, the first 2 to 6 animals in the line satisfying the breed and age requirements were sampled. Duplicate blood samples were collected from the jugular vein into 10 ml Vacutainer EDTA tubes

(BD, Franklin Lakes, NJ, USA) for genotyping and ELISA testing. Since the mucosa from the ileocecal valve-distal ileum and the jejunal caudal lymph nodes are the primary sites of MAP colonization, samples from these tissues were mixed and processed for tissue culture and PCR. Briefly, MAP isolation was performed in duplicate home-made Herrold's egg yolk (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and Lowenstein-Jensen media (Difco, Detroit, MI, USA), both supplemented with 2 mg/L of mycobactin J (Allied Monitor, Fayette, MO, USA) as previously described [35]. A positive tissue culture result was considered if one or more MAP colonies were observed in any of the four medium slants. Individuals with 0 CFU in all culture samples were considered controls. A second aliquot from the same tissue homogenates was used for DNA isolation and MAP IS900 amplification using a combined extraction and amplification kit (Adiogene, Saint Brieuc, France). PCR amplifications were performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, US). Samples showing amplification curves with a threshold cycle (Ct) below 40.0 were considered positive. Serum samples were tested for specific antibody production against MAP by using a two-step ELISA paratuberculosis antibody screening and verification kit (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as optical density values (OD) and categorized as positive according to the sample-to-positive control ratio defined by the manufacturer. Table 1 provides a summary of the number of animals with positive or negative results for each diagnostic test and test combinations. When combinations of diagnostics tests were used, animals were considered cases when they were positive to all the tests, and controls when they were negative to any (+/-), or all of them (+/-).

Genotyping and imputation

Peripheral blood samples were taken at slaughter time and DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Purified genomic DNA was quantified spectrophotometrically and subsequently genotyped with the Illumina Bovine MD SNP50 Bead Chip at the molecular genetic laboratory service of the Spanish Federation of Holstein Cattle (CONAFE) using the Infinium™ iScan software for allele assignment (Illumina, San Diego, CA). Individual genotypes were phased using Eagle 2.4 [36] and imputed with minimac4 [37] to the Bovine HD Bead Chip using a reference panel of 1,278 *Bos taurus* from Run7.0 of the 1,000 Bull Genomes project and 581,712 SNPs (ASR-UCD1.2). Imputation to the WGS level was then undertaken using a reference population of 2,333 *Bos taurus* from Run6.0 of the 1,000 Bull Genomes project [38]. In total, 33.77 million SNPs per animal were identified across the genome. All the SNPs passed a call

Table 1. Number of cows with a positive and negative test result.

Phenotype	Cases (%)	Controls (%)
ELISA (+/-)	70 (7.12)	913 (92.88)
Tissue PCR (+/-)	266 (27.62)	697 (72.38)
Tissue Culture (+/-)	150 (15.26)	833 (84.74)
ELISA-Tissue PCR (+/)	59 (6.00)	924 (94.00)
ELISA-Tissue Culture (+/)	56 (5.70)	927 (94.30)
Tissue PCR-Tissue Culture (+/)	119 (12.11)	864 (87.89)
ELISA-Tissue PCR-Tissue Culture (+/)	55 (5.60)	928 (94.40)
ELISA-Tissue PCR-Tissue Culture (+/-)	55 (7.71)	658 (92.29)

When combinations of diagnostics tests were used, animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to any (+/) or all of them (+/-).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.t001>

rate > 0.80. PTB-associated SNPs with minimum allele frequency (MAF) < 0.01 were removed. The number of SNPs kept in the analysis was 13,881,067.

Variance components and h^2 estimates

The variance components, standard errors (SE), and h^2 estimates for MAP infection status explained by all the SNPs were calculated using the genome-wide complex trait analysis (GCTA) software 1.93.2, according to the following formula: $h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_e^2}$ where σ_G is the additive genetic effect of the individuals and σ_e is the residual variance [39]. The variance components σ_G and σ_e in the equation were estimated by the genomic-relatedness-based restricted maximum-likelihood (GREML) approach implemented in GCTA. This approach estimates the proportion of phenotypic variation that can be explained by all genome-wide SNPs using an SNP-derived genetic relationship matrix. The concept behind this method is to fit all the SNPs simultaneously as random effects in a mixed linear model to estimate the variance explained by all the SNPs. GCTA implements the method in two steps; first generating the GRM between individuals and then estimating the variance explained by all SNPs by a Restricted Maximum Likelihood (REML) analysis of the phenotypes with the GRM.

Genome-wide association study (GWAS)

Imputed genotypes and the results from the diagnostic tests with $h^2 > 0.08$ were analyzed in a case-control study using the *mlma* (mixed linear model) association analysis of the GCTA 1.93.2 which fits the effects of all the SNPs as random effects. The model is $y = a + bx + g + e$, where y is the phenotype, a is the mean term, b is the additive effect (fixed effect) of the candidate SNP to be tested for association, x is the SNP genotype indicator variable coded as 0, 1 or 2, g is the polygenic effect (random effect) i.e. the accumulated effect of all SNPs (as captured by the GRM calculated using all SNPs), and e is the residual [39]. Age was included as a covariate in the analysis. After the GWAS, all the SNPs had R^2 values higher than 50% and were retained, with a mean R^2 close to 90%. SNPs with R^2 between 50 and 70% were scarce. To account for multiple testing, a 5% chromosome-wise false discovery rate ($P_{FDR} \leq 0.05$) was used to determine the probability that associations were not false positives. Uncorrected P-values between $P = 5 \times 10^{-5}$ and $P = 5 \times 10^{-7}$ provided a moderate significance level (α), and uncorrected P-values $< 5 \times 10^{-7}$ were used to identify highly significant associations (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). The inflation factor (λ) and quantile-quantile plots were calculated to compare observed distributions of $-\log(P\text{-values})$ to the expected distribution under the no association model for each phenotype. λ value close to 1 suggests appropriate adjustment for potential substructure and $\lambda > 1.2$ suggests population stratification.

The odds ratio (OR) and their 95% confidence intervals (CI) for the SNPs associated with a positive ELISA-tissue PCR-tissue culture diagnosis ($P < 5 \times 10^{-7}$) were calculated using logistic regression analysis with the *WGassociation* function of *SNPassoc* 1.9.2 under five different genetic models (co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive) [40]. The *WGassociation* function fits individual logistic regression models to each of the class variables (genotypes). For each SNP and genetic model, the function *WGstats* of *SNPassoc* 1.9.2 provides genotype frequencies, OR, and 95% CI with the major homozygous genotype deemed as the baseline.

SNP variants, QTLs, and candidate genes identification

The location of the significant SNPs was determined with *biomaRt* 2.44.1 for R [41] using the ARS-UCD1.2 reference genome. The genomic distribution of the identified SNPs was

determined using the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). QTLs associated with PTB infection were defined based on SNPs on linkage disequilibrium patterns with SNPs that surpassed the suggestive significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) in a given chromosome. The beginning and end of each quantitative trait locus (QTL) were defined in a window of 500,000 base pairs upstream and downstream by the SNPs that were furthest upstream and downstream of the suggestive SNP. Overlapping QTLs were merged and considered as a single QTL. The defined QTLs were further investigated for the presence of candidate genes within 50,000 base pairs to each side of the defined QTL using Ensembl (<https://www.ensembl.org>). The identified QTLs and candidate genes were compared with the reported cattle QTLs and genes for PTB susceptibility, bovine tuberculosis (bTB) susceptibility, and clinical mastitis (<http://www.animalgenome.org>), and with human candidate genes for CD, IBD, and colorectal cancer (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). In addition, we uploaded the list of candidate genes and search the Innate DB database for innate immunity genes (<https://innatedb.com>).

Results

Data and descriptive analysis

The infection status of each animal was investigated by serological and microbiological methods. Table 1 presents the descriptive statistics of the analyzed population. Although not included in Table 1, the mean (\pm SD) OD values were 0.178 ± 0.16 for negative, and 1.882 ± 0.80 for positive animals. ELISA OD values ranged from 0.028 to 3.108. The frequency of ELISA, tissue culture, and tissue PCR positive animals was 7.12, 15.26, and 27.62%, respectively. MAP was detected by tissue culture and PCR in the majority of ELISA-positive animals; 80% and 84%, respectively.

Variance components and h^2 estimates

Variance components along with standard errors (SE) and h^2 estimates were calculated for all the diagnostic tests and their combinations (Table 2). The h^2 estimates ranged from 0.054 to 0.139 depending on the phenotype. The highest h^2 estimate was obtained for the ELISA-tissue PCR-tissue culture ($h^2 = 0.139$) followed by the tissue culture ($h^2 = 0.101$), ELISA-tissue culture ($h^2 = 0.099$), tissue PCR-tissue culture ($h^2 = 0.086$) and ELISA-tissue PCR ($h^2 = 0.081$). When the ELISA was treated as a positive/negative binary trait for MAP status, higher h^2 estimates were obtained ($h^2 = 0.075$) when compared with the ELISA (OD) h^2 estimates ($h^2 = 0.057$).

Table 2. Variance components, standard errors (SE), and h^2 estimates for the diagnostic tests and their combinations.

Phenotype	Additive genetic variance (σ_G)	SE	Residual variance (σ_e)	SE	Heritability (h^2)
ELISA (+/-)	0.004975	0.003905	0.060948	0.004611	0.075464
ELISA (OD)	0.014126	0.013584	0.232861	0.016736	0.057192
Tissue PCR (+/-)	0.010867	0.012009	0.189343	0.014418	0.054277
Tissue Culture (+/-)	0.013107	0.008410	0.115996	0.009433	0.101522
ELISA-Tissue PCR (+/)	0.004584	0.003268	0.051401	0.003860	0.081873
ELISA-Tissue Culture (+/)	0.005307	0.003154	0.047911	0.003653	0.099722
Tissue PCR-Tissue Culture (+/)	0.009149	0.006479	0.096878	0.007505	0.086287
ELISA-Tissue PCR-Tissue Culture (+/)	0.005741	0.003193	0.046567	0.003634	0.109759
ELISA-Tissue PCR-Tissue Culture (+/-)	0.009838	0.005710	0.060478	0.006215	0.139909

OD- Optical density. When combinations of diagnostics tests were used, animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to any (+/) or all of them (+/-).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.t002>

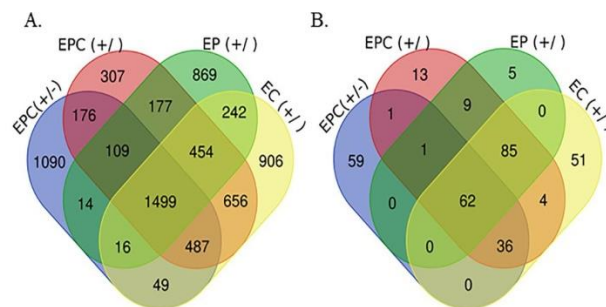


Fig 1. Number of SNPs associated with PTB infection status. The total number of SNPs with moderate (A), or high (B) association with PTB infection status determined by ELISA (E), tissue PCR (P), and tissue culture (C) combinations. Animals were considered cases when they were positive to all the tests, and controls when they were negative to any (+/-), or all of them (+/-). A moderate threshold for the association between a SNP and a phenotype was set at a significance level (α) between $P = 5 \times 10^{-5}$ and $P = 5 \times 10^{-7}$. The high threshold for evidence of an association was set at $P < 5 \times 10^{-7}$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.g001>

GWAS. To explore the genetic basis of MAP infection status, a GWAS using the imputed WGS datasets and the phenotypes and combinations of phenotypes with $h^2 > 0.08$ was performed. After the GWAS, the phenotypes that showed SNPs with a significant association ($P_{FDR} \leq 0.05$) were the ELISA-tissue PCR-tissue culture, ELISA-tissue culture, and ELISA-tissue PCR. The number of SNPs that surpassed the moderate (between $P = 5 \times 10^{-5}$ and $P = 5 \times 10^{-7}$) and the high ($P < 5 \times 10^{-7}$) thresholds are presented in Fig 1.

A total of 3,440 and 159 SNPs were found to be moderate and highly associated with the combination of the ELISA-tissue PCR-tissue culture results (+/-). In this test combination, animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to all of them (+/-). Considering the results of the ELISA-tissue culture, the GWAS revealed 4,309 and 238 SNPs moderate, and highly associated with this combination, respectively. As shown in Fig 2 (Manhattan plots), various chromosomal regions were significantly associated with MAP infection according to the combinations of ELISA-tissue PCR-tissue culture (Fig 2A and 2B), ELISA-tissue culture (Fig 2C), and ELISA-tissue PCR (Fig 2D). In all the scenarios, the most significant peak was located on the BTA23, and most of the highly-associated SNPs were located in intronic regions (S1 Fig).

The GWAS defined a total of 12 QTLs highly associated with MAP infection status on 8 chromosomes including BTA4, BTA5, BTA11, BTA12, BTA14, BTA23, BTA24, and BTA28. A description of the SNPs surpassing the threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$), P-values, along with candidate genes located within the defined QTLs are shown in Table 3. Three QTLs on BTA5 and BTA23 were common to all the test combinations, with the most significant QTLs located on BTA23. Additional highly-associated QTLs were identified on BTA4, BTA11, BTA12, BTA14, BTA23, BTA24, and BTA28. As shown in Table 3, the 159 SNPs associated with the phenotype with the highest h^2 , the ELISA-tissue PCR-tissue culture results (+/-), resided within 5 QTLs which were distributed across BTA5 and BTA23. The BTA23 harbored 4 of the 5 QTL regions. The two QTLs that harbored the most genome-wide significantly-associated SNPs were located on BTA23 (15.09–16.86 and 18.81–22.95 Mb). Using the ELISA-Tissue PCR results, we identified the largest QTL (4.12 Mb) on BTA5. Two QTLs located on BTA11 and BTA28 were specifically associated with the combination ELISA-tissue culture, and one QTL on BTA12 was specifically associated with the ELISA-tissue PCR.

Quantile-quantile plots comparing the observed distribution of $-\log(P\text{-values})$ to the expected values under null hypothesis are shown in S2 Fig. The plots showed a distribution

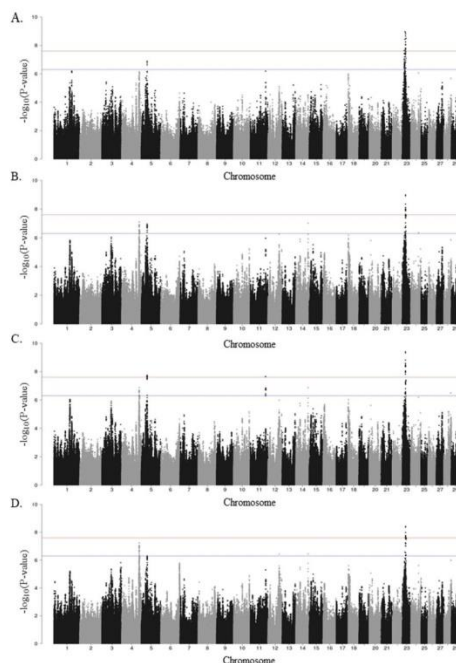


Fig 2. Manhattan plots showing $-\log_{10}(\text{P-values})$ of association between every single SNP and phenotype. Each dot represents the result from the test association for a single SNP. Animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to any (+/), or all of them (+/-). Chromosomes localization of the SNPs associated with ELISA-tissue culture-tissue PCR (+/-) (A), ELISA-tissue culture-tissue PCR (+) (B), ELISA-tissue culture (+) (C), and ELISA-tissue PCR (+) (D) is indicated on the x-axis. The horizontal red line is drawn at $-\log_{10}(2.5 \times 10^{-8})$, and the horizontal blue line at $-\log_{10}(5 \times 10^{-7})$ to show the high level of significance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.g002>

close to the expected distribution line for the following phenotypes: ELISA-tissue PCR-tissue culture (+/-) ($\lambda_{\text{median}} = 1.007$), ELISA-tissue PCR-tissue culture (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.004$), ELISA-tissue culture (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.006$), and ELISA-tissue PCR (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.006$), indicating that significant values were not overestimated due to population stratification or cryptic relatedness. A slight deviation in the upper right tails from the $y = x$ line suggested that some association was present in the data.

Table 3. Quantitative trait loci (QTLs) surpassing the significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with MAP infection status.

Phenotype	BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P-value	SNP position ²	Positional candidate genes in QTL ³	SNPs in QTL
ELISA Tissue PCR Tissue Culture (+/-)	23	15,060,376	16,864,597	1,06E-09	15,594,386	<i>NFYA, TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, FOXP4, MDF1, TFEB, PGC, FR36, USP49, MED20, TOMM6, BSYL, CCND3, TAF8, GUCA1A, MGC137036, C23H6orf132, GUCA1B, MRPS10, TERF1, U6, UBR2, PRPH2, 5S_rRNA, TBCC, BICRAL, RPL7L1, PEX6, MRPL2SRF, PTCRA, MEA1, CNPY3, KLHDC3, GNMT, RRP36, PPP2R5D, CUL7, KLC4, PTK7, CUL9, SLC22A7, DNP1, TTBK1, CRIP3, ENSBTAG00000021359, ENSBTAG00000050887, ENSBTAG00000038916, ENSBTAG00000054479, ENSBTAG00000053124, ENSBTAG00000052790, ENSBTAG00000051935, ENSBTAG00000051409</i>	13
	23	18,812,221	20,933,699	1,26E-09	19,329,213	<i>RUNX2, U6, ENPP4, CLIC5, ENPP5, RCAN2, CYP39A1, SLC25A27, TDRD6, ADGRF5, PLA2G7, ANKRD66, ADGRF1, TNFRSF21, CD2AP, ADGRF2, ADGRF4, OPN5, ENSBTAG00000021415</i>	63
	23	21,898,408	22,958,623	3,19E-09	22,401,117	<i>MMUT, CENPQ, GLYATL3, C23H6orf141, U6, RHAG, CRISP2, CRISP3, CRISP1, 7SK, DEFB114, DEFB110, ENSBTAG00000046237, ENSBTAG00000050850, ENSBTAG00000053808, ENSBTAG00000054396, ENSBTAG00000046711</i>	6
	23	11,332,059	14,196,234	2,32E-08	11,900,592	<i>CMTR1, CCDC167, MDGA1, ZFAND3, BTBD9, GLO1, DNAH8, GLPIR, SAYSD1, KCNK5, KIF6, KCNK16, KCNK17, DAAM2, MOCSI, U6, bta-mir-2377, ENSBTAG00000050874</i>	44
	5	35,035,017	36,111,179	1,35E-07	35,577,195	<i>ANO6, DBX2, NELL2, TMEM117, ENSBTAG00000026249, ENSBTAG00000032150</i>	33

(Continued)

Table 3. (Continued)

Phenotype	BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P-value	SNP position ²	Positional candidate genes in QTL ³	SNPs in QTL
ELISA Tissue PCR Tissue Culture (+/)	23	18,812,221	20,933,699	1,01E-09	19,331,156	RUNX2, U6, ENPP4, CLIC5, ENPP5, RCAN2, CYP39A1, SLC25A27, TDRD6, ADGRF5, PLA2G7, ANKRD66, ADGRF1, TNFRSF21, CD2AP, ADGRF2, ADGRF4, OPN5, ENSBTAG00000021415	63
	23	21,898,408	22,958,623	2,61E-08	22,401,993	MMUT, CENPQ, GLYATL3, C23H6orf141, U6, RHAG, CRISP1, CRISP2, CRISP3, 7SK, DEFB114, DEFB110, ENSBTAG00000046237, ENSBTAG00000050850, ENSBTAG00000053808, ENSBTAG00000054396, ENSBTAG00000046711	6
	23	15,094,386	16,094,386	1,95E-07	15,594,386	TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, FOXP4, MDFI, TFEB, PGC, FR56, USP49, MED20, TOMM6, BYSL, CCND3, TAF8, GUCA1A, MGC137036, C23H6orf132, GUCA1B, MRPS10, TRERF1, ENSBTAG00000050887, ENSBTAG00000038916, ENSBTAG00000054479, ENSBTAG00000053124	1
	23	13,196,234	14,196,234	3,98E-07	13,696,234	KIF6, KCNK16, KCNK17, DAAM2, MOCSI, U6	1
	4	105,958,204	106,999,289	7,92E-08	106,492,268	TRBV24-1, TRPV6, TRBV30, TRPV5, KEL, PRSS2, EPHB6, OR9A2, OR9A16, OR9A15, OR6V1, PIP, TAS2R39, TAS2R40, TMEM139, CLCN1, GSKT1, CASP2, FAM131B, ZYX, EPHA1, TAS2R60, OR2R3, OR10AC1, TCAF2, TCAFI, ENSBTAG00000049004, ENSBTAG00000027204, ENSBTAG00000050190, ENSBTAG00000053376, ENSBTAG00000053701, ENSBTAG00000053785, ENSBTAG00000054917, ENSBTAG00000051147, ENSBTAG00000047919, ENSBTAG00000034609, ENSBTAG00000052365, ENSBTAG00000050494, ENSBTAG00000031162	93
	4	108,183,737	109,219,627	3,24E-07	108,688,422		10
	5	35,035,017	36,331,608	1,08E-07	35,580,801	ANO6, DBX2, NELL2, TMEM117, 5S_rRNA, ENSBTAG00000026249, ENSBTAG00000032150	35
	14	74,743,059	75,743,059	9,47E-08	75,243,059	MMP16, CNBD1, ENSBTAG00000051556	1
	24	45,728,397	46,728,397	4,49E-07	46,228,397	EPG5, bta-mir6523a, PTPPIP2, ATP5F1A, HAUS1, U6, C24H1orf25, RNF165, LOXHD1, ST8SIA5, PIAS2, KATNAL2, ENSBTAG00000048422, ENSBTAG00000047360, ENSBTAG00000047547	1
	23	18,812,221	20,933,699	4,01E-10	19,331,156	RUNX2, U6, ENPP4, CLIC5, ENPP5, RCAN2, CYP39A1, SLC25A27, TDRD6, ADGRF5, PLA2G7, ANKRD66, ADGRF1, TNFRSF21, CD2AP, ADGRF2, ADGRF4, OPN5, ENSBTAG00000021415	68
ELISA Tissue Culture (+/)	23	21,898,408	22,901,993	4,06E-08	22,401,993	MMUT, CENPQ, GLYATL3, C23H6orf141, U6, RHAG, CRISP1, CRISP2, CRISP3, 7SK, DEFB114, DEFB110, ENSBTAG00000046237, ENSBTAG00000050850, ENSBTAG00000053808, ENSBTAG00000054396, ENSBTAG00000046711	5
	23	15,094,386	16,094,386	3,39E-07	15,594,386	TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, FOXP4, MDFI, TFEB, PGC, FR56, USP49, MED20, TOMM6, BYSL, CCND3, TAF8, GUCA1A, MGC137036, C23H6orf132, GUCA1B, MRPS10, TRERF1, ENSBTAG00000050887, ENSBTAG00000038916, ENSBTAG00000054479, ENSBTAG00000053124	1
	11	91,785,241	93,618,888	2,24E-08	92,308,149	GGTA1, DAB2IP, NDUFA8, MORN5, LHX6, RBM18, MRRF, PTGS1, bta-mir-10175, OR1L8, OR1L12, OR1L21, OR1L8H, OR1L8, OR1L8C, OR1L8E, OR1L8D, OR1L20, OR1N2, OR1J26, OR1J4E, OR1N1, OR1J2, ENSBTAG00000039201, ENSBTAG00000039186, ENSBTAG00000012827, ENSBTAG00000049150, ENSBTAG00000049268, ENSBTAG00000048686, ENSBTAG00000037739, ENSBTAG00000054916, ENSBTAG00000055261, ENSBTAG00000048884	43
	5	35,035,017	36,331,608	1,80E-08	35,580,801	ANO6, DBX2, NELL2, TMEM117, 5S_rRNA, ENSBTAG00000026249, ENSBTAG00000032150	34
	28	42,484,673	43,484,698	3,23E-07	42,984,698	FRMPD2, MAPK8, ARHGAP22, WDFY4, LRRIC8, VSTM4, FAM170B, ENSBTAG0000006042	2
	14	74,743,059	75,743,059	1,38E-07	75,243,059	MMP16, CNBD1, ENSBTAG00000051556	1
	4	105,958,204	106,999,289	1,35E-07	106,492,268	TRBV24-1, TRPV6, TRBV30, TRPV5, KEL, PRSS2, EPHB6, OR9A2, OR9A16, OR9A15, OR6V1, PIP, TAS2R39, TAS2R40, TMEM139, CLCN1, GSKT1, CASP2, FAM131B, ZYX, EPHA1, TAS2R60, OR2R3, OR10AC1, TCAF2, TCAFI, ENSBTAG00000049004, ENSBTAG00000027204, ENSBTAG00000050190, ENSBTAG00000053376, ENSBTAG00000053701, ENSBTAG00000053785, ENSBTAG00000054917, ENSBTAG00000051147, ENSBTAG00000047919, ENSBTAG00000034609, ENSBTAG00000052365, ENSBTAG00000050494, ENSBTAG00000031162	84
	23	18,812,221	22,958,623	3,77E-09	19,331,156	RUNX2, U6, ENPP4, CLIC5, ENPP5, RCAN2, CYP39A1, SLC25A27, TDRD6, ADGRF5, PLA2G7, ANKRD66, ADGRF1, TNFRSF21, CD2AP, ADGRF2, ADGRF4, OPN5, PTCHD, OR9G1, OR5M10C, 5S_rRNA, MEPIA, MMUT, CENPQ, GLYATL3, C23H6orf141, U6, RHAG, CRISP1, CRISP2, CRISP3, 7SK, DEFB114, DEFB110, ENSBTAG00000046237, ENSBTAG00000050850, ENSBTAG00000053808, ENSBTAG00000054396, ENSBTAG00000046711, ENSBTAG00000021415, ENSBTAG00000038677, ENSBTAG00000054235	61
	23	15,094,386	16,094,386	2,66E-07	15,594,386	TREM1, TREM2, TREML1, TREML2, FOXP4, MDFI, TFEB, PGC, FR56, USP49, MED20, TOMM6, BYSL, CCND3, TAF8, GUCA1A, MGC137036, C23H6orf132, GUCA1B, MRPS10, TRERF1, ENSBTAG00000050887, ENSBTAG00000038916, ENSBTAG00000054479, ENSBTAG00000053124	1
	4	105,958,204	107,001,103	5,82E-08	106,492,268	TRBV24-1, TRPV6, TRBV30, TRPV5, KEL, PRSS2, EPHB6, OR9A2, OR9A16, OR9A15, OR6V1, PIP, TAS2R39, TAS2R40, TMEM139, CLCN1, GSKT1, CASP2, FAM131B, ZYX, EPHA1, TAS2R60, OR2R3, OR10AC1, TCAF2, TCAFI, ENSBTAG00000049004, ENSBTAG00000027204, ENSBTAG00000050190, ENSBTAG00000053376, ENSBTAG00000053701, ENSBTAG00000053785, ENSBTAG00000054917, ENSBTAG00000051147, ENSBTAG00000047919, ENSBTAG00000034609, ENSBTAG00000052365, ENSBTAG00000050494, ENSBTAG00000031162	96
5	35,080,801	36,080,801	4,92E-07	35,580,801	DBX2, NELL2, TMEM117	1	
12	67,715,495	68,715,495	3,73E-07	68,215,495	GPC6	1	
14	74,743,059	75,743,059	3,61E-07	75,243,059	MMP16, CNBD1, ENSBTAG00000051556	1	

¹QTL location.²SNP location in the genome assembly.³Positional candidate genes are defined as genes that are located within 50 kb on either side of the identified QTL. When combinations of diagnostics tests were used, animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to any (+/-) or all of them (+/-).<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.t003>

Table 4. Odds ratio (OR) for some the SNPs associated with a positive ELISA-tissue PCR-tissue culture diagnosis (+/-) ($P < 5 \times 10^{-7}$).

Phenotype	BTA	SNP position	SNP ID	Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (95% CI)
ELISA Tissue PCR Tissue Culture (+/-)	23	15,594,386		CCATGGGGT/CCATGGGGT	29 (52.7)	566 (86.0)	1.0
				C/CCATGGGGT	24 (43.6)	89 (13.5)	4.7 (2.6–8.5)
				C/C	2 (3.6)	3 (0.5)	17.5 (2.6–118.3)
	23	19,329,213	rs209106537	C/C	20 (36.4)	461 (70.1)	1.0
				A/C	25 (45.5)	181 (27.5)	3.2 (1.7–5.9)
				A/A	10 (18.2)	16 (2.4)	13.2 (5.2–33.2)
	23	22,401,117	rs385614395	G/G	33 (60.0)	578 (87.8)	1.0
				C/G	18 (32.7)	78 (11.9)	3.8 (2.0–7.2)
				C/C	4 (7.3)	2 (0.3)	43.3 (7.5–249.9)
	23	11,900,592	rs136621504	G/G	37 (67.3)	607 (92.2)	1.0
				A/G	18 (32.7)	51 (7.8)	5.5 (2.9–10.4)
	5	35,577,195	rs110029938	T/T	36 (65.5)	583 (89.1)	1.0
				C/T	17 (30.9)	71 (10.8)	4.2 (2.2–8.0)
				C/C	2 (3.6)	1 (0.2)	44.1 (3.6–538.5)

(+/-) Animals were considered cases when they were positive to all the tests and controls when they were negative to all of them.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091.t004>

Table 3 also presents a list of candidate genes either containing highly-associated SNPs or within 50 kb of the surrounding genomic region of the highly-associated SNPs. We were able to identify candidate genes in all the QTLs except for one located in BTA4. One hundred and fourteen candidate genes were mapped within the 5 QTLs associated with the phenotype with the highest h^2 , the ELISA-tissue culture-tissue PCR (+/-), the majority located on BTA23. The OR calculated for all the SNPs associated with a positive ELISA-tissue PCR-tissue culture diagnosis (+/-) ($P < 5 \times 10^{-7}$) were > 1 indicating that the animals with the minor alleles were more likely to have a positive ELISA-tissue PCR-tissue culture result. The OR for the SNPs defining the peak of each QTL are shown in Table 4 under the codominant genetic model.

Discussion

Previous studies that estimated genetic parameters for PTB in cattle indicated that susceptibility to MAP infection is heritable, with h^2 estimates of susceptibility to the disease ranging from < 0.01 (16) to 0.2843 (18). This is comparable with the moderate heritability ($h^2 = 0.12$) estimated for bTb infection even though the phenotype definitions and models used differed [42]. In our study population, the h^2 estimates were also moderate (ranged from 0.054 to 0.139). Interestingly, we observed that the combination of multiple diagnostic tests increased the h^2 estimates, with the highest h^2 obtained for the combination of ELISA-tissue PCR-tissue culture (+/-) ($h^2 = 0.139$). For this phenotype, all the common SNPs explained ~14% of the phenotypic variance. Except for the tissue culture ($h^2 = 0.101$), the low h^2 estimates obtained for the individual tests ($h^2 < 0.08$) could be attributed to their lack of sensitivity for the detection of animals that are in the subclinical stages of MAP infection (false negatives). While cows testing ELISA-tissue PCR and tissue culture positive are very likely infected, animals could be test-negative because of a false-negative test result, lack of exposure to MAP, or be truly resistant. While a positive test result is almost certainly associated with disease susceptibility, a negative test does not always reflect resistance. In agreement with this, we observed that all the SNPs associated with the ELISA-tissue PCR-tissue culture diagnosis (+/-) had an OR > 1 and were, therefore, associated with disease susceptibility. This implies that susceptibility to MAP infection can be modified using genetic selection. In our study population, only 9 of the 70

ELISA-positive animals couldn't be detected by tissue PCR and culture. As above, these cows could be tissue PCR and culture negative because of a false-negative test result or be truly resistant. PTB resistance defined as the ability of the host to clear the pathogen by mounting a protective immune response deserves further studies.

Our study is unique in the definition of cases and controls through the combination of multiple diagnostic tests including ELISA for detection of humoral responses against MAP, and culture and PCR detection of MAP in tissue samples. Moreover, the population size used ($N = 983$) was bigger than in a previous GWAS using the bovine SNP50 Bead Chip where cases were defined as tissue PCR-tissue culture positives ($N = 459$) [30]. Although a previous study combined the data from two GWAS to identify loci associated with MAP tissue infection and humoral immune response [20], our study provides the first comparison of the genetic effects associated with different phenotypic measurements or diagnostic definitions in a common set of samples using WGS data. Combination test interpretation (all tests negative equals non-infected and all tests positive equals infected) was used to increase the sensitivity of the ELISA-Tissue PCR-tissue culture combination. In addition, the use of imputed WGS increased the accuracy of the GWAS enabling the identification of 12 QTLs surpassing the high threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with MAP infection. These strategies increased the heritability of the trait and reduced the risk of misclassification. Further studies will demonstrate whether the post-mortem examination of gut tissues and regional lymph nodes can improve, even more, the accuracy of the classification of naturally infected animals and uninfected controls, and provides high h^2 estimates. Once a PTB-associated phenotype with a moderate/high h^2 estimate is finally selected, genomic predictions will be developed in small, well-recorded reference populations using the genomic BLUP model, and then the prediction equation will be applied to predict genomic estimated breeding values of Holstein cattle that were genotyped but did not have PTB-associated phenotypes themselves.

Identifying significant SNPs and QTLs associated with PTB susceptibility is extremely important to understand the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of the disease. Our results confirmed that susceptibility to PTB is polygenic with a large number of genetic variants each having a small effect on the regulation of the observed phenotype. Using combinations of diagnostic tests and genotypes imputed to the WGS level, we identified a total of 12 regions associated with PTB susceptibility ($P < 5 \times 10^{-7}$) on 8 chromosomes (BTA4, BTA5, BTA11, BTA12, BTA14, BTA23, BTA24, and BTA28). By examining the available cattle QTL database, we observed that the identified QTLs on BTA23 (18.81–22.95 Mb), BTA24 (45.72–46.72 Mb), and BTA12 overlapped with four regions previously associated with PTB susceptibility; QTL14876, QTL166685, QTL139831, and QTL211947 [25,29,32,43]. This finding provided additional evidence that genes within these regions such as the *adhesion G protein-coupled receptor F1* (*ADGRF1*), *adhesion G protein-coupled receptor F5* (*ADGRF5*), *TNF receptor superfamily member 21* (*TNFRSF21*), *defensin β 110* (*DEFB110*) and *defensin β 114* (*DEFB114*) are likely associated with MAP infection. Previous studies supported a role for the β -defensins as important host defense effector molecules that are rapidly mobilized by the epithelium upon MAP infection [44]. *ADGRF1* and *ADGRF5*, also named *GPR110* and *GRP116*, are G-protein-coupled receptors acting as important regulators in the progression and development of several human inflammatory diseases including IBD, hepatocellular carcinoma, lung cancer, gastric cancer, prostatic cancer, glioma, and colorectal cancer [45]. The *TNFRSF21* is a member of the *TNF/TNFR* family and plays a critical role in pathogen recognition, immune response, inflammation, and tumor progression [46,47]. The encoded protein by this gene activates *nuclear factor kappa-B* (*NF- κ B*) and *mitogen-activated protein kinase 8* (*MAPK-8*, also called *c-Jun N-terminal kinase 1*) and induces cell apoptosis. Fang et al. demonstrated that the level of *TNFRSF21* was dramatically increased in bovine peripheral blood

leucocytes of mastitis cows, which underlines its important regulatory role in bovine mastitis inflammation [48]. More recently, a role for the *TNFRSF21* in the regulation of bovine mastitis susceptibility via GWAS and post-transcriptional analysis was discovered [49]. Interestingly, several PTB-associated QTLs identified in the current study were located on regions previously found to be associated with clinical mastitis including QTL30823, QTL30824, QTL30825, QTL30826, QTL161601, QTL161607, and QTL65863 [48–52].

Other candidate genes identified in BTA23 (18.81–22.95 Mb) include genes involved in the splicing process (*U6*), invasion and migration of tumors (*CLIC5*, *ENPP4*, *ENPP5*), and in the regulation of the *calcineurin-nuclear factor of activated T cells* (*RCAN2*). This region overlapped with QTLs on BTA23 associated with bTb infection in a multi-breed GWAS of Charolais, Limousin, and Holstein Friesian (genetic positions 19.44–22.72 Mb) [42]. Interestingly, this region included the *RCAN2* gene as well. The *RCAN2* is responsible for the regulation of *calcineurin 2*, and *calcineurin* activation promotes the survival of *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) within its host by preventing phagocyte maturation which is required to destroy intracellular bacteria [53]. Our results, together with previous studies, suggested that regulation of *calcineurin 2* may have a pivotal role in the susceptibility of cattle to both bTb and PTB. In addition, a second PTB-associated QTL on BTA23 (11.32–14.19 Mb) overlapped with a bTb-associated QTL (QTL96552) [54].

Several positional candidate genes that we identified in other QTLs were important transcriptional regulators, including the *Forkhead BoxP4* (*FOXP4*), *transcription factor EB* (*TFEB*), the *LIM/homeoboxprotein* (*LHX6*), and the mediator of RNA polymerase II transcription subunit 20 (*MED2*). The *TFEB* acts as a master regulator of lysosomal biogenesis, autophagy, lysosomal exocytosis, lipid catabolism, energy metabolism, and immune response against intracellular pathogens including MTb [55]. Autophagy, an intracellular lysosomal degradation process, is an important cell-autonomous defense system involved in innate and adaptive immune responses and contributes to host defense against various intracellular microbes. Among the transcription factors implicated in autophagy, *TFEB* is a critical regulator of autophagic activation. In the current study, several candidate genes potentially associated with MAP infection were involved in the splicing process, including the *U6* spliceosomal RNA and 7SKRNA. Further studies are needed to determine if the identified SNPs are affecting the positional candidate genes or other genes through cis- or trans-regulatory effects [56].

The candidate genes identified in this study are novel in the sense that they have not been associated with PTB risk in cattle before. Interestingly, some of the candidate genes identified in the current study were previously found associated with mastitis and bTb infection. For instance, the *RCAN2* gene was found associated with bTb infection [42] and with 18 other bovine traits including somatic cell counts [57]. Although the *TNFRSF21* has not been associated with PTB risk in cattle, other members of the *TNF* receptor superfamily such as *TNFRSF18* and *TNFRSF4* are known to stimulate the Th1 cell-mediated immune response and have been previously identified as PTB candidate genes [28]. As mentioned before, the *TNFRSF21* was identified to be involved in the regulation of bovine mastitis susceptibility via GWAS [49].

The candidate genes identified in our study were also compared to candidate genes that were previously identified in CD, IBD, and colorectal cancer to determine if there was any overlap. Five of the candidate genes identified in the current study; the *TNFRSF21*, *ADGRF1*, *FOXP4*, *Cyclin D3* (*CCND3*), and *Transmembrane Protein 117* (*TMEM117*) were previously found to be associated with IBD [58]. *FOXP4* and *CCND3* were also found associated with CD. Recent association analysis identified a new risk locus harboring the *TFEB* for colorectal cancer susceptibility [59]. Using the candidate genes identified in our study, we could not find any enriched pathway underlying PTB susceptibility. However, several of the identified candidate

genes matched genes in the Innate DB database with relevant innate immunity functions such as the *triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1 and 2* (*TREM1*, *TREM2*), *triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells like 1 and 2* (*TREML1*, *TREML2*), *Canopy FGF Signaling Regulator 3* (*CNPY3*), *Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B'Delta* (*PPP2R5D*), *Cysteine Rich Secretory Protein 3* (*CRISP3*), *Anoctamin 6* (*ANO6*), *Protein Inhibitor of Activated STAT2* (*PIAS2*), *DAB2 Interacting protein* (*DAB2IP*), and *MAPK8*.

Conclusions

In summary, combining phenotypes and WGS into a joint GWAS improved the power for detecting genetic associations in Spanish Holstein cattle. Our results validated some previously reported associations and identified novel SNPs, QTLs, and candidate genes associated with the antibody response to MAP infection and with MAP detection in infected tissues. Furthermore, the addition to genotyping assays of the SNPs identified in the current study would allow producers to select cattle that are less susceptible to PTB and likely to other bovine diseases as well; ultimately reducing the spread of diseases, preventing further economic losses, and reducing antimicrobial use. Consequently, a reduction of the presence of MAP in the environment may also be beneficial to humans, especially if the link between MAP and human inflammatory diseases is confirmed.

Supporting information

S1 Fig. Genomic distribution of the SNPs surpassing the significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with MAP infection status. The chart depicts the genomic distribution of the SNPs associated with (A) ELISA-tissue culture-tissue PCR (+/-), (B) ELISA-tissue culture-tissue PCR (+), (C) ELISA-tissue culture (+), and (D) ELISA-tissue PCR (+) according to the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). (TIF)

S2 Fig. Quantile-quantile plots of $-\log(P\text{-values})$ for genome-wide association analysis for susceptibility to MAP infection. The plots showed a distribution close to the expected distribution line for the following phenotypes: ELISA-tissue PCR-tissue culture (+/-) ($\lambda_{\text{median}} = 1.007$), ELISA-tissue PCR-tissue culture (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.004$), ELISA-tissue culture (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.006$), and ELISA-tissue PCR (+) ($\lambda_{\text{median}} = 1.006$). The red line is the slope expected under no inflation and no true association, the y-axis represents the observed $-\log(P\text{-values})$, and the x-axis represents the expected $-\log(P\text{-values})$, under the null hypothesis of no association. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Rosario Sánchez from the i2basque Research and Academic Network for computational support. We gratefully acknowledge the 1000 Bull Genomes Consortium for providing accessibility to WGS data that was used in this study.

Author Contributions

Conceptualization: Oscar González-Recio, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Data curation: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Gerard Badia-Bringué, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Formal analysis: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Gerard Badia-Bringué, José Luis Lavín, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Funding acquisition: Marta Alonso-Hearn.

Investigation: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Gerard Badia-Bringué, José Luis Lavín, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Methodology: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Project administration: Marta Alonso-Hearn.

Resources: Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, José Luis Lavín, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

Software: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Gerard Badia-Bringué, José Luis Lavín.

Supervision: Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Marta Alonso-Hearn.

Validation: Maria Canive, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste.

Visualization: Maria Canive, José Luis Lavín, Marta Alonso-Hearn.

Writing – original draft: Maria Canive.

Writing – review & editing: Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Patricia Vázquez, Gerard Badia-Bringué, José Luis Lavín, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste, Marta Alonso-Hearn.

References

1. Nielsen SS, Toft N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev Vet Med.* 2009; 88(1):1–14. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003> PMID: 18817995
2. Ott SL, Wells SJ, Wagner BA. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med.* 1999; 40(3–4):179–92. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00037-9) PMID: 10423773
3. Hasonova L, Pavlik I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Vet Med.* 2006; 51(5):193–211. <https://doi.org/10.17221/5539-VETMED>
4. Sweeney RW. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am—Food Anim Pract.* 2011; 27(3):537–46. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001> PMID: 22023832
5. Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: A review with a focus on vaccination. *J Immune Based Ther Vaccines* 2011; 9(1):8. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8> PMID: 22035107
6. Juste RA, Elguezabal N, Garrido JM, Pavon A, Geijo MV, Sevilla I, et al. On the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in the blood of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2008; 3(7):3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002537> PMID: 18596984
7. Jeyanathan M, Boutros-Tadros O, Radhi J, Semret M, Bitton A, Behr MA. Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes Infect.* 2007; 9(14–15):1567–73. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.001> PMID: 18062905
8. Pierce ES. Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis... and colorectal cancer? *Infect Agent Cancer.* 2018; 13(1):1–6. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3> PMID: 29308085
9. Juste RA, Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo M, Vázquez P, Sevilla IA, et al. Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated

- paratuberculosis vaccine in a field trial. *BMC Res Notes*. 2009; 2. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-233> PMID: 19930604
10. Alonso-Hearn M, Molina E, Gejjo M, Vázquez P, Sevilla IA, Garrido JM, et al. Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *J Dairy Sci*. 2012; 95(2):618–29. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2860> PMID: 22281327
 11. Garrido JM, Vázquez P, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Gejjo MV., et al. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One*. 2013; 8(11):2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080985> PMID: 24303029
 12. Groenendaal H, Nielen M, Jalvingh AW, Horst SH, Galligan DT, Hesselink JW. A simulation of Johne's disease control. *Prev Vet Med*. 2002; 54(3):225–45. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(02\)00027-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(02)00027-2) PMID: 12114011
 13. Garry F. Control of paratuberculosis in dairy herds. *Vet Clin North Am—Food Anim Pract*. 2011; 27(3):599–607. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.006> PMID: 22023838
 14. Vázquez CB, Alonso-Hearn M, Juste RA, Canive M, Iglesias T, Iglesias N, et al. Detection of latent forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis diagnostic sensitivity. *PLoS One*. 2020; 15(9 September 2020):1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236336> PMID: 32881863
 15. Tsairidou S, Allen A, Banos G, Coffey M, Anacleto O, Byrne AW, et al. Can we breed cattle for Lower Bovine TB infectivity? *Front Vet Sci*. 2018; 5(DEC):1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00310> PMID: 30581821
 16. Koets AP, Adugna G, Janss LLG, Van Weering HJ, Kalis CHJ, Wentink GH, et al. Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2000; 83(11):2702–8. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75164-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75164-2) PMID: 11104291
 17. Gonda MG, Chang YM, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW. Effect of *Mycobacterium paratuberculosis* infection on production, reproduction, and health traits in US Holsteins. *Prev Vet Med*. 2007; 80(2–3):103–19. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.01.011> PMID: 17350703
 18. Küpper JD, Brandt HR, Erhardt G. Genetic association between NOD2 polymorphism and infection status by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in German Holstein cattle. *Anim Genet*. 2014; 45(1):114–6. <https://doi.org/10.1111/age.12097> PMID: 24320212
 19. Zare Y, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW. Genome-wide association analysis and genomic prediction of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in US Jersey cattle. *PLoS One*. 2014; 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088380> PMID: 24523889
 20. Minozzi G, Williams JL, Stella A, Strozzi F, Luini M, Settles ML, et al. Meta-analysis of two genome-wide association studies of bovine paratuberculosis. *PLoS One*. 2012; 7(3):1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032578> PMID: 22396781
 21. Settles M, Zanella R, McKay SD, Schnabel RD, Taylor JF, Whitlock R, et al. A whole genome association analysis identifies loci associated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection status in US Holstein cattle. *Anim Genet*. 2009; 40(5):655–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01896.x> PMID: 19422364
 22. Zanella R, Settles ML, McKay SD, Schnabel R, Taylor J, Whitlock RH, et al. Identification of loci associated with tolerance to Johne's disease in Holstein cattle. *Anim Genet*. 2011; 42(1):28–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02076.x> PMID: 20477805
 23. Pant SD, Schenkel FS, Verschoor CP, You Q, Kelton DF, Moore SS, et al. A principal component regression based genome wide analysis approach reveals the presence of a novel QTL on BTA7 for MAP resistance in Holstein cattle. *Genomics*. 2010; 95(3):176–82. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.01.001> PMID: 20060464
 24. Alpay F, Zare Y, Kamalludin MH, Huang X, Shi X, Shook GE, et al. Genome-wide association study of susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Holstein cattle. *PLoS One*. 2014; 9(12):1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111704> PMID: 25473852
 25. Kirkpatrick BW, Shi X, Shook GE, Collins MT. Whole-Genome association analysis of susceptibility to paratuberculosis in Holstein cattle. *Anim Genet*. 2011; 42(2):149–60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02097.x> PMID: 20618184
 26. van Hulzen KJE, Schopen GCB, van Arendonk JAM, Nielen M, Koets AP, Schrooten C, et al. Genome-wide association study to identify chromosomal regions associated with antibody response to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of Dutch Holstein-Friesians. *J Dairy Sci*. 2012; 95(5):2740–8. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5005> PMID: 22541504
 27. Brito LF, Mallikarjunappa S, Sargolzaei M, Koeck A, Chesnais J, Schenkel FS, et al. The genetic architecture of milk ELISA scores as an indicator of Johne's disease (paratuberculosis) in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 2018; 101(11):10062–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14250> PMID: 30219422

28. Mallikarjunappa S, Sargolzaei M, Brito LF, Meade KG, Karrow NA, Pant SD. Short communication: Uncovering quantitative trait loci associated with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using a high-density single nucleotide polymorphism panel. *J Dairy Sci.* 2018; 101(8):7280–6. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14388> PMID: 29753465
29. Gao Y, Jiang J, Yang S, Cao J, Han B, Wang Y, et al. Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics.* 2018; 19(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4368-0> PMID: 29291715
30. Kiser JN, White SN, Johnson KA, Hoff JL, Taylor JF, Neiberghs HL. Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) tissue infection in cattle. *J Anim Sci.* 2017; 95(3):1080–91. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1152> PMID: 28380509
31. McGovern SP, Purfield DC, Ring SC, Carthy TR, Graham DA, Berry DP. Candidate genes associated with the heritable humoral response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cows have factors in common with gastrointestinal diseases in humans. *J Dairy Sci.* 2019; 102(5):4249–63. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15906> PMID: 30852025
32. Sanchez MP, Guatteo R, Davergne A, Saout J, Grohs C, Deloche MC, et al. Identification of the ABCC4, IER3, and CBFA2T2 candidate genes for resistance to paratuberculosis from sequence-based GWAS in Holstein and Normande dairy cattle. *Genet Sel Evol.* 2020; 52(1):1–17. <https://doi.org/10.1186/s12711-019-0522-2> PMID: 31941436
33. Pavlik I, Matlova L, Bartl J, Svastova P, Dvorska L, Whitlock R. Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet Microbiol.* 2000; 77(3–4):309–24. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00316-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00316-3) PMID: 11118716
34. Vázquez P, Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, et al. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian cattle. *Vet Med Int.* 2014; 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/321327> PMID: 24971191
35. Juste RA, Marco JC, Sáez de Ocariz C, Adúriz JJ. Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 1991; 28(4):385–90. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90073-o](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90073-o) PMID: 1949552
36. Loh PR, Palamara PF, Price AL. Fast and accurate long-range phasing in a UK Biobank cohort. *Nat Genet.* 2016; 48(7):811–6. <https://doi.org/10.1038/ng.3571> PMID: 27270109
37. Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet.* 2016; 48(10):1284–7. <https://doi.org/10.1038/ng.3656> PMID: 27571263
38. Hayes BJ, Daetwyler HD. 1000 Bull Genomes project to map simple and complex genetic traits in cattle: Applications and Outcomes. *Annu Rev Anim Biosci.* 2019; 7:89–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115024> PMID: 30508490
39. Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet.* 2011; 88(1):76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011> PMID: 21167468
40. González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics.* 2007; 23(5):644–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm025> PMID: 17267436
41. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc.* 2009; 4(8):1184–91. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97> PMID: 19617889
42. Ring SC, Purfield DC, Good M, Breslin P, Ryan E, Blom A, et al. Variance components for bovine tuberculosis infection and multi-breed genome-wide association analysis using imputed whole genome sequence data. *PLoS One.* 2019; 14(2):1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212067> PMID: 30763354
43. Del Corvo M, Luini M, Stella A, Pagnacco G, Ajmone-Marsan P, Williams JL, et al. Identification of additional loci associated with antibody response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cattle by GSEA–SNP analysis. *Mamm. Genome.* 2017; 28, 520–527. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9714-7> PMID: 28864882
44. Stolzenberg ED, Anderson GM, Ackermann MR, Whitlock RH, Zasloff M. Epithelial antibiotic induced in states of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; U. S. A. 94, 8686–8690. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8686> PMID: 9238038
45. Ma B, Zhu J, Su J, Pan F, Ji Y, et al. The role of GPR110 in lung cancer progression. *Ann Transl Med.* 2020; 8(12):745. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3146> PMID: 32647670
46. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell.* 2001; 104(4):487–501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00237-9) PMID: 11239407

47. Strlic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, Wachsmuth L, Han K, Müller UC, et al. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*. 2016; 536(7615):215–8. <https://doi.org/10.1038/nature19076> PMID: 27487218
48. Fang L, Sahana G, Su G, Yu Y, Zhang S, Lund MS, et al. Integrating sequence-based GWAS and RNA-Seq provides novel insights into the genetic basis of mastitis and milk production in dairy cattle. *Sci Rep*. 2017; 7(March):1–16. <https://doi.org/10.1038/srep45560> PMID: 28358110
49. Yang F, Chen F, Li L, Yan L, Badri T, Lv C, et al. Three novel players: PTK2B, SYK, and TNFRSF21 were identified to be involved in the regulation of bovine mastitis susceptibility via GWAS and post-transcriptional analysis. *Front Immunol*. 2019; 10:1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00001> PMID: 30723466
50. Wojdak-Maksymiec K, Szyda J, Strabel T. Parity-dependent association between TNF- α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Vet Res*. 2013; 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-114> PMID: 23758855
51. Cai Z, Gulbrandsen B, Lund MS, Sahana G. Prioritizing candidate genes post-GWAS using multiple sources of data for mastitis resistance in dairy cattle. *BMC Genomics*. 2018; 19, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4368-0> PMID: 29291715
52. Tiezzi F, Parker-Gaddis KL, Cole JB, Clay JS & Maltecca C. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One*. 2015; 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114919> PMID: 25658712
53. Trimble WS, Grinstein S. TB or not TB: Calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell*. 2007; 130(1):12–4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.039> PMID: 17632049
54. Richardson I. W. et al. A genome-wide association study for genetic susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23. *Genet. Sel. Evol*. 2016; 48, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0181-x> PMID: 26743767
55. Kim SH, Kim G, Han DH, Lee M, Kim I, Kim B, et al. Ezetimibe ameliorates steatohepatitis via AMP-activated protein kinase-TFEB-mediated activation of autophagy and NLRP3 inflammasome inhibition. *Autophagy*. 2017; 13(10):1767–81. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1356977> PMID: 28933629
56. Canive M. et al. Identification of loci associated with susceptibility to bovine paratuberculosis and with the dysregulation of the MECOM, eEF1A2, and U1 spliceosomal RNA expression. *Sci. Rep.* 2021; 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79139-8> PMID: 33414495
57. Cole JB, Wiggins GR, Ma L, Sonstegard TS, Lawlor TJ, Crooker BA, et al. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U. S. Holstein cows. *BMC Genomics*. 2011; 12:1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-408> PMID: 21831322
58. Kakuta Y, Kawai Y, Okamoto D, Takagawa T, Ikeya K, Sakuraba H, et al. NUDT15 codon 139 is the best pharmacogenetic marker for predicting thiopurine-induced severe adverse events in Japanese patients with inflammatory bowel disease: a multicenter study. *J Gastroenterol*. 2018; 53(9):1065–78. <https://doi.org/10.1007/s00535-018-1486-7> PMID: 29923122
59. Law PJ, Timofeeva M, Fernandez-Rozadilla C, Broderick P, Studd J, Fernandez-Tajes J, et al. Association analyses identify 31 new risk loci for colorectal cancer susceptibility. *Nat Commun*. 2019; 10(1):1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07882-8> PMID: 30602773

ESTUDIO IV

Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using whole-genome sequence data.

Canive M, Badia-Bringué G, Vázquez P, González-Recio O, Fernández A, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M.

Scientific Reports, 2021, 11(1):20177.

Índice de impacto: 4,379

Área: Multidisciplinar

Cuartil: Q1



OPEN Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using whole-genome sequence data

Maria Canive^{1,2}, Gerard Badia-Bringué^{1,3}, Patricia Vázquez¹, Oscar González-Recio^{4,5}, Almudena Fernández⁴, Joseba M. Garrido¹, Ramón A. Juste¹ & Marta Alonso-Hearn¹✉

Bovine paratuberculosis (PTB), caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), is a chronic granulomatous enteritis that affects cattle worldwide. According to their severity and extension, PTB-associated histological lesions have been classified into the following groups; focal, multifocal, and diffuse. It is unknown whether these lesions represent sequential stages or divergent outcomes. In the current study, the associations between host genetic and pathology were explored by genotyping 813 Spanish Holstein cows with no visible lesions (N = 373) and with focal (N = 371), multifocal (N = 33), and diffuse (N = 33) lesions in gut tissues and regional lymph nodes. DNA from peripheral blood samples of these animals was genotyped with the bovine EuroG MD Bead Chip, and the corresponding genotypes were imputed to whole-genome sequencing (WGS) data using the 1000 Bull genomes reference population. A genome-wide association study (GWAS) was performed using the WGS data and the presence or absence of each type of histological lesion in a case-control approach. A total of 192 and 92 single nucleotide polymorphisms (SNPs) defining 13 and 9 distinct quantitative trait loci (QTLs) were highly-associated ($P \leq 5 \times 10^{-7}$) with the multifocal (heritability = 0.075) and the diffuse (heritability = 0.189) lesions, respectively. No overlap was seen in the SNPs controlling these distinct pathological outcomes. The identified QTLs overlapped with some QTLs previously associated with PTB susceptibility, bovine tuberculosis susceptibility, clinical mastitis, somatic cell score, bovine respiratory disease susceptibility, tick resistance, IgG level, and length of productive life. Pathway analysis with candidate genes overlapping the identified QTLs revealed a significant enrichment of the keratinization pathway and cholesterol metabolism in the animals with multifocal and diffuse lesions, respectively. To test whether the enrichment of SNP variants in candidate genes involved in the cholesterol metabolism was associated with the diffuse lesions; the levels of total cholesterol were measured in plasma samples of cattle with focal, multifocal, or diffuse lesions or with no visible lesions. Our results showed reduced levels of plasma cholesterol in cattle with diffuse lesions. Taken together, our findings suggested that the variation in MAP-associated pathological outcomes might be, in part, genetically determined and indicative of distinct host responses.

¹Department of Animal Health, NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Bizkaia, Spain. ²Doctoral Program in Immunology, Microbiology and Parasitology, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain. ³Doctoral Program in Molecular Biology and Biomedicine, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain. ⁴Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, CSIC, Madrid, Spain. ⁵Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, Madrid, Spain. ✉email: malonso@neiker.eus

PTB-associated lesion	Cases (%)	Controls (%)	Num. of SNPs Moderate association	Num. of SNPs High association	Additive genetic variance (σ^2_a)	SE	Residual variance (σ^2_e)	SE	Heritability (h^2)
Focal	371 (49.87)	373 (50.13)	0	0	0.036345	0.019569	0.213189	0.021248	0.145651
Multifocal	33 (8.13)	373 (91.87)	277	129	0.005637	0.010162	0.069210	0.011124	0.075320
Diffuse	36 (8.80)	373 (91.20)	647	92	0.014969	0.009401	0.063845	0.009981	0.189929

Table 1. Number of cases and controls, variance components, standard errors (SE), and h^2 estimates.

Paratuberculosis (PTB) or Johne's disease is a chronic enteritis of domestic and wild ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB is a major problem for animal health and must be notified to the World Organization for Animal Health. In Europe and North America, PTB is considered endemic in dairy cattle, with herd prevalence estimates higher than 50%¹. PTB causes great economic losses to the dairy industry due to decreased milk production, weight loss, replacement cost, reduced slaughter value, a greater risk to other health problems, premature culling or death from the clinical disease, and the costs of veterinary expenses and control measures^{2,3}. Infection occurs in the first months of life, primarily through the fecal–oral route, but clinical onset only takes place around calving when animals are 18 months or older. The most common clinical signs are decreased milk yield, chronic diarrhea, and progressive weight loss that eventually result in death of the animal⁴. However, most infected animals do not develop clinical disease, and microbiological and immunological diagnostic tests are not sensitive enough to identify them⁵. MAP has been postulated as a possible trigger factor in several autoimmune diseases in humans such as Crohn's disease (CD)⁶, type I diabetes⁷, multiple sclerosis⁸, or rheumatoid arthritis⁹. It has been hypothesized that some antigenic structures of MAP are cross-reactive to self-proteins and might be responsible for these human autoimmune diseases in genetically predisposed individuals¹⁰. Colorectal cancer is a complication of the two forms of idiopathic inflammatory bowel disease (IBD); colonic CD and ulcerative colitis. Interestingly, MAP bacilli have been detected in the intestines of patients with CD, ulcerative colitis, and IBD-associated colorectal cancer^{11,12}.

MAP causes lesions in naturally and experimentally infected cattle that differ in severity. According to their extension, cellular inflammatory infiltrate composition, and amount of MAP present in the lesions, PTB-associated lesions were classified into the following categories: focal, multifocal, and diffuse (diffuse paucibacillary or lymphoplasmacytic, diffuse intermediate, and diffuse multibacillary or histiocytic)^{13,14}. Focal lesions consist of small granulomas in the ileal and jejunal lymph nodes or the ileocecal lymphoid tissue. In the multifocal lesions, middle size granulomas appear in the apex of some intestinal villi, as well as in the lymph nodes. These middle size granulomas are formed by groups of macrophages, surrounded by lymphocytes, and do not cause diffuse enteritis or modify the normal architecture of the intestine. In the diffuse paucibacillary or lymphoplasmacytic lesions, lymphocytes are the main cellular type, with some macrophages containing few if any mycobacteria. In diffuse intermediate lesions, the infiltrate is formed by abundant lymphocytes, macrophages, and Langhans giant cells with moderate numbers of acid-fast bacilli. Diffuse multibacillary or histiocytic lesions associate with severe granulomatous enteritis affecting different intestinal locations and lymph nodes, and are formed mainly by foamy macrophages loaded with cholesterol and large numbers of MAP. Two disease phenotypes, latent and patent, have been established with most infected cows classified as latent⁵. Clinical signs are exclusively associated with the diffuse lesions.

There is considerable variation among individuals in the response to MAP infection, a proportion of which is genetic. In a previous study, we compared the genetic determinants associated with ante-mortem (serum ELISA) and post-mortem (tissue PCR and culture) diagnostic definitions in a common set of animals using whole-genome sequence (WGS) data¹⁵. Combination test interpretation (all tests negative equals non-infected and all tests positive equals infected) was used to increase the sensitivity of the ELISA-Tissue PCR-tissue culture combination. This strategy reduced the risk of misclassification and increased the heritability (h^2) of the trait ($h^2 = 0.139$) when compared with the h^2 of the individual tests ($h^2 < 0.08$). In the current study, we explored the genetic basis of the PTB-associated pathology and whether the post-mortem examination of gut tissues and regional lymph nodes could improve the accuracy of the classification of infected animals and uninfected controls providing higher h^2 estimates. For this purpose, variance components and h^2 were estimated for each type of MAP-associated histopathological lesion in a population of Spanish Holstein cattle ($N = 813$). Subsequently, single nucleotide polymorphisms (SNPs), quantitative trait loci (QTLs), candidate genes within significant QTLs, and functional pathways were identified.

Results

Variance components and h^2 estimates. Initially, the h^2 estimates were calculated for the presence ($N = 440$) or absence ($N = 373$) of any type of histopathological lesion in the case–control population. When contrasting these two PTB outcomes, the h^2 estimate was 0.155 but no SNPs surpassed the $FDR < 0.05$. Consequently, h^2 estimates were calculated for the presence or absence of each specific type of histopathological lesion; ranging from 0.075 for the multifocal lesions, 0.145 for the focal, and 0.189 for the diffuse lesions. The variance components, h^2 estimates, and frequency of cases with focal (49.87%), multifocal (8.13%) or diffuse lesions (8.80%) are presented in Table 1. Control cows did not have visible lesions in gut tissues and had a negative ELISA, tissue PCR and culture result at the time of slaughter.

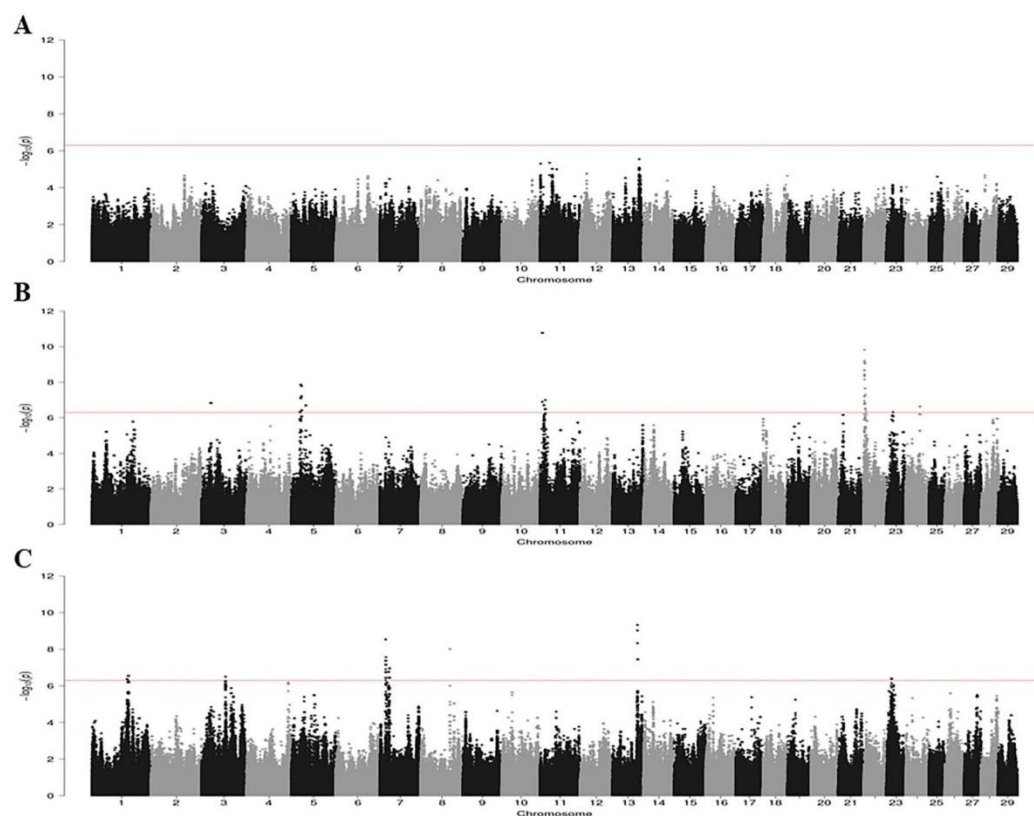


Figure 1. Manhattan plots showing $-\log_{10}(P$ values) of association between every single SNP and phenotype. Each dot represents the result from the test association for a single SNP. Animals were considered cases when they had focal (A), multifocal (B) or diffuse (C) lesions. Chromosomes localization of the SNPs associated with each type of lesion is indicated on the x-axis. The red horizontal line is drawn at $-\log_{10}(5 \times 10^{-7})$ to show the high level of significance.

SNPs, QTLs, and candidate genes identification. To explore the genetic basis of the PTB-associated pathology, a genome-wide association study (GWAS) using the WGS datasets and the presence or absence of focal, multifocal or diffuse lesions was performed. The number of SNPs that surpassed the moderate (between $P = 5 \times 10^{-5}$ and $P = 5 \times 10^{-7}$) and the high ($P < 5 \times 10^{-7}$) thresholds is presented in Table 1. A total of 277 and 647 SNPs were moderately-associated with the multifocal and diffuse lesions, respectively. With the high threshold of association, we identified 129 and 92 SNPs highly-associated with the multifocal and the diffuse lesions, respectively. Interestingly, no overlap was seen in the SNPs with high and moderate association with the multifocal and diffuse lesions. As seen in Fig. 1A, there was not any SNP surpassing the high threshold of association with the focal lesions. In contrast, several chromosomal regions were highly-associated with the multifocal (Fig. 1B) and diffuse (Fig. 1C) lesions. While SNPs highly-associated with the multifocal lesions were located in BTA3, BTA5, BTA11, BTA22, BTA23, and BTA24, associations with the diffuse lesions were found in BTA1, BTA3, BTA7, BTA8, BTA13 and BTA23. For the multifocal and diffuse lesions, most of the highly-associated SNPs were located in intronic regions; 50 and 51%, respectively. For the multifocal lesions, 18 and 12% of the SNP were downstream and upstream gene variants, respectively. In contrast, only 2 and 5% of the SNPs associated with the diffuse lesions were downstream and upstream gene variants and none of the diffuse-associated SNPs were in 3' UTR positions (Supplementary Fig. 1).

A description of the SNPs associated with the multifocal lesions surpassing the threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$), P values, along with candidate genes located within the defined QTLs are presented in Table 2. The 129 SNPs associated with the multifocal lesions resided within 13 QTLs on 6 chromosomes including BTA3, BTA5, BTA11, BTA22, BTA23, and BTA24. The BTA5 harbored 4 of the 13 QTL regions. The quantitative trait locus (QTL) that harbored the most genome-wide significantly-associated SNP was located on BTA11 (5.22–6.61 Mb). The largest QTL was located on BTA22 (2.63–4.93 Mb). By examining the available cattle QTL database, we observed that the QTL that harbored the most genome-wide significantly-associated SNP (rs438855113) located on BTA11 (5.22–6.61 Mb) overlapped with regions previously associated with susceptibility to PTB (QTL169911, QTL169912, and QTL169913)¹⁶, clinical mastitis (QTL5450)¹⁷, and tick resistance (QTL101152

BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P value most significant SNP	SNP position ²	Annotation	Genes in QTL ³	No of significant SNPs in QTL
3	24233907	25325344	1.50E-07	24825344	Intergenic	TBX15, U6, SPAG17, GDAP2, WDR3, ENSBTAG00000048491, ENSBTAG00000051931	12
5	24941743	26254968	1.39E-08	25667192	Intron	VEZT, METAP2, USP44, MUCL1, GLYCAM1, PPP1R1A, PDE1B, NCKAP1L, ZNF385A, GTSF1, GPR84, ITGA5, COPZ1, NFE2, HNRNP1A, CBX5, SMUG1, HOXC5, HOXC4, HOXC6, HOXC13, HOXC8, HOXC9, HOXC10, HOXC11, HOXC12, U6, ENSBTAG00000052805, ENSBTAG00000053941, ENSBTAG00000029988, ENSBTAG00000049200, ENSBTAG00000023670, ENSBTAG00000049405, ENSBTAG00000010711, ENSBTAG00000053336, ENSBTAG00000049915, ENSBTAG00000049837, ENSBTAG00000048717, ENSBTAG00000052958, ENSBTAG00000055223, ENSBTAG0000005385, ENSBTAG00000036381, ENSBTAG00000053232, ENSBTAG00000029788, ENSBTAG00000053186, ENSBTAG00000052715, ENSBTAG00000052501, ENSBTAG00000051607, ENSBTAG00000051555	24
5	38788039	39790008	2.04E-07	39288039	Intron	PDZRN4, CNTN1, ENSBTAG0000001079	2
5	23274617	24292059	4.92E-07	23774617	Intergenic	UBE2N, MRPL42, SOCS2, CRADD, PLXNC1, CEP83, TMCC3, ENSBTAG00000033531, ENSBTAG00000049886, ENSBTAG00000053589, ENSBTAG00000050045, ENSBTAG00000052916	5
5	27260957	28354826	1.69E-08	27777338	Intergenic	KRT77, KRT1, KRT2, KRT73, KRT72, KRT74, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT75, KRT82, KRT84, KRT85, KRT89, KRT83, KRT81, KRT7, KRT80, SMIM41, ATG101, NR4A1, TAMALIN, ACVR1B, ACVRL1, ANKRD33, FIGNL2, SCN8A, U6, SLC4A8, ENSBTAG00000054953, ENSBTAG00000040019, ENSBTAG00000052798, ENSBTAG00000054816, ENSBTAG00000054136, ENSBTAG00000016166, ENSBTAG00000049194, ENSBTAG00000023471	6
11	12914642	14422761	1.01E-07	13611793	Intron	DYSF, ZNF638, PAIP2B, ATP6V1B1, FIGLA, NAGK, VAX2, CLEC4E, TEX261, CD207, ANKRD53, ADD2, TGFA, FAM136A, XDH, SRD5A2, ENSBTAG00000048791, ENSBTAG00000051968, ENSBTAG00000050557, ENSBTAG00000051045	4
11	5223771	6618872	1.66E-11	5755689	Intergenic	AFF3, CHST10, NMS, PDCL3, NPAS2, TBC1D8, CNOT11, RFX8, RNFI49, CREG2, MAP4K4, ENSBTAG00000050215, ENSBTAG00000043158, ENSBTAG00000054755	7
Continued							

BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P value most significant SNP	SNP position ²	Annotation	Genes in QTL ³	No of significant SNPs in QTL
11	9416584	10698629	1.98E-07	9916584	Intergenic	TACR1, POLE4, U6, HK2, SEMA4F, MIAP, RTKN, DOK1, MRPL53, LOXL3, WBP1, DCTN1, HTRA2, WDR54, AUP1, DOX1, C11H2orf81, MGC152281, TLX2, PCGF1, LBX2, CCDC142, MOGS, INO80B, SLC4A5, MOB1A, MTHFD2, BOLA3, TET3, DGUOK, ENSBTAG00000049427, ENSBTAG00000050345, ENSBTAG00000010072, ENSBTAG00000050408, ENSBTAG00000049783	3
22	5865513	6865513	4.85E-07	6365513	Intron	STT3B, OSBP10, GPD1L, CMTM8, CMTM7, ENSBTAG00000050895	1
22	2638700	4937859	8.62E-10	3138700	Intergenic	CMC1, AZI2, RBMS3, bla-mir-11990, U6, ENSBTAG00000022751, ENSBTAG00000050982, ENSBTAG00000048601, ENSBTAG00000052346	15
22	1280377	2574848	1.50E-10	2008232	Intergenic	U1, SEC61G, NEK10, U6, SLC4A7, 5S_rRNA, EOMES	18
23	17326599	18326599	4.92E-07	17826599	Intergenic	VEGFA, U6, MYMX, SPATS1, TMEM63B, HSP90AB1, CDC5L, CAPN11, NFKBIE, SLC9A1, SLC35B2, TMEM151B, AARS2, SUPT3H, 5S_rRNA, ENSBTAG00000050989, ENSBTAG00000049965, ENSBTAG00000050049, ENSBTAG00000050249, ENSBTAG00000050117, ENSBTAG00000053551, ENSBTAG00000053897	1
24	37183179	38191028	2.33E-07	37683179	Intron	EMILIN2, LPIN2, MYOM1, MYL12A, MYL12B, TGIF1, DLGAP1, SNORA70, ENSBTAG00000052283	31

Table 2. QTLs surpassing the significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with the multifocal lesions. ¹QTL location, ²SNP location in the genome assembly, ³Positional candidate genes are defined as genes that are located within 50 kb on either side of the identified QTL.

and QTL101166)¹⁸ (Supplementary Table 1). Another QTL associated to the multifocal lesions and located in BTA5 (27.26–28.35 Mb) overlapped with a QTL previously associated to PTB susceptibility (QTL14844)¹⁹. Interestingly, the QTL identified in BTA23 (17.32–18.32) overlapped with QTLs associated with blood IgG levels (QTL66214, QTL66215, QTL66217, QTL66218, QTL66219, QTL66220, QTL66221, QTL66222, QTL20493)²⁰. Genes within this region such as the *NFKB Inhibitor Epsilon* (*NFKBIE*) control the response to several bacterial and viral pathogens as well as vaccines, possibly by influencing antibody production. The candidate genes associated with the multifocal lesions are novel in the sense that they have not been associated with PTB risk in cattle before except the *Neuronal PAS domain protein 2* (*NPAS2*) a member of the basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS family of transcription factors. *NPAS2* is a core component of the circadian clock, an important regulator of a wide array of physiological functions including metabolism, sleep, body temperature, blood pressure, endocrine, immune, cardiovascular, and renal function.

The GWAS defined 92 SNPs and 9 QTLs with a high association with the diffuse lesions located in 6 chromosomes (BTA1, BTA3, BTA7, BTA8, BTA13 and BTA23) (Table 3). By examining the available cattle QTL database, we observed that a QTL located on BTA7 (23.79–25.08 Mb) overlapped with a QTL previously associated with PTB susceptibility (QTL166688) (Supplementary Table 2)²¹. The QTL on BTA3 (63.43–64.43 Mb) overlapped with the QTL167791 and QTL2489 associated with bovine tuberculosis (bTb) susceptibility and clinical mastitis, respectively^{22,23}. In addition, the QTL identified in BTA23 (13.56–14.56 Mb) overlapped with QTLs associated with bTb (QTL96552), clinical mastitis (QTL164913), and IgG levels (QTL66214, QTL66215, QTL66216, QTL66217, QTL66218, QTL66219, QTL66220, QTL66221, and QTL66222)^{20,24,25}. The candidate genes associated with the diffuse lesions had not been associated with PTB risk in cattle before except the *Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules* (*ICAM*)-3 or *CD209*^{26,27}.

Quantile–quantile plots and odds ratios. Quantile–quantile plots comparing the observed distribution of $-\log(P$ values) to the expected values under null hypothesis were generated. The plots showed a distribution close to the expected distribution for the following phenotypes: focal vs undetected lesions ($\lambda_{\text{median}} = 1.01689$), multifocal vs undetected lesions ($\lambda_{\text{median}} = 1.04401$), and diffuse versus undetected lesions ($\lambda_{\text{median}} = 1.03222$), indicating that significant values were not overestimated due to population stratification or cryptic relatedness.

BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P value most significant SNP	SNP position ²	Annotation	Genes in QTL ³	No of significant SNPs in QTL
1	97006475	98111140	2.78E-07	97523460	Intergenic	SLC7A14, CLDN11, SKIL, PRKCI, U2, PHC3, U6, GPR160, SEC62, SAMD7, LRRIQ4, LRRC34, MYNN, ACTRT3, Telomerase-vert, ENSBTAG00000049676, ENSBTAG00000042535, ENSBTAG00000045991, ENSBTAG00000053891, ENSBTAG00000047144	35
1	93955885	94925704	4.30E-07	94425704	Intron	SPATA16, ECT2, NCEH1	8
3	63439078	64439078	3.16E-07	63939078	Upstream	U6, ENSBTAG00000052602	1
7	15613384	17275615	2.91E-09	16113384	Intron	PDE4A, KEAP1, s1PR5, ATG4D, KR11, CDKN2D, AP1M2, SLC44A2, ILF3, QTRT1, DNM2, TMED1, C7H19orf38, CARM1, bta-mir3604-1, YIPF2, SMARCA4, TIMM29, TMED1, SPC24, KANK2, 5S rRNA, U6, LDLR, RAB3D, TMEM205, CCDC159, DOCK6, ANGPTL8, ELAVL3, ELOF1, PLPPR2, ACP5, EPOR, RGL3, ODAD3, PRKCSH, ZNF653, ECSIT, U4, INSR, ZNF557, ARHGFE18, CAMSAP3, PEX11G, RETN, XAB2, TEX45, MCEMP1, PET100, ZNF358, MCOLN1, PNPLA6, PCP2, STXBP2, TRAPPC5, FCER2, LRRC8B, CD209, MAP2K7, CLEC4G, EVI5L, CCL25, SNAPC2, TIMM44, bta-mir-2455, ELAVL1, FBN3, MARCHF2, CERS4, HNRNPM, ADAMTS10, bta-mir-339b, ANGPTL4, ACTL9, CD320, PRAM1, NDUFA7, ZNF414, RAB11B, OR2Z1, RPS28, MYO1F, SNORA70, ENSBTAG00000051140, ENSBTAG00000051490, ENSBTAG00000054591, ENSBTAG00000046336, ENSBTAG00000038680, ENSBTAG00000047612, ENSBTAG00000044018, ENSBTAG00000052882, ENSBTAG00000049668, ENSBTAG00000054873	21
7	26041927	27059884	1.12E-07	26547965	Intergenic	CCDC192, 5S rRNA, bta-mir-12007, CTXN3, PRRC1, MEGF10, U6, C7H5orf63, MARCHF3, ENSBTAG00000051246	12
7	23796173	25086968	1.73E-07	24296173	Intergenic	CHSY3, MINAR2, ADAMTS19, ISO C1, SLC27A6, ENSBTAG00000051108, ENSBTAG00000051190	4
8	77894983	78394983	9.77E-09	78394983	Intergenic	NTRK2	2
13	66829928	68799183	4.70E-10	67404014	Intron	VSTM2L, TTI1, RPRD1B, TGM2, U6, LAA1755, BPI, LBP, SNORA71, RALGAPB, ADIG, SLC32A1, ACTR5, PPP1R16B, FAM83D, DHX35, ENSBTAG00000051355, ENSBTAG00000047302, ENSBTAG00000050770, ENSBTAG00000052551, ENSBTAG00000044690	6
23	13569222	14569289	3.91091E-07	14069222	Intergenic	KIF6, DAAM2, MOCS1, U6, LRFN2, ENSBTAG00000048842	3

Table 3. Quantitative trait loci (QTL) surpassing the significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with the diffuse lesions. ¹QTL location, ²SNP location in the genome assembly, ³Positional candidate genes are defined as genes that are located within 50 kb on either side of the identified QTL.

A slight deviation in the upper right tails from the $y=x$ line suggested that some associations were present in the data. The regression coefficients (b-values) for all the SNPs associated with the presence of multifocal and diffuse lesions were all positive suggesting a positive correlation between exposure and outcome (data not shown). In

Phenotype	ID	Description	P adjust	Genes	Genes ratio
Multifocal	GO:0045095	Keratin filament	6.816E-13	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80	9/44
	GO:0005882	Intermediate filament	1.691E-10	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80	10/44
	GO:0045111	Intermediate filament cytoskeleton	4.644E-10	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80	10/44
	GO:0099512	Supramolecular fiber	4.389E-07	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80/ MYOM1/MYL12A/MYL12B	13/44
	GO:0099081	Supramolecular polymer	4.389E-07	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80/ MYOM1/MYL12A/MYL12B	13/44
	GO:0099513	Polymeric cytoskeletal fiber	1.689E-05	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80	10/44
	GO:0099080	Supramolecular complex	2.1E-05	KRT73/KRT72/KRT74/KRT5/KRT6B/KRT75/KRT83/KRT81/KRT7/KRT80/ MYOM1/MYL12A/MYL12B	13/44
Diffuse	bta04979	Cholesterol metabolism	0.016505	NCEH1/LDLR/ANGPTL8/ANGPTL4	4/49

Table 4. GO and pathway analysis using the candidate genes associated with the multifocal and diffuse lesions.

addition, the odds ratios (OR) calculated for all the SNPs associated with the presence of multifocal and diffuse lesions ($P < 5 \times 10^{-7}$) were > 1 indicating that the animals with the minor alleles had a higher risk of developing multifocal or diffuse lesions (Supplementary Table 3).

Gene ontologies and metabolic pathways. Functional categorization of the candidate genes for each phenotype (presence or absence of multifocal and diffuse lesions) was performed using the Bioconductor GOSep package. We identified 7 GO and 1 metabolic pathway significantly enriched in the animals with multifocal and diffuse lesions, respectively. As showed in Table 4, seven cellular components (CC) related to the intermediate filament cytoskeleton were significantly enriched in the multifocal lesions. Gene members of the *Keratin (KRT)* family such as the *KRT5*, *KRT7*, *KRT72*, *KRT73*, *KRT74*, *KRT75*, *KRT80*, *KRT81*, and *KRT83* were common to these seven CC. In the diffuse lesions, the cholesterol metabolism (bta04979) was enriched (P adjust = 0.016) with 4 candidate proteins matching this route including the *Angiopoietin like 4 and 8 (ANGPTL4 and ANGPTL8)*, *Low Density Lipoprotein Receptor (LDRL)*, and *Neutral Cholesterol Ester Hydrolase 1 (NCEH1)*. The *ANGPTL4* and *ANGPTL8* play a role in the regulation of triglyceride clearance from the serum and in lipid metabolism. The *LDRL* binds *LDL*, the major cholesterol-carrying lipoprotein of plasma, and transports it into cells, including macrophages, by endocytosis. The *NCEH1* is responsible for cholesterol ester hydrolysis in macrophages.

Antikeratin antibodies (AKA) and cholesterol plasma levels. To test whether a positive correlation between the levels of AKA in plasma and the presence of multifocal lesions existed, AKA levels were measured in plasma samples of cows with multifocal lesions and without visible lesions. No significant differences ($P = 0.2$) were found between the levels of AKA in cows with multifocal lesions (1.44 ng/ml) in comparison with cows with no visible lesions (2.10 ng/ml). As presented in Table 4, enrichment of candidate genes controlling the cholesterol metabolism (bta04979) was identified in cows with diffuse lesions. To test whether the enrichment of SNP variants in candidate genes caused dysregulation of the cholesterol metabolism, the levels of total cholesterol were measured in plasma samples from cattle with focal, multifocal or diffuse lesions or with no visible lesions. As seen in Fig. 2, there was a significant decrease in total cholesterol in plasma samples from cows with diffuse lesions (0.080 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) compared to those with focal (0.126 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; $P \leq 0.001$), or multifocal (0.141 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $P \leq 0.001$) lesions, or with no visible lesions (0.129 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $P \leq 0.001$).

Discussion

PTB is a multifactorial disease that arises as the result of the interaction of genetic, environmental, and microbial factors leading to the various PTB outcomes. Genetic factors are likely to play an important role in PTB pathogenesis. Cattle infected with MAP display various types of lesions with distinct severity but the associations between host genetic and PTB-associated pathology had not been explored before. Although previous GWAS identified loci associated with MAP tissue infection assessed by PCR and culture^{15,28–30}, our study provides the first comparison of the genetic variants associated with three distinct PTB-associated lesions (focal, multifocal and diffuse) in Spanish Holstein cattle ($N = 813$). Our study is unique in the definition of cases and controls through the histopathological analysis of PTB-associated lesions. Using WGS data, the h^2 estimates were calculated for the presence or absence of PTB-associated histopathological lesions in Spanish Holstein cattle ($N = 813$). When contrasting these two PTB outcomes, we couldn't identify any SNP surpassing the $FDR < 0.05$. However, the stratification of PTB-associated pathology in three categories allowed the identification of SNPs surpassing the $FDR < 0.05$ and increased the h^2 of the diffuse lesions ($h^2 = 0.189$) when compared with phenotypes such as the ELISA-tissue PCR-tissue culture ($h^2 = 0.139$) that typically detect animals with diffuse lesions¹⁵. The h^2 estimates calculated for the focal ($h^2 = 0.145$), multifocal ($h^2 = 0.075$), and diffuse ($h^2 = 0.189$) lesions indicated that the PTB-associated pathological outcomes have a genetic component that consists of a large number of genetic variants located across many chromosomes of the bovine genome. Previous studies indicated that susceptibility to MAP infection is heritable, with h^2 estimates of susceptibility to the infection ranging from < 0.01 ^{29,30} to 0.2843³¹. This is comparable with the moderate heritability ($h^2 = 0.12$) estimated for bTb infection even though the phenotype definitions and models used differed²². In a previous study, Wilkinson et al., genotyped 1966 Holstein–Friesian

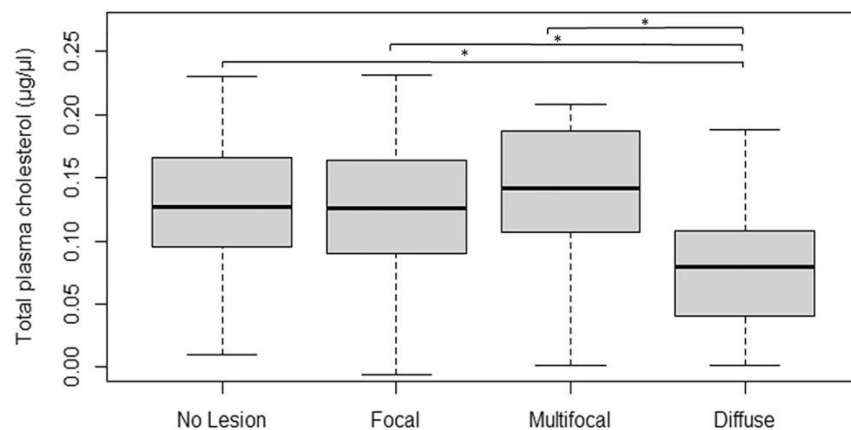


Figure 2. Comparison of plasma cholesterol of controls and cows with focal, multifocal or diffuse lesions. Samples were selected from the case-control population and grouped according to the presence or absence of visible lesions in gut tissues. Cows with diffuse lesions (N = 26) were associated with decreased cholesterol plasma levels when compared with no visible lesions (N = 474) or with focal (N = 350) and multifocal (N = 32) lesions. The lines extending from the boxes indicate variability outside the upper and lower quartiles. The highest and lowest points are the maximum and the minimum of the data set, respectively. *P* values were calculated using an unpaired t-test. **P* value < 0.001.

dairy cows following *Mycobacterium bovis* infection with three distinct phenotypes: single intradermal cervical comparative tuberculin (SICCT) test positives with visible lesions, SICCT-positives with undetected visible lesions, and SICCT-negative on multiple tests³². Regardless of the case phenotype, h^2 estimates did not exceed $h^2 = 0.08$. Although the h^2 of clinical mastitis in dairy cattle is also moderate (0.07–0.11)³³, the somatic cell score is included in selective breeding programs in many countries, including Spain.

The GWAS did not identify any SNP associated with the focal lesions. This could be attributed to the lack of discrimination between no visible and focal lesions. Using RNA-Seq technology we previously identified a biomarker of PTB progression, the precursor of the bovine intelectin 2 (ITLN2), which was overexpressed in ICV samples of animals with focal (\log_2 fold-change = 10.6) and diffuse (\log_2 fold-change = 6.8) lesions compared with animals without visible lesions³⁴. More recently, we have demonstrated that the quantification of bovine ITLN2 secreting cells by immunohistochemical analysis of ICV sections could constitute a good post-mortem tool, complementary to the histopathology, to improve the detection of focal lesions which may sometimes be difficult to detect³⁵. To test whether the focal lesions were controlled by specific genetic variants, a GWAS comparing animals with focal versus multifocal and focal versus diffuse lesions was performed (data not shown). A total of 28 and 590 SNPs were specifically associated with each comparison (FDR < 0.05), respectively. These results revealed significant differences in the genetic variants associated with the presence of focal lesions when compared with the multifocal or diffuse lesions. Further GWAS using diagnostic methods allowing a better discrimination of the animals with focal and no visible lesions are needed.

A total of 192 and 92 SNPs defining 13 and 9 distinct quantitative trait loci (QTLs) were highly-associated with the multifocal and diffuse lesions, respectively. All these SNPs had a positive b-value and OR > 1 and were, therefore, associated with each pathological outcome. No overlap was seen in the SNPs associated with each type of lesion which suggested that distinct genetic variants might control the multifocal and diffuse lesions and that these lesions might represent divergent disease outcomes. Further blinded studies are required to validate the associations between the identified SNPs and corresponding pathological outcomes in an independent population. Although the functional effects of the identified candidate genes were assigned through GO and KEGG pathways, further functional studies need to be performed on selective SNPs to determine if they are affecting the positional candidate genes or other genes through regulatory effects. Pathway analysis with candidate genes overlapping the lesions-associated QTLs revealed a significant enrichment of variants controlling the intermediate filament cytoskeleton and cholesterol metabolism in the animals with multifocal and diffuse lesions, respectively. Our findings provide for the first time a potential link between genetic variants in *KRT* genes (*KRT5*, *KRT7*, *KRT72*, *KRT73*, *KRT74*, *KRT75*, *KRT80*, *KRT81*, and *KRT83*) and PTB. Interestingly, abnormal *KRT* mutations have been associated with IBD³⁶. It was previously reported the sharing of mimicking B cell epitopes between *M. leprae* and the host *KRT7*³⁷. Similarly, we hypothesized that molecular mimicry between putative epitopes of *KRT* and MAP might be playing a role in the development of PTB-associated multifocal lesions. However, no correlation between high levels of AKA in plasma and cows with multifocal lesions was observed. In the other hand, *KRTs*, the major subgroup among the intermediate filament family of cytoskeletal proteins, are responsible for maintaining the stability and integrity of the gastrointestinal epithelium, for providing tissue resilience against many stimuli, and regulating various cellular functions such as cellular proliferation, migration, differentiation as well as inflammatory and immune responses³⁸. In a granulomatous experimental model using the

teleost fish *Piaractus mesopotamicus* infected with *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG), stronger immunostaining with anti-cytokeratin antibodies was observed at 33 days p. i. when the epithelioid cells were more evident and the granulomas were fully formed³⁹. In tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid leprosy, epithelioid non-caseinated granulomas encapsulated by many lymphocytes predominate and acid-fast bacilli are absent or only rarely present⁴⁰. The presence of epithelioid granulomas with multifocal distribution in TT leprosy leads to the control of *M. leprae* replication and the containment of its spread⁴¹. Further immunohistochemical studies with a bovine anti-cytokeratin antibody are needed to quantify the number of *KRT*-stained cells in PTB-associated lesions and to reveal the potential role of *KRT* in maintaining tissue resilience in animals with multifocal lesions.

While *KRT* variants were associated with cows with multifocal lesions, genetic variants in candidate genes involved in the cholesterol metabolism were enriched in animals with diffuse lesions, thereby suggesting that cholesterol variants associated with disease progression. To test whether the enrichment of SNP variants in candidate genes (*NCEH1/LDLR/ANGPTL8/ANGPTL4*) involved in the cholesterol metabolism was associated with the diffuse lesions, the levels of total cholesterol were measured in plasma samples of cattle with focal, multifocal or diffuse lesions or with no visible lesions. Our results showed reduced levels of plasma cholesterol in cattle with diffuse lesions ($P \leq 0.001$). Similarly, inflammation has been associated with decreased total serum cholesterol levels in patients diagnosed with CD⁴² and IBD⁴³. This reduction might be due to impedance of absorption of cholesterol efficiently thought the thickened intestinal wall in individuals in advanced stages of the infection. Using RNA-Seq, we previously observed that the cholesterol route (bta04977) was dysregulated in the ileocecal valve (ICV) of cows with diffuse lesions versus the control group with four upregulated genes matching this route (*APOA1, APOC3, APOA4, APOB*)³⁴. In addition, the top upregulated gene in peripheral blood of animals with focal lesions versus control cows was the *ATP-Binding Cassette Subfamily A Member 13* (*ABCA13*), a gene that accelerates cholesterol internalization and accumulation in intracellular vesicles^{34,44,45}. In agreement with our data, recent evidence suggests that MAP-infected macrophages accumulate intracellular cholesterol droplets and depict a foam cell phenotype during infection providing an enriched environment for MAP survival^{46,47}. Altogether, these findings suggest increased cholesterol transport, internalization and hydrolysis in macrophages of PTB-infected animals with diffuse lesions, which may invoke a localized compensatory mechanism to increase cholesterol synthesis at the site of the infection. It is well known that one of the main clinical signs associated to clinical PTB is decreased milk production. Animals with diffuse lesions have lower milk production and milk fat content when compared with animals with other lesions and uninfected cows⁴⁸. If an animal shows decreasing plasma cholesterol levels that may be considered an indication that it is likely to have decreased milk production and progressing toward clinical disease.

Conclusions

While PTB-associated multifocal lesions lead to a localized disease, the diffuse lesions present a disseminated form with high bacterial loads. Our results suggested that the genetic variants associated with the presence of focal, multifocal and diffuse lesions were distinct. While keratin variants associated with the multifocal lesions, cholesterol variants associated with the diffuse, more severe lesions. It follows that there are at least two distinct disease outcomes, which might be indicative of different host responses. Rearrangements in the keratin filaments and cholesterol metabolism are predominantly gearing this disease outcome polarization.

Materials and methods

Ethics statement. Animals used in this study were not submitted to any in vivo experimentation before stunning for slaughter and, therefore, no specific ethics committee authorization was required. The cows were slaughtered in the Bilbao and Donostia municipal slaughterhouses (Basque Country, Spain) under the pertinent Basque (Basque Government Decree 454/1994), Spanish (Spanish Government Law 32/2007 and Royal decree 731/2007), and European (Council Regulation (EC) No 1099/2009) legislation on animal welfare.

Animals. The Spanish Holstein population included in this study consisted of 813 culled Holstein cattle from several herds located in eight regions: Basque Country (N=212, 26.08%), Catalonia (N=318, 39.11%), Navarre (N=170, 20.91%), Cantabria (N=59, 7.26%), Aragon (N=24, 2.95%), Castile and Leon (N=21, 2.58%), La Rioja (N=6, 0.74%) and Asturias (N=3, 0.37%). Only cows (18 months years or older, 5.5 years mean age) were included in the analyses as PTB has a long incubation period and older animals are, therefore, more likely to show clinical signs. The cows were slaughtered in two abattoirs located in the Basque Country from March 2007 to May 2010.

Histopathological examination. Post-mortem tissue sampling was performed as previously described⁴⁹. Briefly, samples from ileocecal lymph node, jejunal lymph node, ICV, jejunum, and terminal ileum were collected aseptically from each animal and placed in formalin within 24 h after arrival at the laboratory. The samples were preferentially taken from areas of the preselected tissues that showed gross lesions, thickened mucosa and enlarged lymphatic nodes, if present. The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 72 h, dehydrated through graded alcohols and xilol, embedded in paraffin, and cut into 4 µm sections. Sections were, mounted on treated microscope slides, stained with haematoxylin and eosin (HE) and with Ziehl–Neelsen (ZN) and examined for pathological lesions and for the presence of acid-fast bacteria, respectively. According to their location and extension, inflammatory cell type, and mycobacterial load, PTB-associated histopathological lesions were classified in focal, multifocal, and diffuse lesions as previously described¹³.

Genotyping and imputation to WGS. Peripheral blood samples were collected at the slaughter time and DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Mini Kit according to the manufacturer's instructions (Qia-

gen, Hilden, Germany). Genotyping and imputation to WGS was performed as previously described¹⁵. Briefly, purified genomic DNA was quantified spectrophotometrically and subsequently genotyped with the EuroG MD Bead Chip at the molecular genetic laboratory service of the Spanish Federation of Holstein Cattle (CONAFE) using the Infinium™ iScan software for allele assignment (Illumina, San Diego, CA). Individual genotypes were phased using Eagle 2.4⁵⁰ and imputed with minimac4⁵¹ to the Bovine HD Bead Chip using a reference panel of 1,278 *Bos taurus* from Run7.0 of the 1000 Bull Genomes project and 581,712 SNPs (ASR-UCD1.2). Imputation to WGS level was then undertaken using a reference population of 2333 *Bos taurus* from Run6.0 of the 1,000 Bull Genomes project⁵². In total, 33.77 million SNPs per animal were identified across the genome. All the SNPs had a call rate >0.80. PTB-associated SNPs with minimum allele frequency (MAF) <0.01 were removed. The number of SNPs kept in the analysis was 13,881,067.

Variance components and h^2 estimates. The variance components, standard errors (SE), and h^2 estimates explained by all the SNPs were calculated using the genome-wide complex trait analysis (GCTA) software 1.93.2, according to the following formula: $h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_e^2}$ where σ_G^2 is the additive genetic effect of the individuals and σ_e^2 is the residual variance⁵³. The variance components σ_G^2 and σ_e^2 in the equation were estimated by the genomic-relatedness-based restricted maximum-likelihood (GREML) approach implemented in GCTA1.93.2. The concept behind this method is to fit all the SNPs simultaneously as random effects in a mixed linear model to estimate the phenotypic variance explained by all the SNPs.

Genome-wide association study. Associations between the imputed genotypes and the presence or absence of focal, multifocal or diffuse lesions was analyzed in a case-control study using the *mlma* (mixed linear model) association analysis of the GCTA 1.93.2⁵³. Briefly, the model is $y = a + bx + g + e$, where y is the phenotype, a is the mean term, b is the additive effect (fixed effect) of the candidate SNP to be tested for association, x is the SNP genotype indicator variable coded as 0, 1 or 2, g is the polygenic effect (random effect) i.e. the accumulated effect of all SNPs (as captured by the GRM calculated using all SNPs), and e is the residual. Control cows did not have visible lesions in gut tissues and had a negative ELISA, tissue PCR and culture result at the time of slaughter. Age was included as a covariate in the analysis. After the GWAS, the SNPs with R^2 values higher than 70% were retained. To account for multiple testing, a 5% chromosome-wise false discovery rate (FDR) was used to determine the probability that the associations were not false positives. P values between $P = 5 \times 10^{-5}$ and $P = 5 \times 10^{-7}$ provided a moderate significance level (α), and P values $< 5 \times 10^{-7}$ were used to identify highly significant associations (Welcome Trust Case Control Consortium, 2007). The inflation factor (λ) and quantile-quantile plots were calculated to compare observed distributions of $-\log(P$ values) to the expected distribution under the no association model for each phenotype. λ value close to 1 suggests appropriate adjustment for potential substructure and $\lambda > 1.2$ suggests population stratification. The regression coefficients (b) calculated using GCTA 1.93.2 represent the estimated increase in the log odds of the outcome per unit increase in the value of the exposure. In other words, the exponential function of b (e^b) is the OR-associated with a one-unit increase in the exposure. In addition, the OR and their 95% confidence intervals (CI) for the SNPs associated with the presence or absence of each type of histopathological lesion ($P < 5 \times 10^{-7}$) were calculated using logistic regression analysis with the WGassociation function of SNPassoc 1.9.2 under five different genetic models (co-dominant, dominant, recessive, over-dominant, and log-additive)⁵⁴. For each SNP and genetic model, the function WGstats of SNPassoc 1.9.2. provides genotype frequencies, OR, and 95% CI with the major homozygous genotype deemed as the baseline.

SNPs, QTLs, and candidate genes identification. The location of the significant SNPs was determined with biomaRt 2.44.1 for R⁵⁵ using the ARS-UCD1.2 reference genome. The genomic distribution of the identified SNPs was determined using the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). QTLs associated with each type of histological lesion were defined based on SNPs on linkage disequilibrium patterns with SNPs that surpassed the suggestive significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) in a given chromosome. The beginning and end of each QTL were defined in a window of 500,000 base pairs upstream and downstream by the SNPs that were furthest upstream and downstream of the suggestive SNP. Overlapping QTL regions were merged and considered as a single QTL. The defined QTL regions were further investigated for the presence of candidate genes within 50,000 base pairs to each side of the defined QTL using Ensembl (<https://www.ensembl.org>). The identified QTLs and candidate genes were compared with the reported cattle QTLs and candidate genes for animal diseases including PTB, bovine tuberculosis, clinical mastitis and bovine respiratory disease (<http://www.animalgenome.org>).

Gene ontology and metabolic analysis. Candidate genes within significant QTLs were investigated for significant enrichments of GO categories and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways using the cluster Profiler Bioconductor package 3.10.1^{56,57}. Briefly, the ClusterProfiler package offers a gene classification method, namely *groupGO*, to classify genes based on their projection at a specific level of the GO corpus, and provides functions, *enrichGO* and *enrichKEGG*, to calculate enrichment test for GO terms and KEGG pathways based on hypergeometric distribution. To prevent high false discovery rate (FDR) in multiple testing, P adjust values were estimated. GO analysis provides categories of genes involved in different biological processes (BP), molecular functions (MF), and those integral for different cell compartments (CC).

Bovine anti-keratin antibody ELISA Kit. For the quantitative detection of AKA in plasma samples of animals without visible lesions ($N = 33$) and with multifocal lesions ($N = 31$), a double antigen sandwich ELISA kit was used following the manufacturer's instructions (MyBiosource, US). Briefly, plasma samples (100 μ l per well) were added into the ELISA plate pre-coated with a bovine AKA antigen and incubated at 37 °C for 90 min.

Samples were washed out twice with PBS and then bovine AKA antigen (100 μ l) was added. Plates were incubated at 37 °C for 60 min. ELISA plates were washed 3 times and an avidin-peroxidase conjugate (100 μ l) was added to each well. The plates were sealed and incubated at 37 °C for 30 min. The enzyme conjugate was washed out of the wells five times with PBS and a TBM substrate (100 μ l) was used for coloration. TBM reacts to form a blue product from the peroxidase activity, and finally turns to yellow after addition of 100 μ l per well of the stop solution (Color Reagent C). Plates were read at 450 nm in an ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan, US). The OD values of each sample and standard had the values of the blank subtracted. We averaged the duplicate OD readings for each standard and sample. A standard curve was generated by plotting the mean OD values of each standard on the vertical axis and the corresponding concentration on the horizontal axis. The AKA concentration levels in each sample were interpolated from the standard curve. Statistical analysis was performed using an unpaired t-test for comparison between two groups (*GraphPad Prism 8*, San Diego, California, US). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

Cholesterol quantitation. A Cholesterol Quantitation kit (Sigma-Aldrich, St. Lois, USA) was used to determine the concentration of total cholesterol present in plasma samples of cows with no visible lesions (N = 474), and with focal (N = 350), multifocal (N = 32), and diffuse (N = 26) lesions. Total cholesterol concentration was determined by a coupled enzyme assay, containing cholesterol esterase, which results in a colorimetric product proportional to the cholesterol present. Cholesterol esterase hydrolyzes cholesteryl esters to cholesterol. Each reaction requires 2 μ l of plasma which was brought to a final volume of 50 μ l with cholesterol buffer. An equal volume (50 μ l) of total cholesterol reaction master mix, containing cholesterol esterase, was added to each well and placed on a horizontal shaker for 5 min, after which the plate was incubated in the dark at 37 °C for 1 h. Following incubation, absorbance was measured at 570 nm using an ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan, US). Cholesterol concentration (μ g/ μ l) present in the plasma samples was calculated by comparison against a serial dilution of cholesterol standards provided with the kit. All samples and standards were run in duplicate. Statistical analysis was performed using an unpaired t-test for comparison between groups. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

Data availability

The sequence variants for 1800 animals from Run8 are public at the European Variation Archive under project number PRJEB42783. The SNPs highly-associated with MAP-associated pathology have been deposited in the animal genome database (<https://www.animalgenome.org/>). Individual genotype data used in this study is managed by a third party, the Spanish Friesian Cattle National Federation (CONAFE). Requests for genotype data can be made to CONAFE, Ctra. de Andalucía, km. 23,600–28340 Valdemoro, Madrid, Spain; email: conafe@conafe.com; phone: +34 (91) 8952412; Fax: 918 951 471; website: www.conafe.com. CONAFE is a member of EuroGenomics Cooperative U.A.

Received: 29 June 2021; Accepted: 27 September 2021

Published online: 11 October 2021

References

- Nielsen, S. S. & Toft, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* **88**, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.07.003> (2009).
- Ott, S. L., Wells, S. J. & Wagner, B. A. Herd-level economic losses associated with John's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* **40**, 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(99\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(99)00037-9) (1999).
- Hasonova, L. & Pavlik, I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review. *Vet. Med. (Praha)* **51**, 193–211. <https://doi.org/10.17221/5539-VETMED> (2006).
- Sweeney, R. W. Pathogenesis of paratuberculosis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **27**, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001> (2011).
- Bastida, F. & Juste, R. A. Paratuberculosis control: A review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines* **9**, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-8518-9-8> (2011).
- Feller, M. et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 607–613. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70211-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70211-6) (2007).
- Niegowska, M. et al. Type 1 Diabetes at-risk children highly recognize *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* epitopes homologous to human Znt8 and Proinsulin. *Sci. Rep.* **6**, 2–11. <https://doi.org/10.1038/srep22266> (2016).
- Yokoyama, K. et al. Anti-mycobacterial antibodies in paired cerebrospinal fluid and serum samples from Japanese patients with multiple sclerosis or neuromyelitis optica spectrum disorder. *J. Clin. Med.* **7**, 522. <https://doi.org/10.3390/jcm7120522> (2018).
- Bo, M. et al. 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.* **36**, 0376–0381 (2018).
- Cossu, D. et al. Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in sardinian patients. *PLoS ONE* **6**, 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018482> (2011).
- Jeyanathan, M. et al. Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion microscopy. *Microbes Infect.* **9**, 1567–1573. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.09.001> (2007).
- Pierce, E. S. Could *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer?. *Infect. Agent. Cancer* **13**, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3> (2018).
- González, J. et al. Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* **133**, 184–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.04.007> (2005).
- Balseiro, A., Perez, V. & Juste, R. A. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection?. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.001> (2019).
- Canive, M. et al. Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests and imputed whole-genome sequence data. *PLoS ONE* **16**(8), e025609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256091> (2021).

16. McGovern, S. P. *et al.* Candidate genes associated with the heritable humoral response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cows have factors in common with gastrointestinal diseases in humans. *J. Dairy Sci.* **102**, 4249–4263. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15906> (2019).
17. Schulman, N. F. *et al.* Quantitative trait loci for health traits in Finnish Ayrshire cattle. *J. Dairy Sci.* **87**, 443–449. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73183-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73183-5) (2004).
18. Mapholi, N. O. *et al.* Genome-wide association study of tick resistance in South African Nguni cattle. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **7**, 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.005> (2016).
19. Kirkpatrick, B. W., Shi, X., Shook, G. E. & Collins, M. T. Whole-Genome association analysis of susceptibility to paratuberculosis in Holstein cattle. *Anim. Genet.* **42**, 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02097.x> (2011).
20. Leach, R. J., Craigmile, S. C., Knott, S. A., Williams, J. L. & Glass, E. J. Quantitative trait loci for variation in immune response to a Foot-and-Mouth Disease virus peptide. *BMC Genet.* **11**, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-107> (2010).
21. Gao, Y. *et al.* Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in Chinese Holstein. *BMC Genom.* **19**, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5385-3> (2018).
22. Ring, S. C. *et al.* Variance components for bovine tuberculosis infection and multi-breed genome-wide association analysis using imputed whole genome sequence data. *PLoS ONE* **14**, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212067> (2019).
23. Klungland, H. *et al.* Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle. *Mamm. Genome* **12**, 837–842. <https://doi.org/10.1007/s00335001-2081-3> (2001).
24. Fang, L. *et al.* MicroRNA-guided prioritization of genome-wide association signals reveals the importance of microRNA-target gene networks for complex traits in cattle. *Sci. Rep.* **8**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27729-y> (2018).
25. Richardson, I. W. *et al.* A genome-wide association study for genetic susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23. *Genet. Sel. Evol.* **48**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0197-x> (2016).
26. Juste, R. A. *et al.* Association between combinations of genetic polymorphisms and epidemiopathogenic forms of bovine paratuberculosis. *Heliyon* <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00535> (2018).
27. Kumar, S. *et al.* Association of genetic variability in CD209 gene with bovine paratuberculosis disease: A case-control study in the Indian cattle population. *Anim. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1823400> (2020).
28. Minozzi, G. *et al.* Genetic loci involved in antibody response to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cattle. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011117> (2010).
29. Kiser, J. N. *et al.* Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (Map) tissue infection in cattle. *J. Anim. Sci.* **95**, 1080–1091. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1152> (2017).
30. Koets, A. P. *et al.* Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **83**, 2702–2708. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75164-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75164-2) (2000).
31. Küpper, J., Brandt, H., Donat, K. & Erhardt, G. Phenotype definition is a main point in genome-wide association studies for bovine *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection status. *Animal* **8**, 1586–1593. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001232> (2014).
32. Wilkinson, S. *et al.* Fine-mapping host genetic variation underlying outcomes to *Mycobacterium bovis* infection in dairy cows. *BMC Genom.* **18**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3836-x> (2017).
33. Vallimont, J. E., Dechow, C. D., Sattler, C. G. & Clay, J. S. Heritability estimates associated with alternative definitions of mastitis and correlations with somatic cell score and yield. *J. Dairy Sci.* **92**, 3402–3410. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1229> (2009).
34. Alonso-Hearn, M. *et al.* RNA-Seq analysis of ileocecal valve and peripheral blood from Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* revealed dysregulation of the CXCL8/IL8 signaling pathway. *Sci. Rep.* **9**, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51328-0> (2019).
35. Blanco Vázquez, C. *et al.* Bovine intelectin 2 expression as a biomarker of paratuberculosis disease progression. *Animals* **11**, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani11051370> (2021).
36. Majumdar, D., Tiernan, J. P., Lobo, A. J., Evans, C. A. & Corfe, B. M. Keratins in colorectal epithelial function and disease. *Int. J. Exp. Pathol.* **93**, 305–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00830.x> (2012).
37. Singh, I. *et al.* Autoimmunity to tropomyosin-specific peptides induced by *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: Identification of mimicking proteins. *Front. Immunol.* **9**, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00642> (2018).
38. Zhang, X., Yin, M. & Zhang, L. J. Keratin 6, 16 and 17-critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis. *Cells* **8**, 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells8080807> (2019).
39. Manrique, W. G. *et al.* Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in piaractus mesopotamicus model. *PLoS ONE* **10**, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121625> (2015).
40. Massone, C., Belachew, W. A. & Schettini, A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin. Dermatol.* **33**, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.003> (2015).
41. Leal-Calvo, T. *et al.* Large-scale gene expression signatures reveal a microbicidal pattern of activation in mycobacterium leprae-infected monocyte-derived macrophages with low multiplicity of infection. *Front. Immunol.* **12**, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.647832> (2021).
42. Dyer, N. H. & Dawson, A. M. The significance of serum cholesterol measurements in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **6**, 253–256. <https://doi.org/10.3109/00365527109180703> (1971).
43. Agouridis, A. P., Elisaf, M. & Milionis, H. J. An overview of lipid abnormalities in patients with inflammatory bowel disease. *Ann. Gastroenterol.* **24**, 181–187 (2011).
44. Nakato, M. *et al.* ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* **296**, 100166. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015997> (2021).
45. Blanco Vázquez, C. *et al.* Detection of latent forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis diagnostic sensitivity. *PLoS ONE* **15**, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236336> (2020).
46. Johansen, M. D., de Silva, K., Plain, K. M., Whittington, R. J. & Purdie, A. C. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* is able to manipulate host lipid metabolism and accumulate cholesterol within macrophages. *Microb. Pathog.* **130**, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.031> (2019).
47. Ariel, O. *et al.* Transcriptome profiling of bovine macrophages infected by *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* depicts foam cell and innate immune tolerance phenotypes. *Front. Immunol.* **10**, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02874> (2020).
48. Smith, R. L. *et al.* The effects of progressing and non progressing *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection on milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **99**, 1383–1390. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9822> (2016).
49. Vázquez, P. *et al.* Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian cattle. *Vet. Med. Int.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064568> (2014).
50. Loh, P. R., Palamara, P. F. & Price, A. L. Fast and accurate long-range phasing in a UK Biobank cohort. *Nat. Genet.* **48**, 811–816. <https://doi.org/10.1038/ng.3571> (2016).
51. Das, S. *et al.* Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat. Genet.* **48**, 1284–1287. <https://doi.org/10.1038/ng.3656> (2016).
52. Hayes, B. J. & Daetwyler, H. D. 1000 Bull Genomes Project to map simple and complex genetic traits in cattle: Applications and outcomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **7**, 89–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115024> (2019).

53. Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E. & Visscher, P. M. GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011> (2011).
54. González, J. R. *et al.* SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **23**, 644–645. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm025> (2007).
55. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E. & Huber, W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.* **4**, 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97> (2009).
56. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27> (2000).
57. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118> (2012).

Acknowledgements

Financial support for this study was provided by a Grant from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities (RTI2018-094192-R-C21) and by European Regional Development Funds (FEDER) to MAH. MC and GBB have been awarded fellowships from the National Institute for Agricultural Research (INIA) and the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities programs, respectively. This work has been possible thanks to the support of the computing infrastructure of the i2BASQUE Research and Academic Network. We gratefully acknowledge the Bull Genomes Consortium for providing accessibility to the WGS data that was used in this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

M.C. measured A.K.A. and cholesterol plasma levels, generated and analyzed the datasets, and wrote the manuscript. P.V., J.M.G., and R.A.J. participated in sample collection and phenotypic characterization of the animals. O.G.R. and A.F. supervised the imputation to whole-genome sequences and genome-wide complex trait analysis. G.B.B. performed the functional analysis and prepared the figures. M.A.H. conceived and coordinated the project, supervised the data analysis, and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99672-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.-H.

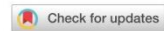
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



OPEN **Author Correction: Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using whole-genome sequence data**

Published online: 16 November 2021

Maria Canive, Gerard Badia-Bringué, Patricia Vázquez, Oscar González-Recio, Almudena Fernández, Joseba M. Garrido, Ramón A. Juste & Marta Alonso-Hearn

Correction to: *Scientific Reports* <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99672-4>, published online 11 October 2021

The Preprint section in the original version of this Article was omitted. The Preprint section now reads:

“This article was submitted to an online preprint archive⁵⁸.”

As a result Reference 58 was omitted, which is listed below.

58. Canive, M., *et al.* Host Genetics Underlying Pathological Outcomes to *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis* Infection is Governed by Distinct Genetic Variants. Preprint at <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-668666/v1> (2021).

The original Article has been corrected.

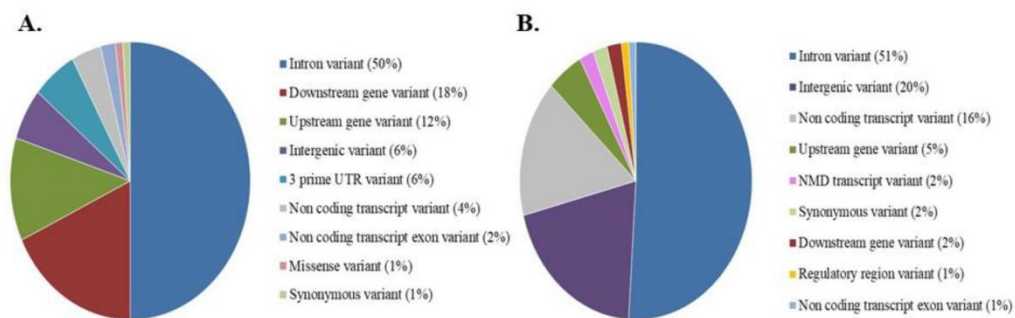


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using whole-genome sequence data

Supplementary Fig 1. Genomic distribution of the SNPs surpassing the threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with PTB-associated pathology. The chart depicts the genomic distribution of the SNPs associated with (A) multifocal and (B) diffuse lesions according to the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP).



Supplementary Table 1. Overlapping of the multifocal lesions-associated QTLs identified in the current study with QTLs associated with other traits.

QTL	Bovine respiratory disease susceptibility	Somatic cell score	Tick resistance	Length of productive life	PTB susceptibility	Bovine Tuberculosis susceptibility	Clinical mastitis	IgG level
3:24233907-25325344								
5:24941743-26254968	QTL:160063	QTL:40818	QTL:9915					
5:38788039-39790008		QTL:175693, QTL:2659	QTL:9915					
5:23274617-24292059	QTL:160062	QTL:175680, QTL:10108	QTL:9915					
5:27260957-28354826		QTL:175681, QTL:2659	QTL:9915	QTL:123360	QTL:14844			
11:12914642-14422761		QTL:45161, QTL:1693				QTL:96711	QTL:4953	QTL:66186
11:5223771-6618872		QTL:1693	QTL:101151, QTL: 101166		QTL:169911, QTL: 169912, QTL:169913		QTL:5450	
11:9416584-10698629		QTL:1693		QTL:45103, QTL:45119			QTL:4953	QTL:66186
22:5865513-6865513								
22:2638700-4937859		QTL:178147, QTL:178282, QTL:178371, QTL:178467		QTL:51530				
22:1280377-2574848		QTL:178147, QTL:178282, QTL:178371, QTL:178467						
23:17326599-18326599								QTL:66220, QTL:66222, QTL:66217, QTL:66218, QTL:20493, QTL:66221, QTL:66215, QTL:66214, QTL:66219
24:37183179-38191028		QTL:122075						QTL:66223, QTL:66224, QTL:66225

Supplementary Table 2. Overlapping of the diffuse lesions-associated QTLs identified in the current study with QTLs associated with other traits.

QTLs	Bovine respiratory disease susceptibility	Clinical mastitis	Bovine tuberculosis susceptibility	Length of productive life	Somatic cell score	Tick resistance	Ig G level	PTB susceptibility
1:97006475-98111140 1:93955885-94925704	QTL:160000				QTL:122054, QTL:122078			
3:63439078-64439078 7:15613384-17275615 7:26041927-27059884	QTL:160105, QTL:160106	QTL:2489	QTL:167791 QTL:178961	QTL:42783	QTL:42787, QTL:3537 QTL:4683	QTL:9916 QTL:9916	QTL:20475	
7:23796173-25086968 8:77894983-78394983 13:66829928-68799183 23:13569222-14569289	QTL:57631		QTL:96552	QTL:42879 QTL:31656 QTL:106422, QTL:52010, QTL:52021, QTL:52025, QTL:52029, QTL:52031, QTL:52033, QTL:52035, QTL:52041, QTL:52050, QTL:52058,	QTL:52051, QTL:52059, QTL:52042	QTL:9916	QTL:66220, QTL:66222, QTL:66217, QTL:66218, QTL:66221, QTL:66216, QTL:66215, QTL:66214, QTL:66219	QTL:166688

Supplementary Table 3. Frequency of cases and controls and odds ratios calculated under the codominant genetic model for the top 5 SNPs associated with PTB-associated lesions ($P < 5 \times 10^{-7}$).

Phenotype	BTA	SNP position	Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (95% CI)
Multifocal	22	3,138,700	C/C	28 (84.8)	371 (99.5)	1.0
			T/C	5 (15.2)	2 (0.5)	33.48 (6.18-181.4)
	22	3,138,706	T/T	28 (84.8)	371 (99.5)	1.0
			G/T	5 (15.2)	2 (0.5)	33.48 (6.18-181.4)
	22	3,138,710	C/C	28 (84.8)	371 (99.5)	1.0
			T/C	5 (15.2)	2 (0.5)	33.48 (6.18-181.4)
	22	3,138,717	C/C	28 (84.8)	371 (99.5)	1.0
			T/C	5 (15.2)	2 (0.5)	33.48 (6.18-181.4)
	22	3,138,734	C/C	28 (84.8)	371 (99.5)	1.0
			T/C	5 (15.2)	2 (0.5)	33.48 (6.18-181.4)
Diffuse	13	67,404,014	A/A	18 (50.0)	323 (86.6)	1.0
			C/A	15 (41.7)	49 (13.1)	5.99 (2.79-12.89)
			C/C	3 (8.3)	1 (0.3)	50.08 (4.88-513.51)
	13	67,329,928	T/T	19 (52.8)	328 (87.9)	1.0
			C/T	14 (38.9)	44 (11.8)	5.73 (2.64-12.41)
			C/C	3 (8.3)	1 (0.3)	47.75 (4.67-487.77)
	13	67,403,427	T/T	19 (52.8)	324 (86.9)	1.0
			G/T	14 (38.9)	48 (12.9)	5.26 (2.44-11.35)
			G/G	3 (8.3)	1 (0.3)	47.30 (4.63-483.30)
	8	78,394,983	C/C	31 (86.1)	371 (99.5)	1.0
T/C			5 (13.9)	2 (0.5)	34.29 (6.03-195.1)	
8	78,394,984	T/T	31 (86.1)	371 (99.5)	1.0	
		G/T	5 (13.9)	2 (0.5)	34.29 (6.03-195.1)	

95 % CI- 95 % confidence interval

ESTUDIO V

A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair, innate immunity, and pathogen persistence.

Canive M, Badia-Bringué G, Vázquez P, Garrido JM, Juste RA, Fernandez A, González-Recio O, Alonso-Hearn M.

Frontiers in Immunology, (aceptado)

Índice de impacto: 7,561

Área: Inmunología

Cuartil: Q1



A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair, innate immunity, and pathogen persistence

María C. Ruiz¹, Gerard Badia-Bringué¹, PATRICIA VAZQUEZ¹, Joseba M. Garrido¹, Ramon A. Juste¹, Almudena Fernandez², Oscar Gonzalez-Recio², MARTA ALONSO-HEARN^{1*}

¹NEIKER-Animal Health Department, Basque Institute for Agricultural Research and Development-Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Spain, ²Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Immunology

Specialty Section:
Comparative Immunology

Article type:
Original Research Article

Manuscript ID:
820965

Received on:
15 Dec 2021

Revised on:
09 Feb 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

M.C. generated the WGS datasets, performed the GWAS, and wrote the manuscript. P.V., J.G., and R.A.J. participated in samples collection and phenotypic characterization of the animals. G.B.B. performed the functional analysis, estimation of breeding values and cross-validation, and helped with the figures. O.G.R. and A.F. supervised the imputation to WGS, the GWAS, and the cross-validation of the genomic predictions. M.A.H. conceived and coordinated the project, supervised the data analysis, and wrote the manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

Keywords

disease tolerance, Paratuberculosis, DNA Packaging, DNA damage repair, innate immunity, tissue damage control, Pathogen persistence

Abstract

Word count: 347

Although the genetic susceptibility to diseases has been extensively studied, the genetic loci and the primary molecular and cellular mechanisms that control disease tolerance are still largely unknown. Bovine paratuberculosis (PTB) is an enteritis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB affects cattle worldwide and represents a major issue on animal health. In this study, the associations between host genetic and PTB tolerance were investigated using the genotypes from 277 Spanish Holstein cows with two distinct phenotypes: cases) infected animals with positive PCR and bacteriological culture results but without lesions in gut tissues (N= 24), and controls) animals with negative PCR and culture results but with PTB-associated lesions (N= 253). DNA from peripheral blood of the study population was genotyped with the Bovine EuroG MD Bead Chip, and the corresponding genotypes were imputed to whole-genome sequencing (WGS) data. A genome-wide association study was performed using the WGS data and the defined phenotypes in a case-control approach. A total of 142 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were associated (false discovery rate ≤ 0.05 , P values between 1.5×10^{-7} and 5.9×10^{-7}) with tolerance (heritability= 0.55). The 40 SNPs with P-values $< 5 \times 10^{-7}$ defined 9 QTLs and 98 candidate genes located on BTA4, BTA9, BTA16, BTA25, and BTA26. Some of the QTLs identified in this study overlap with QTLs previously associated with PTB, bovine tuberculosis, mastitis, somatic cell score, bovine diarrhea virus persistent infection, tick resistance, and length of productive life. Two candidate genes with important roles in DNA damage response (ERCC4 and RMI2) were identified on BTA25. Functional analysis using the 98 candidate genes revealed a significant enrichment of the DNA packaging process (TNP2/PRM1/PRM2/PRM3). In addition, the TNF-signaling (bta04668; TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK) and the toxoplasmosis (bta05145; TGF β 2/CHUK/CIITA/SOCS1) pathways were significantly enriched. Interestingly, the nuclear Factor NF- κ B Inhibitor Kinase Alpha (CHUK), a key molecule in the regulation of the NF- κ B pathway, was enriched in both pathways. Taken together, our results define a distinct immunogenetic profile in the PTB-tolerant animals designed to control bacterial growth, modulate inflammation, limit tissue damage and increase repair, thus reducing the severity of the disease.

Contribution to the field

Although we previously identified a total of 380 SNPs associated (FDR ≤ 0.05 ; P $< 5 \times 10^{-7}$) with PTB susceptibility in Spanish Holstein cattle (N=983) (Canive et al., 2021a and b), no conclusions could be drawn regarding host resistance. Mycobacteria have developed several strategies to evade the resistance mechanisms of the host and persist for long periods. In this context, tolerance mechanisms that control inflammation and tissue damage determine disease outcomes. In livestock, the identification of genetic variants that control tolerance induction could help breed more tolerant cattle to diseases. However, the genetic loci influencing tolerance induction and the primary molecular and cellular mechanisms that control disease tolerance are still largely unknown. In this study, we identified SNPs, QTLs, candidate genes, and several mechanisms associated with disease tolerance using cattle naturally infected with MAP that had both bacterial load and controlled pathology in gut tissues. Taken together, our results define a distinct immunogenetic profile in the PTB-tolerant animals designed to control bacterial growth, modulate inflammation, and limit tissue damage, thus reducing the severity of the disease.

Funding statement

Financial support for this study was provided by a grant (RTI2018-094192-R-C21) funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by FEDER, "Una manera de hacer Europa". MC and GBB have been awarded fellowships from MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and "FSE Invierte en tu futuro"; grants FPI2016-00041 and PRE2019-090562, respectively

Ethics statements

Studies involving animal subjects

Generated Statement: Ethical review and approval was not required for the animal study because Animals used in this study were not submitted to any in vivo experimentation and, therefore, no specific ethics committee authorization was required.

Studies involving human subjects

Generated Statement: No human studies are presented in this manuscript.

Inclusion of identifiable human data

Generated Statement: No potentially identifiable human images or data is presented in this study.

Data availability statement

Generated Statement: The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/supplementary material.

In review

1 **A genome-wide association study for tolerance to paratuberculosis identifies**
2 **candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair, innate**
3 **immunity, and pathogen persistence**

4 **Maria Canive**¹, **Gerard Badia-Bringué**¹, **Patricia Vázquez**¹, **Joseba M. Garrido**¹, **Ramón A.**
5 **Juste**¹, **Almudena Fernandez**², **Oscar González-Recio**^{2,3}, **Marta Alonso-Hearn**^{1*}

6

7

8 1 Department of Animal Health, NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and
9 Development, Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Spain

10 2 Departamento de Mejora Genética Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
11 Agraria y Alimentaria, CSIC, Madrid, Spain

12 3 Departamento de Producción Agraria, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,
13 Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, Madrid,
14 Spain

15

16 *** Correspondence:**

17 Corresponding Author

18 E-mail: malonso@neiker.eus

19

20

21

22

23

24

25

26 Number of words: 6707

27 Number of figures and tables: 8

28

29

30 **Keywords:** disease tolerance, paratuberculosis, DNA packaging, DNA damage repair, innate
31 immunity, tissue damage control, pathogen persistence

Paratuberculosis tolerance

32 Abstract

33 Although the genetic susceptibility to diseases has been extensively studied, the genetic loci
34 and the primary molecular and cellular mechanisms that control disease tolerance are still largely
35 unknown. Bovine paratuberculosis (PTB) is an enteritis caused by *Mycobacterium avium* subsp.
36 *paratuberculosis* (MAP). PTB affects cattle worldwide and represents a major issue on animal
37 health. In this study, the associations between host genetic and PTB tolerance were investigated
38 using the genotypes from 277 Spanish Holstein cows with two distinct phenotypes: cases) infected
39 animals with positive PCR and bacteriological culture results but without lesions in gut tissues (N=
40 24), and controls) animals with negative PCR and culture results but with PTB-associated lesions
41 (N= 253). DNA from peripheral blood of the study population was genotyped with the Bovine
42 EuroG MD Bead Chip, and the corresponding genotypes were imputed to whole-genome
43 sequencing (WGS) data. A genome-wide association study was performed using the WGS data and
44 the defined phenotypes in a case-control approach. A total of 142 single nucleotide polymorphisms
45 (SNPs) were associated (false discovery rate ≤ 0.05 , P values between 1.5×10^{-7} and 5.7×10^{-7})
46 with tolerance (heritability= 0.55). The 40 SNPs with P -values $< 5 \times 10^{-7}$ defined 9 QTLs and 98
47 candidate genes located on BTA4, BTA9, BTA16, BTA25, and BTA26. Some of the QTLs
48 identified in this study overlap with QTLs previously associated with PTB, bovine tuberculosis,
49 mastitis, somatic cell score, bovine diarrhea virus persistent infection, tick resistance, and length of
50 productive life. Two candidate genes with important roles in DNA damage response (*ERCC4* and
51 *RMI2*) were identified on BTA25. Functional analysis using the 98 candidate genes revealed a
52 significant enrichment of the DNA packaging process (*TNP2/PRM1/PRM2/PRM3*). In addition,
53 the *TNF*-signaling (bta04668; *TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK*) and the toxoplasmosis (bta05145;
54 *TGF β 2/CHUK/CIITA/SOCS1*) pathways were significantly enriched. Interestingly, the *nuclear*
55 *Factor NF- κ B Inhibitor Kinase Alpha (CHUK)*, a key molecule in the regulation of the *NF- κ B*
56 pathway, was enriched in both pathways. Taken together, our results define a distinct
57 immunogenetic profile in the PTB-tolerant animals designed to control bacterial growth, modulate
58 inflammation, limit tissue damage and increase repair, thus reducing the severity of the disease.

59 1. Introduction

60 Paratuberculosis (PTB) or Johne's disease is a granulomatous enteritis of domestic and wild
61 ruminants caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). PTB is a major
62 problem for animal health and must be reported to the World Organization for Animal Health. In
63 Europe and North America, PTB is endemic in dairy cattle, with herd prevalence estimates higher
64 than 50 % (1). PTB causes substantial economic losses to the dairy industry mainly due to
65 decreased milk production, weight loss, and premature culling or death of the infected animals (2).
66 Animals are infected early in life through the fecal-oral route but clinical onset appears when
67 animals are 18 months or older. Current diagnostic tests, ELISA and fecal PCR, often fail to detect
68 MAP-infected animals early in the course of infection (3, 4). According to their extension, cellular
69 infiltrate, and amount of MAP, PTB-associated histological lesions have been classified into the
70 following categories: focal, multifocal, and diffuse (diffuse paucibacillary, diffuse intermediate, and
71 diffuse multibacillary) (5). High bacterial burden, clinical signs, and gross lesions are associated
72 with the presence of diffuse lesions. MAP has been associated with Crohn's disease (CD) in
73 humans and has been detected in samples of patients with CD, ulcerative colitis, and idiopathic
74 inflammatory bowel disease (IBD)-associated colorectal cancer (6-8). MAP is also a possible
75 trigger factor in some human autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis,
76 and type I diabetes (9-12). Currently, no efficacious vaccine exists that confer protection against
77 MAP. The current control measures include the removal of MAP-infected animals from the herd
78 and the enhancement of farm-biosecurity measures. Genetic selection to enhance the resistance of
79 dairy cattle to PTB and other diseases is extensively being explored (13, 14).

80 In previous studies, we identified a total of 380 single nucleotide polymorphisms (SNPs)
81 associated ($FDR \leq 0.05$, $P < 5 \times 10^{-7}$) with PTB susceptibility using serum ELISA for the detection
82 of humoral responses against MAP and post-mortem diagnostic definitions (tissue PCR, tissue
83 bacteriological culture, and histopathological analysis) in a common set of Spanish Holstein cattle
84 ($N= 983$) (15, 16). These studies showed that PTB susceptibility is under complex genetic control,
85 with heritability (h^2) estimates ranging from 0.139 for the combination of ELISA-PCR-culture
86 positive results to 0.189 for the risk of developing diffuse lesions. Using these phenotypes, we were,
87 however, unable to identify SNPs associated with PTB resistance. While test positive cows are very
88 likely infected, animals can test negative due to the lack of sensitivity of the diagnostic method or
89 lack of exposure to MAP. Host defense strategies against infectious diseases are comprised of both
90 host resistance and disease tolerance. Resistance is defined as “the ability of the host to prevent
91 invasion (i.e., absence of a target receptor) or to clear the pathogen at the early stage of infection by
92 mounting a protective immune response” (17). Disease tolerance is defined as “the mechanisms that
93 decrease host susceptibility to tissue damage, or other fitness costs caused by pathogens or by the
94 immune response” (18). Unlike resistance, disease tolerance does not necessarily imply direct
95 effects on the pathogen load. Initially, it was observed that plants with a distinct genetic profile
96 could tolerate an infection without affecting the pathogen load, which was termed “disease
97 tolerance” (19, 20). More recently, the crucial role of disease tolerance in invertebrates and
98 vertebrates against infectious diseases has been recognized (21, 22). The term disease tolerance is
99 not to be confused with immunological tolerance, which is defined as unresponsiveness to self-
100 antigens (18). Evidence of tolerance can potentially be observed in the host genome, with genetic
101 variants that confer disease tolerance displaying positive or advantageous selection (23). However,
102 the genetic loci influencing tolerance induction and the primary molecular and cellular mechanisms
103 underlying disease tolerance in asymptomatic individuals are still largely unknown.

104 *Mycobacterium tuberculosis* and MAP have coevolved with humans and animals infrequently
105 compromising host survival. Although this has been attributed to host resistance, our understanding
106 of the mechanisms associated with disease tolerance in the infected individuals who become
107 asymptomatic and disease-free is very limited. Since disease tolerance does not affect the pathogen
108 burden as resistance is expected to do, it does not provoke the pathogen to increase virulence. In
109 addition, pathogen prevalence induces a continuous selection in favor of beneficial genetic variants
110 for disease tolerance. While improving host resistance could lead to disease eradication, this is
111 unlikely if hosts are tolerant as they can harbor the pathogen without showing clinical symptoms
112 and lesions (24). For endemic diseases that result in a high number of asymptomatic animals, it
113 might be more beneficial to improve tolerance than resistance. Furthermore, whereas resistance
114 mechanisms are often pathogen-specific (e.g. mobilization of specific immune cells), tolerance
115 mechanisms that prevent or repair damage may offer protection for a wide range of pathogens.
116 Ultimately, tolerant mechanisms determine the overall health of the host and its longevity.
117 Mycobacteria have developed several strategies to evade the resistance mechanisms of the host and
118 persist for long periods. Clinical signs associated with Mycobacterial infections emerge as the host
119 homeostasis becomes compromised due to tissue damage. In this context, the induction and
120 modulation of tolerance pathways are critical to control inflammation and minimize pathology.

121 The response to MAP infection is complex and heritable leading to differences between
122 individuals which can be categorized as (i) susceptible host, individuals who progress to severe
123 forms of the disease, (ii) resistant host, individuals able to eliminate the bacteria by inducing
124 protective innate immune responses at the early stage of infection, (iii) tolerant host, if innate
125 immunity is unable to eliminate MAP, the host initiates tolerance mechanisms to contain MAP
126 infection and prevent tissue damage. In the current study, we searched for genetic loci associated
127 with tolerance to PTB by using WGS data from infected Spanish Holstein cows with MAP detected
128 by PCR and bacteriological culture but without lesions in gut tissues and regional lymph nodes

Paratuberculosis tolerance

129 (N=24). A PTB tolerant animal was PCR and culture-positive (infected) but displayed no lesions in
130 gut tissues (no disease). Using this case population, three case-control approaches were designed
131 including as control population: 1) cows with negative PCR and culture results and with PTB-
132 associated focal lesions (N= 253), 2) cows with PTB-associated focal lesions irrespective of their
133 PCR and culture result (N= 288), and 3) cows with negative ELISA-PCR and culture results and
134 without lesions in gut tissues (N= 373). Variance components, heritability (h^2) estimates, SNPs,
135 quantitative trait loci (QTL), and candidate genes were calculated for the three case-control
136 approaches. Subsequently, functional pathways were identified for the case-control study with the
137 highest h^2 estimate ($h^2= 0.55$). Estimated breeding values (EBVs) for this population were
138 calculated and cross-validated. Since there is evidence that some allelic variants may contribute to
139 tolerance to multiple diseases, the identified QTLs and candidate genes were compared with QTLs
140 and candidate genes for bovine diseases, and with human candidate genes for CD, IBD, colorectal
141 cancer, multiple sclerosis, type I diabetes mellitus, and rheumatoid arthritis.

142 2. Materials and Methods

143 **2.1 Ethics statement.** Animals used in this study were not submitted to any *in vivo* experimentation
144 and, therefore, no specific ethics committee authorization was required. The cows were slaughtered
145 in the Bilbao and Donostia municipal slaughterhouses (Basque Country, Spain) from March 2007 to
146 May 2010 under the pertinent Basque (Basque Government Decree 454/1994), Spanish (Spanish
147 Government Law 32/2007 and Royal decree 731/2007), and European (Council Regulation No
148 1099/2009) legislation on animal welfare.

149 **2.2 Animals.** The study population consisted of 685 culled Spanish Holstein cattle from several
150 herds located on seven regions: Basque Country (N= 286, 41.75%), Catalonia (N= 157, 22.92 %),
151 Navarre (N= 147, 21.46 %), Cantabria (N= 49, 7.15 %), Aragon (N= 22, 3.21 %), Castile and Leon
152 (N= 16, 2.34 %), La Rioja (N= 5, 0.73 %) and Asturias (N=3, 0.44%). All cows were 18 months
153 years or older (5.6 years mean age).

154 **2.3 Histopathological examination, tissue PCR and bacteriological culture, and ELISA.** Post-
155 mortem tissue sampling, PCR, bacteriological culture, and ELISA were previously performed (25).
156 For histopathology, we used standardized protocols. Briefly, samples from the ileocecal lymph
157 node, jejunal lymph node, ileocecal valve (ICV), jejunum, and terminal ileum were collected from
158 each animal and fixed in 10% neutral buffered formalin for 72 h, dehydrated, embedded in paraffin,
159 and cut into 4 μ m sections. Several sections were mounted on microscope slides, stained with
160 hematoxylin and eosin (HE) and with Ziehl-Neelsen (ZN), and examined. PTB-associated lesions
161 were classified in focal, multifocal, and diffuse lesions as previously described (5). A pool (2 gr) of
162 ICV-distal ileum and the jejunal caudal lymph nodes was decontaminated with 38 ml of hexadecyl
163 pyridinium chloride at a final concentration of 0.75% (Sigma, St. Louis, MO) and homogenized in a
164 stomacher blender. After 30 min of incubation at room temperature, 15 ml of the suspension was
165 transferred to a new tube and incubated overnight for decontamination and sedimentation.
166 Approximately, 200 μ l of the suspension was taken and inoculated in duplicate Herrold's egg yolk
167 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and Lowenstein-Jensen media (Difco, Detroit, MI,
168 USA), both supplemented with 2 mg/L of mycobactin J (Allied Monitor, Fayette, MO, USA). If one
169 or more MAP colonies were observed in any of the four medium slants the tissue culture was
170 considered positive. Bacterial load in tissues was classified as low (<10 CFU/g), medium (between
171 10 to 50 CFU/g), or heavy (>50 CFU/gr). A second aliquot from the same tissue homogenates was
172 used for DNA isolation and MAP IS900 amplification (Adiagene, Saint Brieu, France). PCR
173 amplifications were performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied
174 Biosystems, Foster City, CA, US). Samples with a threshold cycle (Ct) below 40.0 were considered
175 positive. Antibody production against MAP in serum samples was tested using a two-step ELISA
176 PTB antibody screening and verification kit (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA)

177 according to the manufacturer's instructions. The results were categorized as positive according to
178 the sample-to-positive control ratio defined by the manufacturer.

179 **2.4. Genotyping and imputation.** DNA was extracted from peripheral blood samples collected
180 from the study population at the time of slaughter and genotyped with the EuroG MD Bead Chip at
181 the molecular genetic laboratory service of the Spanish Federation of Holstein Cattle (CONAFE).
182 The InfiniumTM iScan software (Illumina, San Diego, CA) was used for allele assignation. The
183 individual genotypes were previously phased and imputed to WGS level as previously described
184 (15). Briefly, individual genotypes were phased using Eagle 2.4 (26) and imputed with minimac4
185 (27) to the Bovine HD Bead Chip using a reference panel of 1,278 *Bos taurus* from Run7.0 of the
186 1,000 Bull Genomes project and 581,712 SNPs (ASR-UCD1.2). Imputation to WGS level was then
187 undertaken using a reference population of 2,333 *Bos taurus* from Run6.0 of the 1,000 Bull
188 Genomes project (28). All the SNPs passed a call rate > 0.80. After filtering out SNPs with
189 minimum allele frequency (MAF) < 0.01, we obtained 13,881,067 SNPs.

190 **2.5. Case-control studies, variance components, standard errors (SE), and h² estimates.** A PTB
191 tolerant animal was defined as an animal naturally infected with MAP that can harbor the pathogen
192 without showing lesions in gut tissues. More specifically, animals with PCR and culture-positive
193 results but without PTB-associated lesions in gut tissues (N= 24). Using this case population, three
194 case-control approaches were designed including as control population: 1) cows with negative PCR
195 and culture results and with PTB-associated focal lesions (N= 253), 2) cows with PTB-associated
196 focal lesions irrespective of their PCR and culture result (N= 288), and 3) cows with negative
197 ELISA-PCR and culture results and without lesions in gut tissues (N= 373). The variance
198 components, standard errors (SE), and h² estimates explained by all the SNPs of each case-control
199 population were calculated using the genome-wide complex trait analysis (*GCTA*) software 1.93.2,
200 according to the following formula:

201

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_e^2}$$

202 where σ_G^2 is the variance explained by all the SNPs and σ_e^2 is the residual variance (29).

203 **2.6. Genome-wide association study (GWAS).** In the current study, imputed genotypes (15) and
204 the results of the diagnostic tests (25) were analyzed using the mixed linear model association
205 analysis of the *GCTA* 1.93.2 software (29). Briefly, the model is $y = a + bx + g + e$, where y is the
206 phenotype, a is the mean term, b is the additive effect (fixed effect) of the candidate SNP to be
207 tested for association, x is the SNP genotype indicator variable coded as 0, 1 or 2, g is the polygenic
208 effect (random effect) assumed to be distributed as $N\sim(0, \sigma_G^2)$, and e is the residual assumed to be
209 distributed as $N\sim(0, \sigma_e^2)$. Age was included as a covariate in the analysis. After the GWAS, the
210 SNPs with R² values higher than 70 % were retained. To account for multiple testing, a 5 %
211 genome-wide false discovery rate (FDR) was used. As strong evidence for association, a level of
212 significance ($P < 5 \times 10^{-7}$) appropriate for genome-wide analysis was established according to the
213 Welcome Trust Case Control Consortium (30). The inflation factor (λ) and quantile-quantile plots
214 were calculated to compare the observed distributions of $-\log(P\text{-values})$ to the expected
215 distribution under the no association model. The regression coefficients (b) calculated using the
216 *GCTA* 1.93.2 software represents "the estimated increase in the log odds of the outcome per unit
217 increase in the value of the exposure. In other words, the exponential function of b (e^b) is the odds
218 ratio (OR) associated with a one-unit increase in exposure" (31). In addition, the OR and their 95 %
219 confidence intervals (CI) for the SNPs associated with PTB tolerance ($P < 5 \times 10^{-7}$) were calculated
220 using logistic regression analysis with the *WGassociation* function of *SNPassoc* 1.9.2 (32).

Paratuberculosis tolerance

221 **2.7. SNPs, QTLs, and candidate genes identification.** Localization of SNPs and QTLs and
 222 identification of candidate genes was performed using the ARS-UCD1.2 reference genome as
 223 previously described (15, 16). The genomic localization of the identified SNPs was determined
 224 using the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). QTLs were defined based on SNPs on linkage
 225 disequilibrium (LD) patterns with SNPs that surpassed the threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) in a given
 226 chromosome. Pairwise LD (r^2 values) among all SNPs within 500,000 base pairs upstream and
 227 downstream of the suggestive SNP were calculated using PLINK 1.9. The beginning and end of
 228 each QTL were defined by the SNPs that were furthest upstream and downstream of the suggestive
 229 SNP and that had an $r^2 \geq 0.9$ (33, 34). Overlapping QTL regions were merged and considered as a
 230 single QTL. The defined QTL regions were further investigated for the presence of candidate genes
 231 within 50,000 base pairs to each side of the defined QTL using Ensembl
 232 (<https://www.ensembl.org>). The identified QTLs and candidate genes were compared with reported
 233 QTLs for bovine diseases (<http://www.animalgenome.org>) and with human candidate genes
 234 previously identified for CD, IBD, colorectal cancer, multiple sclerosis, type I diabetes mellitus, and
 235 rheumatoid arthritis (<https://www.ebi.ac.uk/gwas>). To further investigate the function of the
 236 identified candidate genes, we uploaded the 98 genes into the Innate DB database for innate
 237 immunity genes (<https://innatedb.com>).

238 **2.8 Gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis.** Candidate genes were investigated
 239 for significant enrichment of GO categories and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
 240 (KEGG) pathways using the *cluster Profiler Bioconductor* package 3.10.1 (27). To prevent a high
 241 FDR in multiple testing, P -adjusted values were estimated.

242 **2.9. Estimated breeding values (EBVs) and cross-validation of the genomic predictions.** The
 243 *GBLUP* (best linear unbiased prediction) model (35) of *GCTA 1.93.2* was used to estimate the
 244 breeding value of each individual of the study population attributed to the aggregative effect of the
 245 SNPs with evidence of association with the phenotype; $P < 5 \times 10^{-5}$ and $P < 5 \times 10^{-7}$, respectively.
 246 The accuracy of the genomic predictions was cross-validated in a validation population containing
 247 animals with a tissue culture positive result and without lesions in gut tissues (cases, $N=10$) and
 248 animals with PTB-associated lesions in gut tissues (controls, $N=190$). Cross-validation was
 249 performed using a 5-fold strategy. Briefly, phenotypes were masked (i.e., set to missing) for all the
 250 animals in a random 20% of the validation population and both phenotypes and genotypes for all
 251 other animals (i.e. training data set) were used to predict EBVs of individuals from the omitted
 252 group (i.e. testing dataset). This cross-validation process was iterated five times, such that each
 253 animal's phenotype was masked at least once to generate its EBV. The ability of the group to
 254 determine whether or not each masked animal has a PTB tolerant phenotype was measured by the
 255 area under the receiver operating curve (AUC) for each model in each simulation using the *ROCR*
 256 package in R (36). The ROC curve is a graphical plot of the sensitivity, or true vs. false positive rate
 257 (1-specificity). The AUC would be 0.5 if its discrimination changes based on random chance,
 258 whereas if the model is perfectly able to determine the phenotype of each animal, the area under the
 259 curve would be 1.0 (37).

260

261 3. Results

262 **3.1 Data, variance components, and h^2 estimates.** The Spanish Holstein cows included in our
 263 study were previously tested by tissue PCR and bacteriological culture, ELISA, and
 264 histopathological analysis of gut tissues (25). Genotypes from the study population were previously
 265 obtained and imputed to WGS (15). In the current study, the associations between genotypes and
 266 PTB tolerance were investigated by using the genotypes from infected cows with a positive PCR
 267 and culture result and without lesions in gut tissues and regional lymph nodes ($N=24$). All these
 268 animals had a low bacterial load in gut tissues (< 10 CFU/g) and a negative ELISA result. Using
 269 this case population, three case-control approaches were designed including as control population 1)

270 cows with negative PCR and culture results and with PTB-associated focal lesions (N= 253), 2)
271 cows with PTB-associated focal lesions irrespective of their PCR and culture result (N= 288), and
272 3) cows with negative ELISA-PCR and culture results and without lesions in gut tissues (N= 373).
273 Table 1 summarizes the number of cases and controls, variance components, and h^2 estimates, for
274 each of the three case-control approaches. The h^2 estimates were 0.55, 0.44 and 0.18 for case-
275 control studies 1, 2, and 3, respectively (Table 1). The small differences in h^2 estimates (0.55 and
276 0.44) between the case-control studies 1 and 2 suggested that there would be little bias due to the
277 use of either sample as the control group. The highest h^2 estimate ($h^2= 0.55$) was obtained when
278 cows with negative PCR and culture results and with PTB-associated focal lesions (N= 253) were
279 the control population, highlighting the importance of the selection of control individuals from the
280 lower extremity of the relevant trait distribution to increase sensitivity. The b -values ranged from
281 0.57 to 0.94 for the first case-control study and the range was 0.27-0.59 for the second case-control
282 study providing more evidence that the most powerful approach was the first case-control study.

283 **3.2 GWAS.** GWAS using the imputed WGS datasets (15) and the phenotypes defined in the three
284 case-control approaches were performed. The number of SNPs that surpassed the $P < 5 \times 10^{-7}$
285 threshold is presented in Table 1. Three SNPs on BTA25 (11.89-12.93 Mb) overlapped with the
286 three case-control approaches suggesting an important link of this BTA25 region with the PTB
287 tolerant animals. Twenty-eight SNPs were found associated with the case-control studies 1 and 2,
288 and four with the case-control studies 1 and 3.

289 A total of 40 ($P < 5 \times 10^{-7}$) SNPs were associated with PTB tolerance defined using the case-control
290 approach with the highest heritability ($h^2= 0.55$). In this approach, animals were considered cases
291 when they were PCR and culture positives but they did not show lesions in gut tissues (N= 24).
292 Controls were PCR and culture negatives with focal PTB-associated lesions in gut tissues (N= 253).
293 A Manhattan plot showing $-\log_{10}$ (P -values) of association between every single SNP and PTB
294 tolerance is presented in Figure 1A. The 40 SNPs associated with tolerance ($FDR \leq 0.05$, $P < 5 \times$
295 10^{-7}) were located on the *Bos taurus* chromosomes BTA4, BTA9, BTA16, BTA25, and BTA26.
296 Most of these SNPs (59 %) were located in intronic regions (Figure 1B). A quantile-quantile plot
297 was generated (Figure 1C). The plot showed a distribution close to the expected line ($\lambda_{\text{median}}= 1.03$),
298 indicating that significant values were not overestimated due to population stratification or cryptic
299 relatedness. The regression coefficients (b -values) for the 40 SNPs associated with PTB tolerance
300 ($P < 5 \times 10^{-7}$) were all positive (data not shown). In addition, the OR and 95 % confidence intervals
301 (CI) calculated for the 40 SNPs were > 1 indicating that the animals with minor alleles had a higher
302 probability of being tolerant (Table 2). The two SNPs with the highest OR (25.89 and 20.71) were
303 located on BTA4 and BTA9. Interestingly, three of the 12 SNPs with OR= 15.86 and located on
304 BTA25 (11.89-12.93 Mb) were common to the three case-control approaches.

305 **3.3 SNP variants, QTLs, and candidate genes identification.** The SNPs surpassing the
306 significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$), P -values, and candidate genes located within the defined
307 QTLs are presented in Table 3 for case-control 1, and in Supplementary tables 1 and 2 for the case-
308 control studies 2 and 3. Five of the nine QTLs identified in the case-control study 1 and located on
309 BTA4, BTA9, BTA25 (8.90-9.99 Mb and 11.89-12.93 Mb), and BTA26 were found associated with
310 the case-control study 2 as well. Case-control studies 1 and 3 shared two QTLs on BTA16 (71.51-
311 72.51 Mb) and BTA25 (11.89-12.93 Mb). According to the Wellcome Trust Consortium “a study
312 design using hypercontrols (that is, selection of control individuals from the lower extremity of the
313 relevant trait distribution) would generally be the most powerful approach in a study focusing on
314 one disease” (30). Therefore, we focused on the results of the case-control study 1 with the highest
315 h^2 estimate (0.55) and b -values (0.57-0.90). No differences in age between the cases (74.73 ± 38.13
316 months) and controls (68.29 ± 25.79 months) ($P= 0.2659$) included in the case-control study 1 were
317 observed.

Paratuberculosis tolerance

318 The 40 SNPs associated with PTB tolerance resided within 9 QTLs on 5 chromosomes including
 319 BTA4, BTA9, BTA16, BTA25, and BTA26 (Table 3). Twenty-five SNPs (62.5 %) were located on
 320 BTA25 (8.90-12.93 Mb) highlighting the important association of this region with the phenotype.
 321 The BTA25 and BTA26 harbored 4 of the 9 identified QTLs. The QTL that harbored the most
 322 genome-wide significantly-associated SNP ($P= 1.58E-07$) was located on BTA16 (21.30-22.30
 323 Mb). By examining the available cattle QTL database (Table 4), we observed that this QTL together
 324 with a QTL located in BTA26 (33.90-34.90 Mb) overlap with two QTLs previously reported in the
 325 literature that were associated with PTB susceptibility; QTL:14860 and QTL:14880, respectively
 326 (38). The largest QTL was located on BTA25 (8.90-9.99 Mb) and contained 13 highly-associated
 327 SNPs and 16 candidate genes. This QTL overlap with QTLs associated with clinical mastitis
 328 (QTL:1751) (39) and somatic cell score (QTL:4993, QTL:52494) (40, 41). A second QTL
 329 identified on BTA25 (11.89-12.93 Mb) overlap with QTLs associated with bovine tuberculosis
 330 susceptibility (QTL:96564) (42), clinical mastitis (QTL:1751) (39), and somatic cell score
 331 (QTL:177968, QTL:32484, QTL:32485, QTL:4993, QTL:52521) (41, 43, 44). The two QTLs
 332 identified in the current study on BTA16 and one of the QTLs identified on BTA26 (20.05-21.05
 333 Mb) overlap with QTLs associated with length of productive life highlighting the association of this
 334 trait with PTB and health (41). Interestingly, a QTL identified in our study on BTA26 (33.90-34.90
 335 Mb) overlaps with a QTL associated with bovine diarrhea virus persistent infection (QTL:66096)
 336 (45).

337 The candidate genes associated with MAP tolerance that were identified in the current study had not
 338 been associated with bovine PTB, tuberculosis, or mastitis before. Table 3 presents a list of the 98
 339 candidate genes. We identified candidate genes in all the QTLs. Only one candidate gene, the
 340 *Excision Repair 4 (ERCC4)*, was identified on one of the QTLs located on BTA25 (11.89-12.93
 341 Mb). *ERCC4* is a DNA repair endonuclease (*XPF*). Together with *ERCC1*, *XPF* forms the *ERCC1-*
 342 *XPF* enzyme complex that participates in the nucleotide excision DNA repair (NER) pathway, a
 343 highly conserved mechanism that recognizes and removes helical distortions through the genome.

344 **3.4 Functional GO and metabolic pathways.** We identified 7 GOs and 2 metabolic pathways
 345 significantly enriched in the PTB tolerant animals. As seen in Table 5, two biological processes
 346 (BPs) related to DNA packaging and DNA conformation change were significantly enriched ($P \leq$
 347 0.05). Gene members of the *Transition protein 2 (TNP2)* and *Protamine (PRM)* family such as
 348 *PRM1*, *PRM2*, and *PRM3* were common to these seven GOs. *TNP2* plays a key role in the
 349 replacement of histones to *PRMs* during spermatogenesis and *PRMs* compact DNA into a highly
 350 condensed, stable, and inactive complex. We observed that five cellular compartments (CC)
 351 associated with DNA packaging such as nucleosome, chromatin, chromosome, DNA packaging
 352 complex, and protein-DNA complex were also enriched. Pathway analysis on the 98 candidate
 353 genes revealed a significant enrichment of the toxoplasmosis (bta05145;
 354 *TGF β 2/CHUK/CIITA/SOCS1*) and *TNF*-signaling (bta04668; *TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK*)
 355 pathways with four proteins matching each route. Interestingly, the *nuclear Factor NF-Kappa-B*
 356 *Inhibitor Kinase Alpha (CHUK or IkbKA)*, a key molecule in the *NF-kappa-B* signaling pathway,
 357 was enriched in both pathways ($P \leq 0.01$).

358 **3.5 Estimated breeding values (EBVs) and cross-validation of the genomic predictions.** The
 359 *GBLUP* (best linear unbiased prediction) model (35) was used to estimate breeding values of each
 360 individual in the study population attributed to the aggregative effect of the 142 and 40 SNPs with
 361 evidence of association with the phenotype; $P < 5 \times 10^{-5}$ and $P < 5 \times 10^{-7}$, respectively. The
 362 genomic predictions were cross-validated using a 5-fold strategy as described in Materials and
 363 Methods. The efficacy of the models was examined by ROC analysis, which provides a measure of
 364 the probability of the model's successful classification of samples (Figure 2). The AUC (\pm SD)
 365 of the models generated using the 142 (AUC= 0.657 \pm 0.017) and 40 (AUC= 0.676 \pm 0.014) SNPs
 366 were very similar which suggested that the model developed with the 40 most significant SNPs is a

367 good classifier. The cut-off point for the EBVs in the study population was obtained with the
368 Statistical Analysis in Epidemiology (Epi) R package (cut-off= 0.0356).

369

370 4. Discussion

371 Understanding tolerance pathways is a significant challenge due to the difficulty in determining the
372 tolerance phenotype from field data. The identification of genetic variants underlying variation in
373 tolerance to pathogens requires both, great genome coverage and measuring disease outcomes that
374 sometimes are not readily measured. In this study, we aim to elucidate cellular and molecular
375 mechanisms responsible for disease tolerance using cattle naturally infected with MAP that can
376 harbor the pathogen without showing lesions in gut tissues. Although a previous GWAS identified
377 loci associated with tolerance to Johne's disease (46), our GWAS is the first to complete an analysis
378 of the genetic markers associated with tolerance to PTB using WGS data and epidemiological data
379 based on three diagnostic tests. Results from the current study do not corroborate those of Zanella et
380 al. (46) who identified a tolerant region of 6.5 Kb on BTA15 which we did not identify here. This
381 might be due to differences in the phenotypes used. In the study by Zanella et al, tolerance
382 measured the relationship between infection intensity (level of MAP in the tissues) and fitness
383 (level of MAP fecal shedding), but to define tolerance is critical to measure disease outcomes, not
384 just infection burden. In our study, PTB tolerant cows had both MAP load and controlled pathology
385 in gut tissues. Histopathological analysis usually detects more infected animals than bacteriological
386 culture and PCR (5). However, in the study by Gonzalez et al, 3/116 (2.5 %) of the animals were
387 PCR and culture positives but without lesions in gut tissues. Similarly, in our study population
388 (N=983)(15), 24 animals without lesions in gut tissues were PCR and culture positives (2.4 %).
389 Despite the small sample size of cases (N=24), the Manhattan plot showed loci with associations
390 with the underlying SNPs. When control individuals from the lower extremity of the relevant trait
391 distribution were used in the case-control approach 1, the h^2 estimate for PTB tolerance was high
392 ($h^2 = 0.55$) indicating a substantial genetic contribution for the cases group. A total of 40 novel
393 SNPs ($FDR \leq 0.05$ and $P < 5 \times 10^{-7}$) defining 9 QTLs and 98 candidate genes were associated with
394 the tolerant cattle. All these SNPs had a positive b-value and $OR > 1$ and were, therefore, associated
395 with PTB tolerance. EBVs were estimated for the study population using the SNPs with a
396 significant association with the phenotype ($FDR \leq 0.05$) and the genetic predictions were
397 subsequently cross-validated in a different population.

398 The 98 candidate genes identified in our study were compared with candidate genes previously
399 reported in CD, IBD, colorectal cancer, multiple sclerosis, type I diabetes mellitus, and rheumatoid
400 arthritis. Seven genes including *Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1 (GOT1)*, *NK2 Homeobox 3*
401 *transcription factor (NKX2-3)*, *Solute Carrier Family 25 Member 8 (SLC25A28)*, *Fibroblast Growth*
402 *Factor Receptor 1 Oncogene Partner (CPE43)*, *Chemokine Receptor-Like 3 (CCR6)*, *C-Type Lectin*
403 *Domain Containing 16A (CLEC16A)*, and *RecQ Mediated Genome Instability 2 (RMI2)*, were
404 previously associated to rheumatoid arthritis. The last two genes, *CLEC16A* and *RMI2*, were also
405 associated with CD, IBD, multiple sclerosis, and type I diabetes mellitus. *CLEC16A* is a regulator
406 of mitophagy/autophagy and mitochondrial health and *RMI2* plays a critical role in homologous
407 recombination-dependent DNA repair (47). *NKX2-3* and *SLC25A28* were associated with CD, IBD,
408 colorectal cancer, type I diabetes mellitus, and rheumatoid arthritis. Five of the 98 candidate genes
409 have relevant innate immunity functions including *CCR6*, the *nuclear Factor NF-Kappa-B Inhibitor*
410 *Kinase Alpha (CHUK or IkbKA)*, *STAT-Induced STAT Inhibitor 1 or suppressor of cytokine*
411 *Signaling 1 (SOCS1)*, *TNF Receptor Associated Factor 5 (TRAF5)*, and *caspase 7 (CASP7)*, a
412 caspase involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis

Paratuberculosis tolerance

413 Although poorly understood, the mechanisms underlying disease tolerance appear to involve
414 conserved stress and damage responses (48). When these responses fail, the default response
415 becomes programmed cell death of infected cells which is coupled to their immediate phagocytosis
416 by macrophages and subsequent polarization. This macrophage polarization is also associated with
417 the production of cytokines such as *transforming growth factor β 1* (*TGF β 1*) which can promote
418 tissue regeneration. Consistent with these results, our pathway analysis with the 98 identified
419 candidate genes revealed a significant enrichment of the DNA packaging
420 (*TNP2/PRM1/PRM2/PRM3*), *TNF*-signaling pathway (*TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK*), and
421 toxoplasmosis (*TGF β 2/CHUK/CIITA/SOCS1*) in the tolerant animals (Figure 3). Upstream of the
422 *TNP2*, *PRM1*, *PRM2*, and *PRM3* genes located on BTA25, we identified the *RMI2* gene which is
423 critical for DNA damage repair and genome stability (47). Moreover, we identified 12 genetic
424 variants on BTA25 (11.89-12.93 Mb) upstream of the *Excision Repair 4* (*ERCC4*) gene. *ERCC4*
425 forms the *ERCC1-XPF* enzyme complex that participates in the nucleotide excision DNA repair
426 (NER) pathway. Altogether, these findings provide evidence for a link between PTB tolerance and
427 genetic variants in candidate genes involved in DNA packaging, DNA damage repair response,
428 innate immune responses, and pathogen persistence.

429 In most eukaryotic cells, nucleosomes are the basic structural units of chromatin formed by a
430 histone octamer core. A unique chromatin remodeling process occurs extensively during
431 spermatogenesis, which leads to more than 90% of core histones being replaced by transition
432 proteins, and then *PRMs* (49, 50). The number of histones that are replaced by *PRMs* and the
433 proportion of *PRM1/PRM2* are essential to keep chromatin structure. So if this proportion changes,
434 the DNA is poorly packed and susceptible to damage (51). The specialized structure of the sperm
435 chromatin-*PRM* has a dual function; first, to protect the DNA from damage during transport to the
436 oocyte, and then to enable a rapid and complete unpacking of the undamaged paternal genome in
437 the ooplasm (52). In the ooplasm, maternal factors rapidly access the paternal chromatin and begin
438 the replacement of *PRM* with maternal histones (53). Any damage to the sperm DNA during the
439 transition from the testicle to the oocyte cannot be repaired until the DNA is accessible for DNA
440 repair systems in the ooplasm (52). On the other hand, oocytes are especially sensitive to DNA
441 damage when they resume meiosis during the menstrual cycle. These DNA lesions, if not repaired
442 correctly, can endanger the fitness and viability of the cell. Since DNA damage is one of the most
443 important factors that can compromise the viability of the cell and/or organism and contribute to
444 diseases, it is well recognized that individuals with enhanced DNA packaging and DNA damage
445 responses have improved homeostasis and prolonged healthy lifespan (54).

446 Schneider et al., reported that mutants in the fly *TNF*-related molecule “Eiger” when challenged
447 with a bacterial species, lived longer with similar pathogen titers (55). Similarly, we found a
448 significant enrichment of genes involved in the *TNF*-signaling pathway
449 (*TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK*) in the PTB tolerant animals which can be associated with high
450 levels of expression for these genes. This pathway can trigger programmed cell death while also
451 activating pro-survival responses via activation of *NF-kappa- β* . *TRAF5*, *CASP7*, and *CHUK* or
452 *I κ BKA*, have well-recognized roles in the innate immune responses. *CHUK* is a serine kinase that
453 plays an essential role in the canonical *NF-kappa- β* signaling pathway. *CHUK* acts as part of the
454 canonical *IKK* complex phosphorylating inhibitors of the *NF-kappa- β* on serine residues. In turn,
455 free *NF-kappa- β* is translocated into the nucleus and activates the transcription of genes involved in
456 immune response, growth control, or protection against apoptosis. *CASP7* is responsible for
457 apoptosis, which is regarded as an important mechanism through which the host can restrict
458 pathogen replication in infected cells and maximize disease tolerance. *TRAF5* is a member of the
459 *TNF* receptor-associated factor (*TRAF*) family that mediates *TNF*-induced activation. *TNF*-signaling
460 activates *NF-kappa- β* and *JNK* pathways.

461 Although *TNF* constitutes a critical host defense against Mycobacteria, its excess is also implicated
462 in immunopathogenesis and activation of programmed necrosis pathway via induction of
463 mitochondrial reactive oxygen species (ROS) that kills both bacteria and infected macrophages
464 (56). Therefore, the innate immune response, while important to clear the pathogen, can also cause
465 tissue damage. In addition to the *TNF* pathway, we detected enrichment of candidate genes involved
466 in the toxoplasmosis (*TGFβ2/CHUK/CIITA/SOCS1*) pathway in the tolerant animals which can be
467 associated with high expression of these genes. Interestingly, *CHUK* was one of the candidate genes
468 in the toxoplasmosis pathway which highlights the role of *CHUK* as an important modulator of the
469 inflammatory response. As part of the non-canonical pathway of *NF-kappa-β* activation, *CHUK*
470 participates also in the negative feedback of *NF-kappa-β* signaling pathway preventing *TNF*-
471 mediated *RIPK1*-dependent cell death. While the canonical *NF-kappa-β* activation is associated
472 with rapid and acute production of diverse pro-inflammatory mediators, the non-canonical *NF*-
473 *kappa-β* signaling pathway is tightly regulated and associated with less acute, chronic inflammation,
474 and with maintaining homeostasis. Consequently, the role of *CHUK* in controlling inflammation by
475 activating or limiting the activation of *NF-kappa-β* may be timing and/or environmental dependent.
476 Overall, the activation of the toxoplasmosis pathway in the tolerant animals might result in a
477 lifelong and persistent MAP infection as seen in *Toxoplasma gondii* infected hosts. *Toxoplasma*
478 *gondii* and other intracellular parasites which typically establish themselves as long-term residents
479 in mammalian hosts are often associated with elevated *TGFβ* expression (57). Direct activation of
480 the *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)* by the parasite enhances the anti-
481 inflammatory function of *TGFβ* causing lifelong infection by establishing an anti-apoptotic
482 environment. In addition, the role of *TGFβ2* in tissue healing and repair is well established
483 promoting disease tolerance at later time points (58). We also found two novel candidate genes
484 associated with PTB tolerance, the *Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator*
485 (*CIITA*) and the *suppressor of cytokine signaling (SOCS1)*. Both genes are located on BTA25
486 upstream of the *RMI2/TNP2/PRIM1/PRM2/PRM3* region and adjacent to the *CLEC16A* gene, a
487 regulator of phagosome-lysosome fusion during late mitophagy. *CIITA* is a positive regulator of
488 class II major histocompatibility complex gene transcription and is the "master control factor" for
489 the expression of these genes. *SOCS1* is a member of the *STAT*-induced *STAT* inhibitor (SSI)
490 family, with important roles in immune cell homeostasis and regulation of inflammation which is
491 crucial to avoid an excessive inflammatory response and to minimize collateral tissue damage.

492 5. Conclusions

493 In this study, we explored the concept of disease tolerance in the context of a chronic intestinal
494 infection. We were able to show that there is genetic variation associated with PTB tolerance. We
495 revealed the genetic basis for PTB tolerance and the molecular pathways involved. Pathway
496 analysis using the identified candidate genes revealed mechanisms underlying DNA packaging,
497 innate immunity, and establishment of persistent infection that support tolerance to PTB. Strategies
498 designed to improve diseases tolerance are expected to improve diseases control and to reduce the
499 dependence on antimicrobials to kill pathogens, which in turn would reduce antimicrobial
500 resistance. In livestock, the identification of genetic variants that regulate disease tolerance could
501 help breed for more tolerant cattle to a variety of diseases and likely to other environmental
502 stressors.

503 6. Acknowledgments

504 This work has been possible thanks to the support of the computing infrastructure of the
505 i2BASQUE Research and Academic Network. We gratefully acknowledge the Bull Genomes
506 Consortium for providing accessibility to the 1000 Bull genomes database.

507 7. Contribution to the field statement

Paratuberculosis tolerance

508 Although we previously identified a total of 380 SNPs associated ($FDR \leq 0.05$; $P < 5 \cdot 10^{-7}$) with
509 PTB susceptibility in Spanish Holstein cattle ($N=983$) (Canive et al., 2021a and b), no conclusions
510 could be drawn regarding host resistance. Mycobacteria have developed several strategies to evade
511 the resistance mechanisms of the host and persist for long periods. In this context, tolerance
512 mechanisms that control inflammation and tissue damage determine disease outcomes. In livestock,
513 the identification of genetic variants that control tolerance induction could help breed more tolerant
514 cattle to diseases. However, the genetic loci influencing tolerance induction and the primary
515 molecular and cellular mechanisms that control disease tolerance are still largely unknown. In this
516 study, we identified SNPs, QTLS, candidate genes, and several mechanisms associated with disease
517 tolerance using cattle naturally infected with MAP that had both bacterial load and controlled
518 pathology in gut tissues. Taken together, our results define a distinct immunogenetic profile in the
519 PTB-tolerant animals designed to control bacterial growth, modulate inflammation, and limit tissue
520 damage, thus reducing the severity of the disease.

521 8. Conflict of Interest

522 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
523 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

524 9. Author Contributions

525 M.C. performed the GWAS and wrote the manuscript. P.V., J.G., and R.A.J. participated in samples
526 collection and phenotypic characterization of the animals. G.B.B. performed the functional analysis,
527 estimation of breeding values and cross-validation, and helped with the figures. O.G.R. and A.F.
528 supervised the imputation to WGS, the GWAS, and the cross-validation of the genomic predictions.
529 M.A.H. conceived and coordinated the project, supervised the data analysis, and wrote the
530 manuscript. All authors revised and approved the final manuscript.

531 10. Funding

532 Financial support for this study was provided by a grant (RTI2018-094192-R-C21) funded by
533 MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by FEDER, “Una manera de hacer Europa”. MC and
534 GBB have been awarded fellowships from MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “FSE Invierte
535 en tu futuro”; grants FPI2016-00041 and PRE2019-090562, respectively.

536 11. References

- 537 1. Nielsen, S. S. & Toft, N. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in
538 Europe. (2009). *Prev. Vet. Med.* 88, 1–14.
- 539 2. Hasonova, L. & Pavlik, I. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: A review.
540 (2006). *Vet. Med. (Praha)*. 51, 193–211.
- 541 3. Blanco Vázquez, C. et al. Detection of latent forms of *Mycobacterium avium* subsp.
542 *paratuberculosis* infection using host biomarker-based ELISAs greatly improves paratuberculosis
543 diagnostic sensitivity. (2020). *PLoS One* 15, 1–21.
- 544 4. Blanco Vázquez, C. et al. Bovine intelectin 2 expression as a biomarker of paratuberculosis
545 disease progression. (2021). *Animals* 11, 1–13.
- 546 5. González, J. et al. Histopathological classification of lesions associated with natural
547 paratuberculosis infection in cattle. (2005). *J. Comp. Pathol.* 133, 184–196.

- 548 6. Feller, M. et al. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a
549 systematic review and meta-analysis. (2007). *Lancet Infect. Dis.* 7, 607–613.
- 550 7. Juste, R. A. et al. On the prevalence of *M. avium* subspecies *paratuberculosis* DNA in the blood
551 of healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. (2008). *PLoS One* 3, 3–8.
- 552 8. Jeyanathan, M. et al. Visualization of *Mycobacterium avium* in Crohn's tissue by oil-immersion
553 microscopy. (2007). *Microbes Infect.* 9, 1567–1573.
- 554 9. Bo, M. et al. Interferon regulatory factor 5 is a potential target of autoimmune response triggered
555 by Epstein-Barr virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in rheumatoid arthritis:
556 Investigating a mechanism of molecular mimicry. (2018). *Clin. Exp. Rheumatol.* 36, 0376–0381.
- 557 10. Yokoyama, K. et al. Anti-mycobacterial antibodies in paired cerebrospinal fluid and serum
558 samples from Japanese patients with multiple sclerosis or neuromyelitis optica spectrum disorder.
559 (2018). *J. Clin. Med.* 7, 522.
- 560 11. Mamei, G., Cocco, E., Frau, J., Marrosu, M. G. & Sechi, L. A. Epstein Barr virus and
561 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides are recognized in sera and cerebrospinal
562 fluid of MS patients. (2016). *Sci. Rep.* 6, 1–10.
- 563 12. Niegowska, M. et al. Type 1 Diabetes at-risk children highly recognize *Mycobacterium avium*
564 subspecies *paratuberculosis* epitopes homologous to human Znt8 and Proinsulin. (2016). *Sci. Rep.*
565 6, 2–11.
- 566 13. Mallikarjunappa, S., et al. Johne's Disease in Dairy Cattle: An Immunogenetic Perspective.
567 (2021). *Front. Vet. Sci.* 8:718987.
568
- 569 14. Kravitz, A., Pelzer, K., & Nammalwar, S. The Paratuberculosis Paradigm Examined: A Review
570 of Host Genetic Resistance and Innate Immune Fitness in *Mycobacterium avium* subsp.
571 *Paratuberculosis* Infection. (2021). *Front. Vet. Sci.* 8,721706.
572
- 573 15. Canive, M. et al. (a) Identification of loci associated with susceptibility to *Mycobacterium*
574 *avium* subsp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using combinations of diagnostic tests
575 and imputed whole-genome sequence data. (2021). *PLoS One* 16, 1–17.
- 576 16. Canive, M. et al. (b) Identification of loci associated with pathological outcomes in Holstein
577 cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using whole-genome sequence
578 data. (2021). *Sci. Rep.* 11, 1–13.
- 579 17. Divangahi, M. et al. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct
580 immunological processes. (2021). *Nat. Immunol.* 22, 2–6.
- 581 18. Medzhitov, R., Schneider, D. S. & Soares, M. P. Disease tolerance as a defense strategy. (2012).
582 *Science.* 335(6071), 936-941.
- 583 19. Caldwell, R. M., Schafer, J. F., Compton, L. E. & Patterson, F. L. Tolerance to cereal leaf Rusts.
584 (1958). *Science*, 128(3326), 714–715.
- 585 20. Schafer, J. F. Tolerance to plant disease. (1971). *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 235–252.

Paratuberculosis tolerance

- 586 21. Raberg, L., Sim, D., & Read, A. F. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance
587 to infectious diseases in animals. (2007). *Science*, 318(5851), 812–814.
- 588 22. Read, A. F., Graham, A. L. & Råberg, L. Animal defenses against infectious agents: Is damage
589 control more important than pathogen control? (2008). *PLoS Biol.* 6, 2638–2641.
- 590 23. Barreiro, L. B., & Quintana-Murci, L. From evolutionary genetics to human immunology: How
591 selection shapes host defence genes. (2010). *Nat. Rev. Genet.* 11, 17–30.
- 592 24. Doeschl-Wilson, A.B., & Kyriazakis I. Should we aim for genetic improvement in host
593 resistance or tolerance to infectious pathogens? (2012). *Front. Genet.* 14, 3, 272.
- 594 25. Vázquez, P. et al. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian
595 cattle. (2014). *Vet. Med. Int.* 2014, 321327.
- 596 26. Loh, P. R., Palamara, P. F. & Price, A. L. Fast and accurate long-range phasing in a UK
597 Biobank cohort. 816 (2016). *Nat. Genet.* 48, 811–816.
- 598 27. Das, S. et al. Next-generation genotype imputation service and methods. (2016). *Nat. Genet.* 48,
599 1284–1287.
- 600 28. Hayes, B. J. & Daetwyler, H. D. (2019). 1000 Bull genome project to map simple and complex
601 genetic traits in cattle: Applications and outcomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 89-102.
- 602 29. Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E. & Visscher, P. M. GCTA: A tool for genome-wide
603 complex trait analysis. (2011). *Am. J. Hum. Genet.* 88, 76–82.
- 604 30. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases
605 of seven common disease and 3,000 shared controls. (2007). *Nature* 447, 661-677.
- 606 31. Szumilas M. Explaining Odds Ratios. (2010). *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 19(3):
607 227–229.
- 608 32. González, J. R. et al. SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies.
609 (2007). *Bioinformatics* 23, 644–645.
- 610 33. Sargolzaei, M. et al. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America.
611 (2008). *J. Dairy Sci.* 91(5), 2106-2117.
- 612 34. Kim, E.-S., & Kirkpatrick B. W. Linkage disequilibrium in the North American Holstein
613 population. (2009). *Animal genetics* 40, 3, 279-288.
- 614 35. VanRaden, P. M. & Sullivan, P. G. International genomic evaluation methods for dairy cattle.
615 (2010). *Genet. Sel. Evol.* 42, 1–9.
- 616 36. Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N. & Lengauer, T. ROCr: Visualizing classifier
617 performance in R. (2005). *Bioinformatics* 21, 3940–3941.
- 618 37. Kirkwood, B. R. & Sterne, J. A. C. *Essential Medical Statistics*. (2010). 2nd edition (Blackwell
619 publishing.
- 620 38. Kirkpatrick, B. W., Shi, X., Shook, G. E. & Collins, M. T. Whole-Genome association analysis
621 of susceptibility to paratuberculosis in Holstein cattle. (2011). *Anim. Genet.* 42, 149–160.

- 622 39. Holmberg, M. & Andersson-Eklund, L. Quantitative trait loci affecting health traits in Swedish
623 dairy cattle. (2004). *J. Dairy Sci.* 87, 2653–2659.
- 624 40. Lund, M. S., Guldbrandtsen, B., Buitenhuis, A. J., Thomsen, B. & Bendixen, C. Detection of
625 quantitative trait loci in Danish Holstein cattle affecting clinical mastitis, somatic cell score, udder
626 conformation traits, and assessment of associated effects on milk yield. (2008). *J. Dairy Sci.* 91,
627 4028–4036.
- 628 41. Cole, J. B. et al. Genome-wide association analysis of thirty one production, health,
629 reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. (2011). *BMC*
630 *Genomics* 12, 1–17.
- 631 42. Richardson, I. W. et al. A genome-wide association study for genetic susceptibility to
632 *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle identifies a susceptibility QTL on chromosome 23.
633 (2016). *Genet. Sel. Evol.* 48, 1–13.
- 634 43. Strillacci, M. G. et al. Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red
635 Pied cattle breed using pooled DNA. (2014). *BMC Genet.* 15, 106.
- 636 44. Oliveira, H. R. et al. Genome-wide association for milk production traits and somatic cell score
637 in different lactation stages of Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. (2019). *J. Dairy Sci.* 102,
638 8159–8174.
- 639 45. Neiberghs, H. et al. Loci on *Bos taurus* chromosome 2 and *Bos taurus* chromosome 26 are linked
640 with bovine respiratory disease and associated with persistent infection of bovine viral diarrhea
641 virus. (2011). *J. Anim. Sci.* 89, 907–915.
- 642 46. Zanella, R., Whitlock, R. H. & Neiberghs, H. L. Short communication: Refinement of genetic
643 regions associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* tissue infection and
644 tolerance to Johne’s disease. (2011). *J. Dairy Sci.* 94, 4230–4236.
- 645 47. Xu, D. et al. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain
646 genome stability. (2008). *Genes Dev.* 22, 2843–2855.
- 647 48. Soares, M. P., Teixeira, L. & Moita L. F. Disease tolerance and immunity in host protection
648 against infection. (2017). *Nat. Rev. Immunol.* 17(2), 83-96.
- 649 49. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. (2007). *Genome Biol.* 8(9), 227.
- 650 50. Rousseaux, S. et al. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and
651 in the zygote. (2008). *Reprod. Biomed.* 16, 492–503.
- 652 51. Simon, L., Castillo, J., Oliva, R. & Lewis, S. E. M. Relationships between human sperm
653 protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. (2011). *Reprod. Biomed.* 23, 724–
654 734.
- 655 52. Björndahl, L. & Kvist, U. Structure of chromatin in spermatozoa. (2014). *Adv. Exp. Med. Biol.*
656 791, 1–11.
- 657 53. Miller, D., Brinkworth, M. & Iles, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the
658 sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. (2010). *Reproduction* 139, 287–301.

Paratuberculosis tolerance

- 659 54. Sheldon, I. M., Cronin, J. G. & Bromfield, J. J. Tolerance and innate immunity shape the
660 development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. (2019).
661 *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 7, 361–384.
- 662 55. Schneider, D. S. et al. *Drosophila eiger* mutants are sensitive to extracellular pathogens. (2007).
663 *PlosPathogens*. 3, (3), e41.
- 664 56. Roca, F. J. & Ramakrishnan, L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to
665 mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. (2013). *Cell* 153, 521–534.
- 666 57. Johnson, P. T. J. et al. Habitat heterogeneity drives the host-diversity-begets-parasite-diversity
667 relationship: evidence from experimental and field studies. (2016). *Ecol. Lett.* 19, 752–761.
- 668 58. Divangahi, M., Khan, N. & Kaufmann, E. Beyond killing *Mycobacterium tuberculosis*: disease
669 tolerance. (2018). *Front. Immunol.* 9, 2976.

12. Data Availability Statement

670
671 The SNPs associated with PTB tolerance have been deposited in the animal genome database
672 (<https://www.animalgenome.org/>). Individual genotype data used in this study is managed by a third
673 party, the Spanish Friesian Cattle National Federation (CONAFE). Requests for genotype data can
674 be made to CONAFE, Ctra. de Andalucía, km. 23,600 - 28340 Valdemoro, Madrid, Spain; email:
675 conafe@conafe.com; phone: +34 (91) 8952412; Fax: 918 951 471; website: www.conafe.com.
676 CONAFE is a member of EuroGenomics Coöperative U.A.

13. Figure legends.

677
678 **Figure 1. GWAS for PTB tolerance. A.** Manhattan plots showing $-\log_{10}(P\text{-values})$ of association
679 between every single SNP and phenotype. The associations between host genetic and tolerance
680 were investigated using the genotypes from 277 Spanish Holstein cows with two distinct
681 phenotypes: cases) positive PCR and culture result without lesions (N= 24), and controls) negative
682 PCR and culture result with PTB-associated lesions (N=253). Each dot represents the result from
683 the test association for a single SNP. The horizontal red line shows $-\log_{10}(5 \times 10^{-7})$ and the blue
684 line $-\log_{10}(5 \times 10^{-5})$. **B.** Genomic distribution of the SNPs associated ($P < 5 \times 10^{-7}$) with tolerance
685 according to the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). **C.** Quantile-quantile plot compared the
686 observed distribution of $-\log(P\text{-values})$ to the expected values under the null hypothesis.

687 **Figure 2. Receiver Operating Characteristics (ROC) curve for application of genomic**
688 **predictions from the study population to the validation population.** *GBLUP* models were
689 developed using the 142 (Fig. 2A) and 40 SNPs (Fig. 2B) with evidence of association with the
690 case-control population 1; $P < 5 \times 10^{-5}$ and $P < 5 \times 10^{-7}$, respectively. Genetic predictions were
691 cross-validated in the validation population using a five-fold strategy as described in Materials and
692 Methods. Each curve represents one of the five generated models and models might occasionally
693 overlap. The average AUC and standard deviation (SD) across the five cross-validations are
694 included in each figure.

695 **Figure 3. Schematic diagram illustrating the identified PTB-tolerance mechanisms.** Candidate
696 genes involved in DNA packaging, *TNF* signaling pathway, and toxoplasmosis were associated
697 with the PTB tolerant individuals. These mechanisms play important roles in disease tolerance.

Table 1. Number (N) of cases and controls, variance components, standard errors (SE), and h^2 estimates.

Study Code	Phenotype	Lesion, Tests results	N	SNPs FDR ≤ 0.05 $P < 5 \times 10^{-7}$	Additive genetic variance (σ^2_G)	Residual variance (σ^2_e)	Heritability (h^2)
1	Case	No lesion, PCR/Culture Positive	24	40	0.044427	0.036225	0.55
	Control	Focal lesion, PCR/Culture Negative	253				
2	Case	No lesion, PCR/Culture Positive	24	136	0.032145	0.039855	0.44
	Control	Focal lesion	288				
3	Case	No lesion, PCR/Culture Positive	24	126	0.010334	0.046331	0.18
	Control	No lesion, ELISA/PCR/Culture Negative	373				

According to the Wellcome Trust Case Control Consortium, the threshold was $P < 5 \times 10^{-7}$. FDR: false discovery rate

Table 2. Frequency of cases and controls and odds ratio (OR) under the additive genetic model for the 15-top SNPs associated with tolerance (FDR ≤ 0.05 , $P < 5 \times 10^{-7}$).

Chromosome	SNP position	SNP ID	Genotype	Cases (%)	Controls (%)	OR (95% CI)
4	805,731		C/C	20 (83.3)	251 (99.2)	1.0
			T/C	4 (16.7)	2 (0.8)	25.89 (4.4-152.5)
9	101,497,090	rs436366135	A/A	19 (79.2)	250 (98.8)	1.0
			G/A	5 (20.8)	3 (1.2)	20.71 (4.38-97.94)
25	12,394,597	rs109954622	G/G	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			A/G	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,396,223	rs381977996	C/C	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			T/C	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,411,628	rs379340537	C/C	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			T/C	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,413,134	rs379127550	C/C	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			A/C	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,415,339	rs109985656	G/G	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			A/G	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,415,928	rs382534620	G/G	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/G	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,427,653	rs42060371	T/T	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/T	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,428,267	rs42060369	T/T	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/T	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,428,660	rs42060368	T/T	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/T	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,429,377	rs42060367	T/T	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/T	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,429,409	rs42060366	A/A	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/A	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
25	12,430,197	rs109193429	T/T	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			C/T	6 (25.0)	5 (2.0)	15.86 (4.23-59.54)
16	72,010,469	rs210839825	G/G	18 (75.0)	248 (98.0)	1.0
			G/C	6 (25.0)	5 (2.0)	15.72 (4.25-58.24)

Table 3. QTLs surpassing the significance threshold ($P < 5 \times 10^{-7}$) for evidence of an association with tolerance.

BTA ¹	QTL start (bp)	QTL end (bp)	P-value most significant SNP	SNP position ²	SNP ID	Annotation	Genes in QTL ³	N° of significant SNPs in QTL
16	21307714	22307714	1,58E-07	21807714			<i>SPATA17, RRP15, TGFB2, U6</i>	1
9	100997090	101997090	1,60E-07	101497090	rs436366135	Intron	<i>TBXT, U6, SFT2D1, MPC1, RPS6KA2, RNASET2, CEP43, CCR6, GPR31, U4, TLL2, UNC93A, ENSBTAG0000051317, ENSBTAG0000050267, ENSBTAG0000054087, ENSBTAG0000053924</i>	1
4	66265303	67309158	2,55E-07	66765303	rs382143408	Intron	<i>PLEKH8, SCRNI, FKBP14, WIPF3, PRR15, CHN2, CPVL, TRIL, CREB5, ENSBTAG0000054573</i>	8
26	20050339	21059555	2,92E-07	20559555	rs381461650	Intergenic	<i>CNNMI, GOT1, U6, NKX2-3, SLC25A28, ENTPD7, COX15, CUTC, ABC2, DNMBP, CPNI, ERLINI, CHUK, ENSBTAG0000052639, ENSBTAG0000050951, ENSBTAG0000045082, ENSBTAG0000044887, ENSBTAG0000033021, ENSBTAG0000023939</i>	2
16	71510469	72510469	3,61E-07	72010469	rs210839825	Intron	<i>DIL, INTS7, LPGAT1, NEK2, SLC30A1, RD3, TRAF5, RCOR3, KCNH1, ENSBTAG0000048992, ENSBTAG0000048697, ENSBTAG0000050969, ENSBTAG0000053608</i>	1
26	33908564	34908564	3,69E-07	34408564	rs210720477	Intergenic	<i>HABP2, NRAP, CASP7, PLEKHS1, NHLRC2, DCLRE1A, ADRB1, CCDC186, TDRD1, VW42, AFAP1L2, bta-mir2285dg, ABLIMI, ENSBTAG0000051735, ENSBTAG0000053724</i>	1
25	11894597	12930197	3,81E-07	12394597	rs109954622	Intergenic	<i>ERCC4</i>	12
25	8908535	9991143	3,93E-07	9408535	rs380720091	Intron	<i>U6, ATF7IP6, EMP2, TEKTS, NUBP1, TVP23A, CHTA, DEXI, CLEC16A, SOCS1, RMI2, TNP2, PRM1, PRM2, PRM3, ENSBTAG0000052111</i>	13
4	80073101	81073101	4,02E-07	80573101	rs379792050	Intron	<i>SUGCT, MPLKIP, CDK13, ENSBTAG0000049322</i>	1

¹ QTL location, ² SNP location in the genome, ³ Candidate genes located within the identified QTL

Table 4. Overlapping of the identified QTLs with regions associated with other cattle diseases and relevant traits.

Identified QTLs	PTB susceptibility	Bovine tuberculosis susceptibility	Clinical Mastitis	Somatic cell score	Tick resistance	Length of productive life	Bovine diarrhoea virus infection
4:66265303-67309158					QTL:135872		
4:80073101-81073101		QTL:96207					
9:100997090-101997090							
16:21307714-22307714	QTL:14860			QTL:48185, QTL:48208,		QTL:48183, QTL:48205	
16:71510469-72510469				QTL:48470		QTL:48467	
25:8908535-9991143			QTL:1751	QTL:4993, QTL:52494			
25:11894597-12930197		QTL:96564	QTL:1751	QTL:177968, QTL:32484, QTL:32485, QTL:4993, QTL:52521			
26:20050339-21059555			QTL:161603			QTL:52778	
26:33908564-34908564	QTL:14880			QTL:32489			QTL:66096

Table 5. Results of the gene ontology and pathway analysis using the identified candidate genes.

Category	ID	Description	P adjust	Genes	Genes ratio
BP	GO:0006323	DNA packaging	0.0022	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
	GO:0071103	DNA conformation change	0.0220	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
CC	GO:0000786	Nucleosome	0.0001	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
	GO:0044815	DNA packaging complex	0.0001	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
	GO:0032993	Protein-DNA complex	0.0010	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
	GO:0000785	Chromatin	0.0079	<i>TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	4/20
	GO:0005694	Chromosome	0.0439	<i>INTS7/TNP2/PRM1/PRM2/PRM3</i>	5/20
Pathway	bta05145	Toxoplasmosis	0.0126	<i>TGFB2/CHUK/CIITA/SOCS1</i>	4/21
	bta04668	TNF signaling pathway	0.0126	<i>TRAF5/CREB5/CASP7/CHUK</i>	4/21

FIG 1.

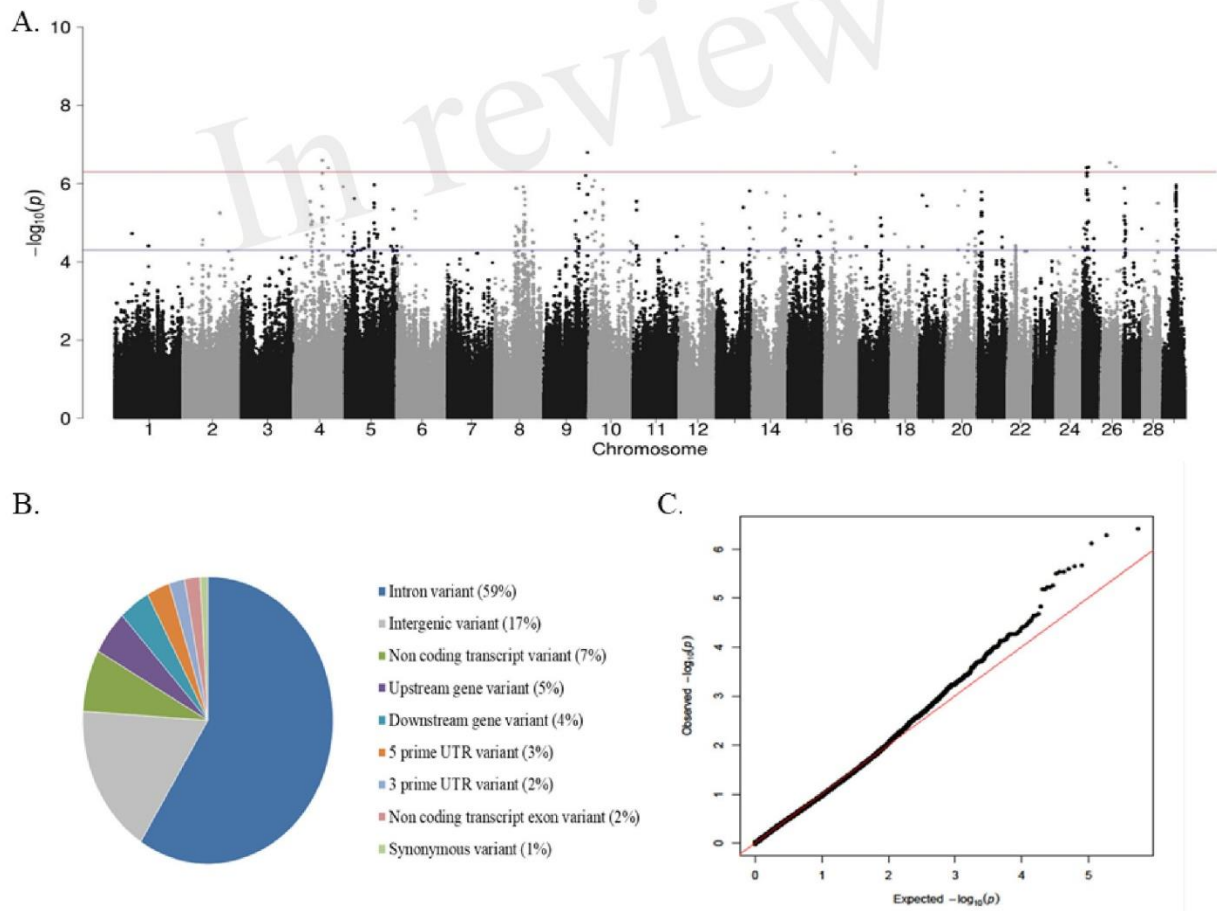


FIG 2.

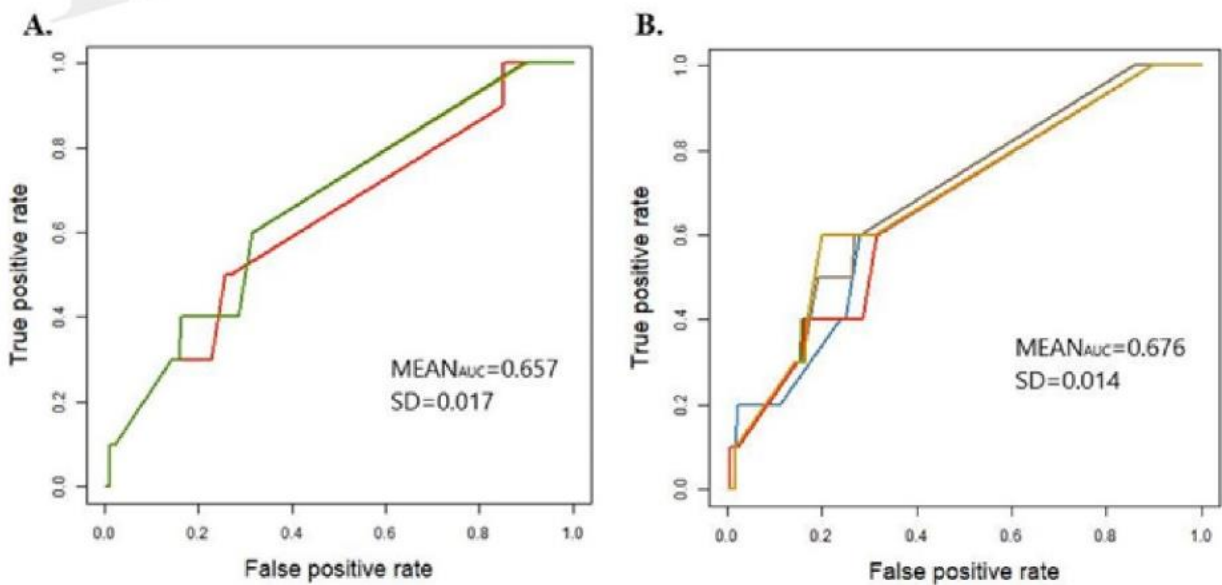
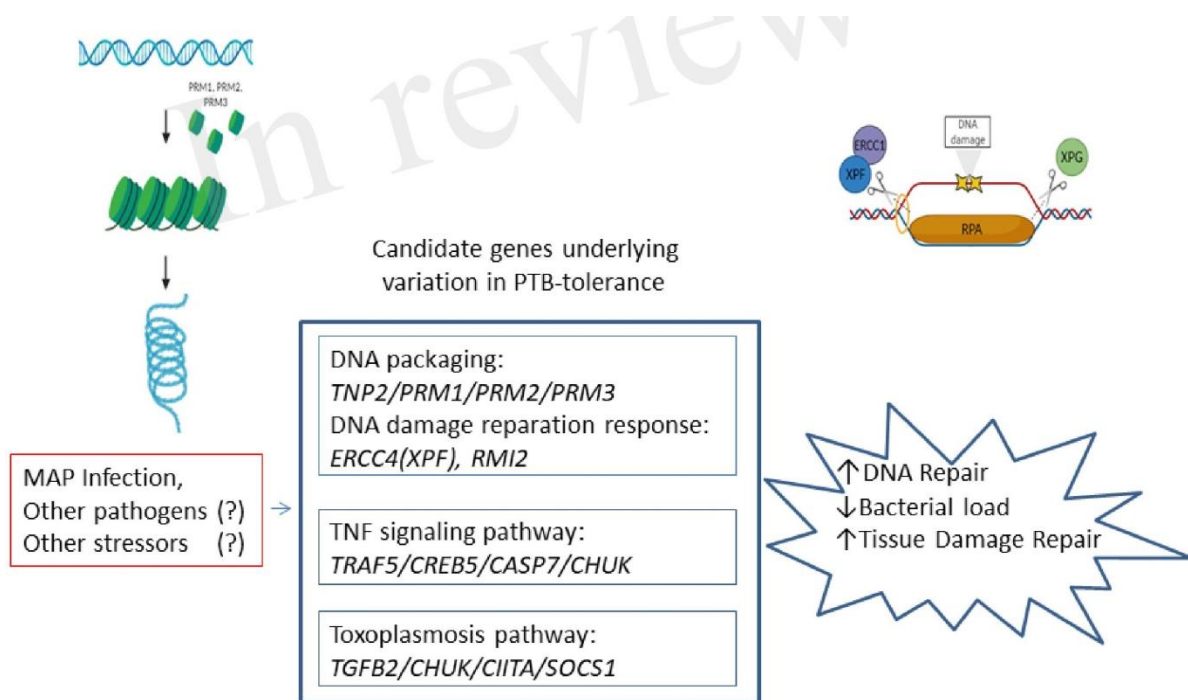


FIG 3.



ANEXO II. GLOSARIO GENÉTICO-ESTADÍSTICO

Alelo	Formas alternativas de un gen o locus cromosómico que difieren en la secuencia de DNA
Alelo menor	El alelo de un polimorfismo bialélico que es menos frecuente en la población estudiada
Call rate de genotipado	Proporción de muestras o SNPs para los que un alelo SNP específico puede identificarse de forma fiable mediante un método de genotipado
Desequilibrio de ligamiento	Asociación entre 2 alelos situados cerca uno del otro en un cromosoma, de tal manera que se heredan juntos con más frecuencia de lo que lo esperado por el azar
Efecto modesto	Asociación entre una variante genética y una enfermedad o rasgo que es estadísticamente significativa, pero que conlleva una pequeña proporción de probabilidades (normalmente 1,5)
Enfermedad mendeliana	Condición causada casi en su totalidad por un solo gen principal, como la fibrosis quística o la enfermedad de Huntington, en las que la enfermedad se manifiesta en sólo 1 (recesivo) o 2 (dominante) de los 3 posibles grupos de genotipos
Enfermedad no mendeliana	Condición influenciada por múltiples genes y factores ambientales y que no muestra patrones de herencia mendeliana
Equilibrio de Hardy-Weinberg	Distribución poblacional de 2 alelos (con frecuencias p y q) tal que la distribución es estable de generación en generación y los genotipos se presentan con frecuencias de p^2 , $2pq$ y q^2 para el alelo mayor homocigoto, heterocigoto y alelo menor homocigoto, respectivamente
Estratificación de la población	Sesgo en los estudios de asociación genética causada por diferencias genéticas entre casos y controles no relacionados con la enfermedad pero debido al muestreo de poblaciones de diferente ascendencia
Estudio de asociación de genoma completo	Cualquier estudio de la variación genética a lo largo de todo el genoma diseñado para identificar la asociación genética con rasgos observables o la presencia o ausencia de una enfermedad, que suele referirse a estudios con una densidad demarcadores genéticos de 100 000 o más para representar una gran proporción de la variación en el genoma
Estudios funcionales	Investigaciones sobre el papel o el mecanismo de una variante genética en la causalidad de una enfermedad o rasgo
False discovery rate	Proporción de asociaciones significativas que son en realidad falsos positivos
Frecuencia del alelo menor	Proporción del menos común de 2 alelos en una población que oscila de menos del 1% a menos del 50%

Gen candidato	Un gen que se cree que influye en la expresión de fenotipos complejos debido a las propiedades biológicas y/o fisiológicas conocidas de sus productos, o a su ubicación cerca de una región de asociación o vinculación
Haplotipo	Grupo de alelos específicos en genes o marcadores vecinos que tienden a heredarse juntos
Polimórfico	Gen o sitio con múltiples formas alélicas. El término polimorfismo suele implicar una frecuencia alélica menor de al menos el 1%.
Polimorfismo de nucleótido único	Forma más común de variación genética en el genoma, en la que una sustitución de una sola base ha creado 2 formas de una secuencia de DNA que difieren en un solo nucleótido
Probabilidad de falso positivo	Probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta, dado un hallazgo estadísticamente significativo
Resiliencia	Capacidad del animal de verse mínimamente afectado por las perturbaciones o de volver rápidamente al estado que tenía antes de la exposición a una perturbación
Resistencia	Capacidad de eliminar o limitar un patógeno en los estadios iniciales de la infección gracias a una respuesta inmune innata eficaz
Riesgo atribuible a la población	Proporción de una enfermedad o rasgo en la población que se debe a una causa específica, como una variante genética
Robustez	Capacidad de los animales que combinan un alto potencial de producción con la resiliencia a los factores de estrés externos, lo que permite la expresión sin problemas de un alto potencial de producción en una amplia variedad de condiciones ambientales
SNP nonsynonymous	Polimorfismo que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de una proteína y, por tanto, puede afectar a su función
SNP Tag	SNP fácilmente medible que se encuentra en un fuerte desequilibrio de enlace con otros múltiples SNP, de modo que puede servir como sustituto de estos SNP en plataformas de genotipado a gran escala
Susceptibilidad	Propiedad de animales que progresan a formas severas de la enfermedad por incapacidad de inducir una respuesta inmune innata efectiva que elimine el patógeno
Tolerancia	Capacidad de los individuos para desarrollar una serie de mecanismos para controlar el daño provocado por agentes externos
Variabilidad heredable	Variabilidad de los valores de los rasgos de un genotipo, medida repetidamente en el mismo individuo, o en múltiples individuos pertenecientes a la misma familia

