ARTÍCULO ESPECIAL

Gac Med Bilbao. 2025;122(3):138-141

# Diagnóstico precoz, resistencia genómica a la paratuberculosis bovina y regulación de la respuesta del hospedador contra esta infección

**Badia-Bringué Gerard**[a]

***(a) NEIKER Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Departamento de Sanidad Animal.***

Recibido el 27 de mayo de 2025; aceptado el 23 de septiembre de 2025

DOI: https://doi.org/10.64246/0589gmb

**PALABRAS CLAVE**

Paratuberculosis bovina.
*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.*
Diagnóstico molecular.
MicroARN.
RNA-Seq.
Genética de resistencia.

**Resumen:**
La paratuberculosis bovina (PTB), causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), es una infección crónica de distribución mundial que genera importantes pérdidas económicas en el sector ganadero. Esta tesis aborda tres aspectos clave en el control de la enfermedad: el diagnóstico precoz, la regulación de la respuesta inmunitaria y la resistencia genética del hospedador. El uso de la técnica *droplet digital* PCR (ddPCR) demostró una elevada sensibilidad para detectar ADN de MAP en sangre y heces, permitiendo identificar animales en fases subclínicas. Los estudios transcriptómicos mediante RNA-Seq revelaron microARN y eventos de *splicing* alternativo asociados a los distintos tipos de lesiones, así como la inhibición de rutas inmunitarias y proinflamatorias específicas. Además, se identificaron polimorfismos de expresión génica (cis-eQTL) relacionados con la activación del factor NF-κβ y con la aparición de lesiones multifocales y difusas. Finalmente, los análisis genéticos evidenciaron variantes y genes candidatos implicados en la fagocitosis y eliminación de MAP por macrófagos, así como en la producción de interferón gamma, lo que permite definir perfiles inmunogenéticos asociados a resistencia frente a la infección. En conjunto, los resultados abren nuevas vías para el diagnóstico temprano y la selección genética de animales resistentes, contribuyendo a mejorar el control de la paratuberculosis bovina.
© 2025 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

Autor para correspondencia: gbadia@neiker.eus (Badia-Bringué, Gerard).
© 2025 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

**GILTZA-HITZAK**

Behien paratuberkulosia.
*Mycobacterium avium subsp. paratuberkulosia.*
Diagnostiko molekularra.
MicroARN.
RNA-Seq.
Erresistentzia-genetika.

**Diagnostiko goiztiarra, behien paratuberkulosiarekiko erresistentzia genomikoa eta ostalariak infekzio honen aurka duen erantzunaren erregulazioa**

**Laburpena:**
*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) delakoak eragindako behien paratuberkulosia (PTB) munduko banaketako infekzio kronikoa da, eta galera ekonomiko handiak eragiten ditu abeltzaintza-sektorean. Tesi honek gaixotasunaren kontrolean funtsezkoak diren hiru alderdi jorratzen ditu: diagnostiko goiztiarra, erantzun immunitarioaren erregulazioa eta ostalariaren erresistentzia genetikoa. PCR (ddPCR) droplet digital teknikaren erabilerak erakutsi zuen MAParen DNA odolean eta gorozkietan detektatzeko sentikortasun handia zegoela, fase subklinikoetan dauden animaliak identifikatzeko aukera emanez. RNA-Seq bidezko azterketa transkriptomikoek mikroARNak eta lesio mota desberdinei lotutako splicing alternatiboko gertaerak errebelatu zituzten, baita ibilbide immunitario eta proinflamatorio espezifikoen inhibizioa ere. Horrez gain, adierazpen genikoko polimorfismoak (cis-eQTLs) identifikatu ziren, NF--de faktorea aktibatzearekin eta foku anitzeko lesioak eta lesio lausoak agertzearekin lotutakoak. Azkenik, analisi genetikoek agerian utzi zituzten fagozitosian eta makrofagoek eragindako MAParen ezabaketan inplikatutako aldaera eta gene hautagaiak, baita gamma interferoiaren ekoizpenean ere, eta horrek infekzioaren aurkako erresistentziarekin lotutako profil immunogenetikoak definitzea ahalbidetzen du. Oro har, emaitzek bide berriak irekitzen dituzte animalia erresistenteen diagnostiko goiztiarrerako eta hautespen genetikorako, behien paratuberkulosiaren kontrola hobetzen lagunduz.
© 2025 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Eskubide guztiak gordeta.

**KEYWORDS**
Bovine paratuberculosis.
*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis.*
Molecular diagnosis.
MicroRNA.
RNA-Seq.
Genetic resistance.

**Early diagnosis, genomic resistance to bovine paratuberculosis, and regulation of the host response against this infection**

**Abstract:**
Bovine paratuberculosis (PTB), caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), is a chronic infection of worldwide distribution that causes major economic losses in the livestock sector. This thesis addresses three key aspects of disease control: early diagnosis, regulation of the immune response, and host genetic resistance. The droplet digital PCR (ddPCR) technique showed high sensitivity for detecting MAP DNA in blood and feces, enabling the identification of subclinical animals. Transcriptomic analyses using RNA-Seq revealed microRNAs and alternative splicing events associated with different lesion types, along with the inhibition of specific immune and pro-inflammatory pathways. Moreover, expression regulatory polymorphisms (cis-eQTLs) were found to be linked to NF-κβ pathway activation and to the presence of multifocal and diffuse lesions. Genetic analyses identified variants and candidate genes involved in MAP phagocytosis and clearance by macrophages, as well as in interferon-gamma production, defining immunogenetic profiles associated with

## Introducción

La paratuberculosis (PTB) bovina es una enteritis granulomatosa crónica causada por infección por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que afecta a rumiantes y tiene una distribución mundial. Las medidas de control de la PTB comunes con otras enfermedades infecciosas del ganado son el saneamiento mediante la eliminación de animales infectados y la aplicación de medidas de bioseguridad de las granjas, así como la vacunación que sufre algunas restricciones administrativas por su interferencia con el control oficial de la tuberculosis. La selección genética viene utilizándose desde hace décadas para mejorar la productividad del

ganado bovino. Sin embargo, su aplicación al control de enfermedades está todavía poco desarrollada. Las nuevas técnicas de secuenciación y estudios de asociación de la variabilidad genética con el desarrollo de enfermedades han abierto la posibilidad de seleccionar en favor de animales resistentes y la eliminación de los más sensibles. Aunque la infección por MAP es un elemento esencial para la presentación de la enfermedad clínica, no todos los animales expuestos permiten el establecimiento de la infección y su evolución hacia formas patológicas responsables de enfermedad clínica. El citado desarrollo de las técnicas de genética molecular también permite estudiar los mecanismos reguladores de la respuesta a la infecciónque combinados con la exposición a MAP y el sustrato genético individual determinan el curso de la enfermedad.

En esta tesis, presentada en la UPV/EHU, hemos abordado estos tres aspectos de la paratuberculosis bovina publicados en seis artículos científicos que se resumen a continuación.

**Diagnóstico precoz de la paratuberculosis**

Las técnicas actuales para la detección del agente causal de la paratuberculosis, MAP, son la *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) y el aislamiento bacteriológico, este último considerado como el *gold standard*. Aun así, las dos técnicas muestran severas limitaciones para la detección de animales en estados subclínicos de la infección, los cuales suelen tener baja carga de MAP en tejidos y heces. La detección de estadios subclínicos es por tanto un desafío, por lo que nuevas estrategias de detección del patógeno y control de la enfermedad son necesarias.

En el primer estudio se hizo una evaluación de una técnica molecular de detección de MAP recientemente desarrollada y de gran potencial diagnóstico por su alta sensibilidad. La *droplet digital polymerase chain reaction* (ddPCR) es una PCR de tercera generación que muestra alta reproducibilidad para la cuantificación de bajas cantidades de DNA de MAP. En el primer estudio de la tesis doctoral, se aisló DNA de sangre y heces de vacas frisonas con resultados negativos de *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) y *real-time* qPCR (N = 75) y de animales con lesiones asociadas a la PTB de tipo focal (N = 32), multifocal (N = 21), y difuso (N = 17). Las muestras de heces de animales con lesiones difusas mostraron mayores niveles de DNA de MAP (13791 copias/µl) que las muestras de animales con lesiones multifocales (78,8 copias/µl), lesiones focales (177,1 copias/µl) o controles (4,8 copias/µl). En sangre, las muestras con mayores niveles de MAP fueron las de los animales con lesiones focales (47,7 copias/µl), comparadas con los de las muestras de animales con lesiones multifocales (18,1 copias/µl) o difusas (12,4 copias/µl). Además, la ddPCR de muestras de sangre fue el método más sensible de todos los métodos cuantitativos para la detección de animales con lesiones focales (AUC = 0,78), típicas en estadios subclínicos.

**Regulación de la respuesta a la paratuberculosis**

La técnica de secuenciación de RNA (RNA-Seq) es un método que permite estudiar todo el transcriptoma de una muestra o grupo de muestras, por lo que puede proveer de información sobre cómo un animal está respondiendo a una infección y ser una fuente de biomarcadores de diagnóstico. Los biomarcadores que pueden ser identificados por RNA-Seq pueden incluir RNA mensajero, pero también RNAs no codificantes (ncRNAs), los cuales incluyen a su vez los micro RNAs (miRNAs). Los miRNAs regulan la expresión de genes mediante la unión a sus respectivos mRNAs. Los estudios 2 y 3 presentan sendos estudios sobre marcadores de miRNA y *splicing* alternativo asociados al tipo de lesiones patológicas que caracterizan la enfermedad.

En el segundo estudio, se usó RNA-Seq para comparar la expresión de miRNAs en sangre y válvula ileocecal de vacas sin lesiones (N = 4) versus (vs) vacas con lesiones focales (N = 5) y difusas (N = 5). Se identificaron un total de 8 miRNAs diferencialmente expresados en muestras de sangre, en la comparación difusas vs controles, y 3 de ellos (bta-miR-19a, bta-miR-144, bta-miR-32) también aparecían en la comparación difusas vs focales. En válvula ileocecal, se identificaron 4, 5 y 18 miRNAs diferencialmente expresados en las comparaciones de casos de lesiones focales *vs* controles, de casos de lesiones difusas *vs* controles y de casos de lesiones difusas *vs* casos de lesiones focales, respectivamente. Análisis funcionales de los genes diana de los miRNAs identificados en válvula ileocecal mostraron inhibición de la respuesta inmune frente DNA foráneo en vacas con lesiones focales e inhibición de la ruta pro-inflamatoria de la *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) en lesiones difusas.

Otros biomarcadores que podrían mejorar el control de MAP incluyen eventos de *splicing* alternativo (*alternative splicing*, AS). El AS del pre-mRNA consiste en la eliminación de intrones y reordenamiento de exones presentes en los genes eucariotas. Los eventos de AS son capaces de influenciar la estructura y estabilidad de los tránscritos, y puede tener consecuencias fisiológicas importantes. En el tercer estudio incluido en la tesis, se usaron datos de RNA-Seq para identificar eventos de AS con diferentes frecuencias en muestras de sangre y válvula ileocecal de vacas con lesiones focales, difusas y controles. En sangre periférica de vacas con lesiones focales, se identificaron eventos de AS asociados a endocitosis y reconocimiento de antígenos, por lo que el AS podría estar contribuyendo a la tolerancia inmune a antígenos de MAP, como se observa en las infecciones de los virus de Epstein-Barr y del sarcoma de Kaposi. En vacas con lesiones difusas, el AS de genes asociados a desgranulación de neutrófilos, activación plaquetaria y apoptosis podría estar facilitando la formación del granuloma y la apoptosis de las células de la mucosa, lo

cual podría alterar la estructura de la mucosa intestinal, tal y como se ve en la infección por *Entamoeba histolytica*. A parte de su uso en el diagnóstico de infección subclínica, conocer los miRNAs y eventos de AS implicados en la respuesta inmune frente a MAP puede permitir el desarrollo de nuevas medidas de control de la infección.

En el cuarto estudio, se investigaron las asociaciones entre genotipos imputados, datos de RNA-Seq y presencia de lesiones asociadas a la PTB mediante el método de *Summary-data based Mendelian randomization* (SMR), y se identificaron un total de dos cis-eQTLs asociadas a la expresión del gen *early growth response factor 4* (EGR4) y del gen *bovine neuroblastoma breakpoint family member 6-like protein isoform* 2 (MGC134040) y a la presencia de lesiones multifocales y lesiones difusas, respectivamente. El gen EGR4 participa como inhibidor de la proliferación de células T mediante su interacción con el gen nuclear factor Kappa β (NF-κß), mientras que el gen MGC134040 es una diana de la ruta de la NF-κß.

**Resistencia genética a la paratuberculosis**

La genética asociada a susceptibilidad a PTB se ha estado investigando a fondo en los últimos años, pero solo pocos estudios han identificado variantes asociadas a resistencia contra la infección por MAP. Definir qué rasgo o conjunto de rasgos observables podría definirse como resistencia a la infección por MAP es el principal reto para la identificación de animales resistentes. Los enfoques reduccionistas se basan en el estudio de un subsistema biológico aislado, por lo que disminuyen la complejidad y variabilidad que puede tener un fenotipo, y esta función estudiada puede usarse como criterio para clasificar a la población en más susceptible o resistente.

Los *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) también pueden regular la respuesta inmune, y por tanto también la respuesta a la infección. Los SNPs con efecto en un fenotipo incluyen los *expression qualitative trait loci* (eQTLs), asociados a la expresión de genes concretos. En los estudios 5 y 6 de la tesis, se investigaron las asociaciones entre la genética del huésped y la capacidad de los macrófagos de fagocitar y eliminar MAP y la producción de interferón gamma (IFN-γ) en muestras de sangre estimuladas con *avian purified protein derivative* (aPPD). Se identificaron 6 SNPs, 5 genes candidatos y un miRNA asociados a una baja carga de MAP dentro de macrófagos a las dos horas post infección (p.i.) con MAP. Los genes candidatos incluían *Oxysterol Binding Protein Like* 6, *Cysteine and Serine Rich Nuclear Protein 3,* y *Coiled-Coil Domain Containing 92*, los cuales regulan tráfico de colesterol, apoptosis y producción de interferón, respectivamente. La producción de IFN-γ se asoció con 71 SNPs y 104 genes candidatos implicados en respuesta inmune innata y necroptosis. Por tanto, como la apoptosis suele estar inhibida en el contexto de la infección por MAP, la necroptosis podría resultar positiva para la eliminación de la bacteria y la limitación de su replicación intracelular. Los resultados de los dos estudios genéticos definen un perfil inmunogenético concreto con la capacidad de eliminar más eficientemente la bacteria y producir mayores niveles de interferón tras la infección por MAP. Además, abren la posibilidad a usar la carga de MAP en macrófagos y la producción de IFN para clasificar a los animales según su resistencia frente a la infección por MAP, lo cual se traduciría en la disminución de pérdidas económicas debidas a PTB, reduciría la prevalencia de la enfermedad, y aumentaría la vida productiva de los animales.

**Bibliografía**


1. Badia-Bringué G, Canive M, Casais R, Blanco-Vázquez C, Amado J, Iglesias N, González A, Bascones M, Juste RA, Alonso-Hearn M. Evaluation of a droplet digital PCR assay for quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in whole-blood and fecal samples from MAP-infected Holstein cattle (2022). Front Vet Sci. 9:944189. doi: 10.3389/fvets.2022.944189.
2. Badia-Bringué G, Canive M, Blanco-Vázquez C, Torremocha R, Ovalle S, Ramos-Ruiz R, Casais R, Alonso-Hearn M. MicroRNAs modulate immunological and inflammatory responses in Holstein cattle naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (2024). Sci Rep. 14(1):173. doi: 10.1038/s41598-023-50251-9.
3. Badia-Bringué G, Lavín JL, Casais R, Alonso-Hearn M. Alternative splicing of pre-mRNA modulates the immune response in Holstein cattle naturally infected with Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (2024). Front Immunol. 15:1354500. doi: 10.3389/fimmu.2024.1354500.
4. Badia-Bringué G, Canive M, Fernandez-Jimenez N, Lavín JL, Casais R, Blanco-Vázquez C, Vázquez P, Fernández A, Bilbao JR, Garrido JM, Juste RA, González-Recio O, Alonso-Hearn M. Summary-data based Mendelian randomization identifies gene expression regulatory polymorphisms associated with bovine paratuberculosis by modulation of the nuclear factor Kappa β (NF-κß)-mediated inflammatory response (2023). BMC Genomics. 24(1):605. doi: 10.1186/s12864-023-09710-w.
5. Badia-Bringué G, Canive M, Alonso-Hearn M. Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* load within infected bovine monocyte-derived macrophages is associated with host genetics (2023). Front Immunol. 14:1042638. doi: 10.3389/fimmu.2023.1042638.
6. Badia-Bringué G, Canive M, Vázquez P, Garrido JM, Fernández A, Juste RA, Jiménez JA, González-Recio O, Alonso-Hearn M. Association between High Interferon-Gamma Production in Avian Tuberculin-Stimulated Blood from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle and Candidate Genes Implicated in Necroptosis (2023). Microorganisms. 11(7):1817. doi: 10.3390/microorganisms11071817.