ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ ΜΕ ΦΥΣΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΩΝΙΑ Χ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑ

Επιβλέπων καθηγητής:

Ιωάννης Οικονομόπουλος. Αναπληρωτής Καθηγητής.

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ ΜΕ ΦΥΣΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΩΝΙΑ Χ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑ

Επιβλέπων καθηγητής:
Ιωάννης Οικονομόπουλος. Αναπληρωτής Καθηγητής.

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* ΣΕ ΠΡΟΒΑΤΑ ΜΕ ΦΥΣΙΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΤΩΝΙΑ Χ. ΜΑΤΑΡΑΓΚΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ιωάννης Οικονομόπουλος. Αναπληρωτής Καθηγητής.

Χρήστος Μπαλάσκας. Επίκουρος Καθηγητής.

Κωνσταντίνος Τριανταφυλλόπουλος. Λέκτορας.

Κυριακή Σωτηράκογλου. Καθηγήτρια.

Μαρία Γαζούλη. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια.

Alicia Aranaz. Associate Professor.

Matjaz Ocepek. Assistant Professor.

Α. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο διερεύνησης με σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του ελέγχου και της απομάκρυνσης ζώων ως μέτρου αντιμετώπισης της παραφυματίωσης, διενεργήσαμε μία προκαταρκτική μελέτη χρησιμοποιώντας ELISA και real time PCR για να εκτιμήσουμε εάν η θετικότητα των προβάτων στην παραφυματίωση κυμαίνεται μεταξύ συγκεκριμένων σταδίων αναπαραγωγής, σε πληθυσμό ζώων με υποκλινική παραφυματίωση. Στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυσης, δείγματα κοπράνων και αίματος συλλέχθηκαν από 42 ενήλικα θηλυκά ζώα, πριν (PP1) και μετά τον τοκετό (PP2), και πριν από την περίοδο οχείας. Μόνο ένα από τα ζώα αυτά αντέδρασε θετικά στην ELISA (2.38%, 1 στα 42), που αντιστοιχεί στο 2.8% των θετικών στην PCR ζώων (1 από 36). Ως εκ τούτου, το τελικό στάδιο της έρευνας διεξήχθη χρησιμοποιώντας μόνο real time PCR, η οποία εφαρμόστηκε σε δείγματα κοπράνων που συλλέχθηκαν από 85 ζώα σε 5 περιόδους δειγματοληψίας: 4-15 / 1-3 ημέρες (FP1 / FP2) πριν και μετά τον τοκετό (FP3 / FP4) και πριν από την περίοδο οχείας (FP5). Το αποτέλεσμα της προκαταρκτικής ανάλυσης έδειξε ότι η θετικότητα της PCR, τόσο ως προς τον αριθμό των προβάτων όσο και ως προς την ποσότητα του MAP, είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη πριν από τον τοκετό (PP1), ενώ αντίστοιχα της τελικής μελέτης, υψηλότερη στην FP4 σε σύγκριση με την FP5. Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα θετικότητας στην PP2 και FP4 καταγράφηκαν επίσης σε σχέση με ζώα που αντέδρασαν θετικά στην PCR περισσότερες από μία φορά. Συμπερασματικά, στα πρόβατα με υποκλινική παραφυματίωση, η περίοδος 4-15 ημερών μετά τον τοκετό είναι πιο κατάλληλη

για την εφαρμογή μέτρων ελέγχου και απομάκρυνσης με στόχο την αντιμετώπιση της νόσου, χρησιμοποιώντας real time PCR. Η χρήση της ELISA για τον ίδιο σκοπό δεν ενδείκνυται σε σχέση με τη συγκεκριμένη κατηγορία ζώων, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της μεθόδου.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές Επιστήμες, Επιστήμες Ζωικής Παραγωγής.

Λέξεις κλειδιά: Παραφυματίωση, πρόβατο, PCR, ELISA, μυκοβακτήριο, τοκετός.

B. ABSTRACT

Within the context of an investigation focused at improving the effectiveness of test-and-removal for the control of ovine paratuberculosis, we recently conducted a preliminary study using ELISA and real time PCR to assess whether parturition affects test-positivity, in animals with subclinical paratuberculosis. Samples of faeces and blood were collected from 42 adult female animals, before (PP1) and after parturition (PP2), and before mating. In the preliminary stage of the analysis, only one of the tested animals, reacted positively to ELISA (2.38%, 1 of 42), which corresponds to 2.8% of PCR-reactors (1 of 36). Therefore, the final stage the investigation was conducted using only real time PCR, which was applied to test samples of faeces collected from 85 animals, in 5 periods of sampling: 4-15/1-3 days (FP1/FP2) before and after parturition (FP3/FP4), and before mating (FP5). The result of the preliminary analysis indicated that PCR-positivity in terms of the number of shedders and the amount of MAP, is statistically significantly lower before parturition (PP1), whereas that of the final, higher in FP4 compared to FP5. Significantly higher levels of positivity in PP2 and FP4 were also recorded in connection with animals reacting positively to PCR more than once. In conclusion, in sheep with subclinical paratuberculosis, the period of 4-15 days postpartum is more suitable for the application of test-and-removal aiming to the control of the disease, using real time PCR. The use of ELISA for the same purpose is not recommended in the specific category of animals, due to low sensitivity.

Research field: Agricultural sciences, Animal sciences.

Keywords: Paratuberculosis, sheep, PCR, ELISA, mycobacterium, parturition.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στον Πατέρα μου.

Στην Μητέρα μου.

Στους Καθηγητές μου:

κ. Οικονομόπουλο.

κ. Ζέρβα.

κ. Χαδιώ.

κ. Μπαλάσκα.

κ. Τσιπλάκου.

κ. Σωτηράκογλου.

Στον Τάσο.

Στον Θοδωρή.

Στην κ. Φλωρεντία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α/Α	Τίτλος	Σελίδες
Α.	**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**	**III**
Β.	**ABSTRACT**	**V**
	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	**VII**
	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	**VIII**
Γ.	**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**	**1**
1.	**Εισαγωγή**	**1**
2.	**Παθογένεια της παραφυματίωσης**	**3**
3.	**Επιζωοτιολογία**	**10**
3.1.	**Παγκόσμια εξάπλωση**	**10**
3.2.	**Μετάδοση**	**12**
3.3.	**Παράγοντες κινδύνου**	**13**
3.3.1.	**Η ηλικία του προβάτου**	**13**
3.3.2.	**Η μολύνουσα δόση**	**14**
3.3.3.	**Η λοιμογόνος δύναμη του MAP**	**15**
3.3.4.	**Η ευαισθησία του ξενιστή**	**17**
4.	**MAP και νόσος του Crohn**	**21**

5.	**Μέτρα ελέγχου της παραφυματίωσης**	**23**
5.1.	**Εκτροφή απαλλαγμένη από τη νόσο**	**23**
5.2.	**Εκτροφή μη απαλλαγμένη από τη νόσο**	**24**
5.3.	**Εμβολιασμός**	**25**
6.	**Διάγνωση**	**30**
6.1.	**Εργαστηριακοί δείκτες για την παραφυματίωση**	**31**
6.1.1.	**Καλλιέργεια MAP**	**31**
6.1.2.	**Χρώση Ziehl-Neelsen**	**32**
6.1.3.	**ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)**	**32**
6.1.4.	**AGID (Agar gel immunodiffusion)**	**32**
6.1.5.	**Δοκιμή της IFN-γ**	**33**
6.1.6.	**DTH (Delayed-type hypersensitivity)**	**33**
6.1.7.	**PCR (Polymerase chain reaction)**	**33**
Δ.	**ΣΚΟΠΟΣ**	**36**
Ε.	**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**	**37**
1.	**Περίγραμμα μεθοδολογίας**	**37**
2.	**Δειγματοληψία**	**39**
3.	**ELISA**	**45**
4.	**Απομόνωση DNA MAP από κόπρανα**	**46**
5.	**Εκτίμηση της ποιότητας του DNA**	**47**

6.	**Real time PCR**	**48**
7.	**Στατιστική επεξεργασία**	**49**
Ζ.	**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**	**50**
Η.	**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**	**60**
Θ.	**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**	**66**
Ι.	**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**	**67**

Γ. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραφυματίωση ή αλλιώς νόσος του Johne (JD), είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος του εντέρου κυρίως των μηρυκαστικών αλλά και πολλών άλλων ζωικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων της αλεπούς, των ιπποειδών, του κουνελιού και του λαγού, της όρνιθας, του ποντικού, των πρωτευόντων, του σκύλου και του χοίρου (EFSA AHAW Panel, 2017).

Η παραφυματίωση προκαλείται από το *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), ένα μικρό σε μέγεθος (0.5 - 1.5 μm), κυλινδρικό, οξεάντοχο (Acid-Fast Bacilli, AFB), θετικό κατά Gram και προαιρετικά αερόβιο, αργής ανάπτυξης, μη κινητό βακτήριο, το οποίο πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά ενδοκυτταρικά. Το MAP ταξινομείται ως υποείδος του *M. avium complex* (MAC) μαζί με τα *M. avium* subsp. *avium, M. avium* subsp. *silvaticum,* και το *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mijs *et al.*, 2002). Διακριτικό χαρακτηριστικό γνώρισμα του MAP από τα άλλα υποείδη του είδους *M. avium*, αποτελεί η εξάρτησή του από τη μυκοβακτίνη για την καλλιέργειά του *in vitro* (Lambrecht *et al.*, 1988, Homuth *et al.*, 1998), καθώς και η παρουσία της αλληλουχίας ένθεσης *IS900* (Insertion Sequence) στο γενετικό του υλικό (Karcher *et al.*, 2008).

Οι πρώτες ενδείξεις για την προσβολή των μηρυκαστικών από το MAP αναφέρθηκαν το 1895 από τον Heinrich Albert Johne (10 December 1839 – 5 December 1910) με την απομόνωση άφθονων οξεάντοχων βακίλων σε τεμάχια εντερικού ιστού αγελάδας που είχε πεθάνει λόγω μη ανταποκρινόμενης διάρροιας (Johne and Frothingham, 1895). Στην Ελλάδα η παραφυματίωση διαγνώστηκε για πρώτη φορά το 1968 με την ανίχνευση των χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών αλλοιώσεων της νόσου στην αίγα (Leontides *et al.*, 1975). Έκτοτε έχει διαπιστωθεί ότι η διάδοση της παραφυματίωσης και στην Ελλάδα είναι πολύ μεγάλη, ενώ λόγω του κτηνοτροφικού προσανατολισμού της χώρας, επιβαρύνει ιδιαίτερα την απόδοση της εκτροφής μικρών μηρυκαστικών. Επισημαίνεται ότι αυτό ισχύει ιδίως για το πρόβατο που νοσεί συνήθως ασυμπτωματικά, με αποτέλεσμα ο έλεγχος της νόσου να είναι πολύ δύσκολος. Δεδομένου μάλιστα ότι η αντιμετώπιση της παραφυματίωσης σε επίπεδο πρόληψης βασίζεται πρωτίστως στον έλεγχο και την απομάκρυνση των ζώων που αντιδρούν θετικά σε συγκεκριμένες διαγνωστικές δοκιμές, το γεγονός ότι το πρόβατο νοσεί υποκλινικά, η επιτυχής εργαστηριακή διάγνωση της νόσου ανάγεται σε θέμα κομβικής σημασίας για τον περιορισμό της αρνητικής επίπτωσης της συγκεκριμένης νόσου στην προβατοτροφία. Για τον λόγο αυτόν η παρούσα μελέτη εστιάζεται στο πρόβατο, σε σχέση με τη μεταβολή συγκεκριμένων εργαστηριακών διαγνωστικών δεικτών γύρω από την περίοδο του τοκετού, με σκοπό τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του ελέγχου και της απομάκρυνσης θετικών ζώων για τον αποτελεσματικό έλεγχο της νόσου.

2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΊΩΣΗΣ

Η προσβολή του προβάτου από το MAP γίνεται κυρίως δια της στοματικής οδού, όταν η μολύνουσα δόση αρκεί για την προσκόλλησή του στον εντερικό βλεννογόνο και την εγκατάσταση λοίμωξης.

Από μελέτες *in vivo* προκύπτει ότι ο αποικισμός του εντέρου από το MAP ξεκινά εντός λίγων ωρών μετά την είσοδό του στον οργανισμό (Ponnusamy *et al.*, 2013; Abendaño *et al.*, 2014). Αυτό το στάδιο μόλυνσης αναφέρεται ως πρώιμη ή λανθάνουσα λοίμωξη και δεν συνδέεται κατ' ανάγκη με αυξημένη αποβολή του MAP στα κόπρανα, μακροσκοπικές αλλοιώσεις στο έντερο, ή κλινικά συμπτώματα. Για τα ζώα που αναπτύσσουν ιστολογικές αλλοιώσεις, το λανθάνον στάδιο της λοίμωξης μπορεί να είναι σχετικά μικρής διάρκειας, ενώ οι εντερικές αλλοιώσεις αρχίζουν να εμφανίζονται μερικές εβδομάδες μετά την έκθεση στο παθογόνο (Begara-McGorum *et al.*, 1998). Οι εντερικές αλλοιώσεις των φυσικά μολυσμένων προβάτων εντοπίζονται κυρίως στις πλάκες του Peyer της νήστιδας και της ειλεοτυφλικής βαλβίδας, καθώς και στους μεσεντέριους λεμφαδένες. Το λεπτό έντερο, ειδικότερα το τοίχωμα του ειλεού, επηρεάζεται βαρύτερα (Kluge *et al.*, 1968; Dennis *et al.*, 2010; Preziuso *et al.*, 2012) και φέρει μεγαλύτερο αριθμό MAP συγκριτικά με τους λεμφαδένες (Clarke and Little, 1996; Dennis *et al.*, 2010).

Βάσει της έκτασης και της βαρύτητας των ιστολογικών αλλοιώσεων που αναπτύσσονται στο έντερο προβάτων με παραφυματίωση, έχει καθιερωθεί ένα σύστημα βαθμονόμησής τους με σκοπό την πρόγνωση (Pérez *et al.*, 1996). Σε αυτό το πλαίσιο περιγράφεται ο τύπος αλλοιώσεων 1 που συνίστανται σε μικρά εστιακά κοκκιώματα επιθηλιοειδών κυττάρων που περιορίζονται στις πλάκες του

Peyer, ενώ οι αλλοιώσεις τύπου 2 επεκτείνονται και στον εντερικό βλεννογόνο δίπλα από αυτές. Ο τύπος αλλοιώσεων 3 χαρακτηρίζεται από πολυεστιακή ή διάχυτη κυτταρική διήθηση, η οποία εκτείνεται σε περιοχές του βλεννογόνου που δεν σχετίζονται με τους λεμφοειδείς ιστούς (Pérez *et al.*, 1996). Αυτού του τύπου οι αλλοιώσεις εκτείνονται στον υποβλεννογόνιο ιστό (Clarke and Little, 1996), και έχουν ως αποτέλεσμα την πάχυνση του εντερικού βλεννογόνου και την ατροφία των εντερικών λαχνών. Σε αυτή την περίπτωση προκαλείται σύνδρομο δυσαπορρόφησης και αυξάνεται η πιθανότητα κλινικής νόσου. Οι τύποι 3b και 3c, που αντιστοιχούν σε διάχυτη κοκκιωματώδη εντερίτιδα, είναι οι πιο εκτεταμένοι τύποι αλλοιώσεων (Pérez *et al.*, 1996; Clarke, 1997) και εκδηλώνονται με τα τυπικά, για τη νόσο, νεκροτομικά ευρήματα, δηλαδή με διάχυτη ελκώδη αιμορραγική εντερίτιδα που εξελίσσεται σε νεκρωτική (Pérez *et al.*, 1996).

Βάσει της ποσότητας του MAP στους προσβεβλημένους ιστούς, οι αλλοιώσεις διακρίνονται επίσης σε «ολιγοβακτηριακές» στις οποίες ανιχνεύονται λίγοι ή καθόλου βάκιλοι, και σε «πολυβακτηριακές» στις οποίες υπάρχουν άφθονοι βάκιλοι (Clarke and Little, 1996; Kurade *et al.*, 2004). Όλοι οι τύποι αλλοιώσεων είναι συνήθως ολιγοβακτηριακοί, εκτός τις τύπου 3b. Η εξέλιξη των πολυβακτηριακών αλλοιώσεων στο τελικό τμήμα του ειλεού είναι συνήθως μη αναστρέψιμη (Dennis *et al.*, 2010) και συνδέεται με σταθερή αποβολή μεγάλου αριθμού κυττάρων MAP στα κόπρανα (Whittington *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; Reddacliff *et al.*, 2006; Kawaji *et al.*, 2011). Οι διάχυτες εντερικές αλλοιώσεις αμφότερων τύπων 3b και 3c, συνδέονται σχεδόν πάντα έκδηλη κλινικά εικόνα τόσο στα φυσικά, όσο και τεχνητά μολυσμένα πρόβατα (Clarke and Little, 1996; Whittington *et al.*, 2000; Kurade *et al.*, 2004; Reddacliff *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2010; Preziuso *et al.*, 2012). Όταν αυτές οι αλλοιώσεις είναι πολυβακτηριακές παρουσιάζουν ισχυρή τάση μετάστασης από το έντερο σε άλλους ιστούς, κυρίως στο ήπαρ και σε λεμφαδένες του ήπατος και του μαστού (Bower *et al.*, 2011; Preziuzo *et al.*, 2012).

Μετά την εγκατάσταση του MAP στο έντερο και στους επιχώριους λεμφαδένες, αρχίζει η αποβολή του από τα κόπρανα. Η κατάσταση αυτή αντιδιαστέλλεται από την απλή διέλευση του MAP από την πεπτική οδό, η οποία οφείλεται στη μεγάλη διάδοσή του στη φύση και δεν σχετίζεται με προσβολή του ζώου. Εκτός από τη μεγάλη διαφορά του αριθμού MAP που αποβάλλεται από τα πρόβατα που παρουσιάζουν ολιγο- ή πολυβακτηριακές αλλοιώσεις, στην πρώτη περίπτωση, η αποβολή είναι συχνά, μόνο διαλείπουσα (Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2010) ενώ στη δεύτερη, σταθερή (Whittington *et al.*, 2000). Η μέση αποβολή MAP εκτιμήθηκε σε $2{,}4 \times 10^6$ cfu / ημέρα και σε 1×10^{11} cfu / ημέρα, για τα ζώα αντίστοιχα με ολιγοβακτηριακές και πολυβακτηριακές αλλοιώσεις (Whittington *et al.*, 2000). Αντιθέτως, η παθητική αποβολή του MAP συμβαίνει συνήθως σε πολύ μολυσμένες εκτροφές και έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται μετά την απομάκρυνση των φορέων της νόσου (Fecteau *et al.*, 2010; Kralik *et al.*, 2014). Τα σχετικά πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η παθητική αποβολή του MAP στο πρόβατο μπορεί να ξεκινήσει έως και 10 ημέρες μετά την από του στόματος λήψη του (Whittington and Sergeant, 2001). Στην πράξη είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί η παθητική αποβολή από την πρώιμη παροδική (ενεργή) αποβολή, ενώ κατά σύμβαση, η παθητική αποβολή του MAP θεωρείται ισοδύναμη με τη λανθάνουσα μόλυνση (Smith *et al.*, 2009), δεδομένου ότι ακόμη και χαμηλές δόσεις του βακτηρίου επαρκούν για να μολυνθεί ένα πρόβατο. Επισημαίνεται άλλωστε ότι η βραχυχρόνια παροδική αποβολή του MAP που ακολουθείται από ανάκαμψη, και η παθητική αποβολή δίχως μόλυνση, έχουν το ίδιο αποτέλεσμα (Mitchell *et al.*, 2015).

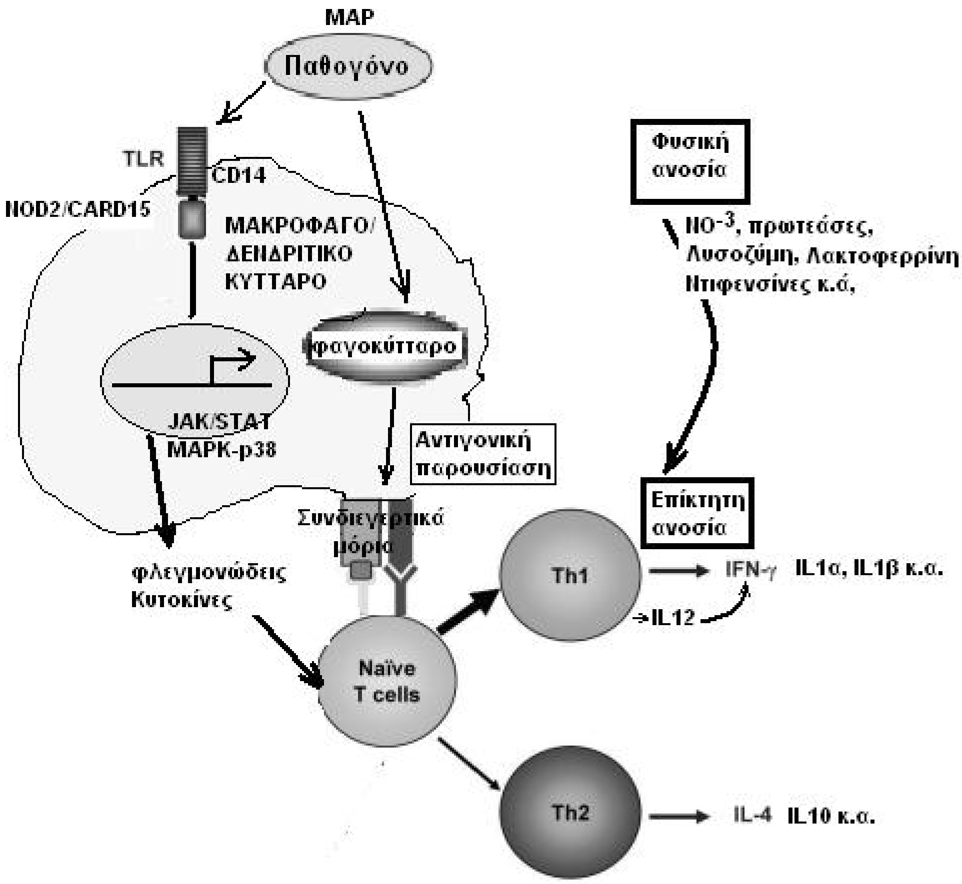
Η ανοσοποιητική αντίδραση που ακολουθεί την εγκατάσταση λοίμωξης είναι δυο κυρίως τύπων, από τους οποίους ο ένας χαρακτηρίζεται από την επικράτηση της κυτταρικής ανοσίας και των λεμφοκυττάρων Th1, και ο άλλος από την επικράτηση της χυμικής ανοσίας και των Th2. Αυτή η διαφοροποίηση καθορίζεται από πολλούς παράγοντες και κυρίως από την ενεργοποίηση κυτταρικών υποδοχέων και την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών, με κυριότερες την ιντερφερόνη γάμμα (IFN-γ) και την ιντερλευκίνη-10 (IL-10), (Abendaño *et al.*, 2014). Στην πραγματικότητα η ιντερλευκίνη-12 είναι η πρώτη κυτταροκίνη που εκκινεί τα Τ λεμφοκυττάρα για την παραγωγή της IFN-γ (Silva et al., 2001). Σημαντικό να αναφερθεί είναι το γεγονός ότι εκτός των προαναφερθέντων υποπληθυσμών Τ λεμφοκυττάρων και άλλοι υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων αλλά και αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά (Εικόνα 1) έχουν αναγνωριστεί και μεσολαβούν κατά την αντιγονο-παρουσίαση (Chen and O'Shea, 2008; Koets *et al.*, 2015), αλλά είναι εκτός του αντικειμένου της παρούσης εργασίας για να αναλυθούν περαιτέρω.

Η προφλεγμονώδης IFN-γ (Interferon gamma) μεσολαβεί στην ανοσοαπόκριση έναντι των ενδοκυτταρικών παθογόνων όπως είναι το MAP (Koets *et al.*, 2015) και για τον λόγο αυτόν θεωρείται δείκτης πρόσφατης έκθεσης στο MAP (Whittington and Sergeant, 2001; de Silva *et al.*, 2013). Υψηλά επίπεδα IFN-γ παρατηρούνται στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης, ενώ η μείωση της IFN-γ είναι προγνωστικής σημασίας για την εκδήλωση κλινικής νόσου και την έντονη αποβολή του MAP μέσω των κοπράνων (de Silva *et al.*, 2013). Επισημαίνεται ότι γενετικής αιτιολογίας αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της IFN-γ παρατηρείται σε εντερικούς ιστούς προβάτων που έχουν την τάση να αναπτύσσουν ολιγοβακτηριακές αλλοιώσεις μετά την έκθεσή τους στο MAP (Smeed *et al.*, 2007).

Αντιθέτως, η IL-10 (Interleukin 10) είναι μια αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη που επάγεται από το MAP για να αναστείλει την Th1 (T helper type 1) ανοσοποιητική απόκριση, γεγονός που συμβάλλει στην επιβίωσή του στα μακροφάγα (de Silva *et al.*, 2013; Koets *et al.*, 2015). Στα πρώιμα στάδια μόλυνσης παρατηρήθηκε *in vitro* συσχέτιση μεταξύ αυξημένης αντι-αποπτωτικής απόκρισης μολυσμένων μακροφάγων και της επιβίωσης του MAP στα μακροφάγα αυτά (Abendaño *et al.*, 2014). Το επίπεδο της IL-10 αυξάνεται προοδευτικά σε μολυσμένα ζώα καθώς προχωρά η ασθένεια (de Silva *et al.*, 2011, 2013). Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος της IL-10 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Η κυτταροκίνη αυτή πιστεύεται ότι σχετίζεται με την ανεπάρκεια της Th1 ανοσοποιητικής απόκρισης και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως δείκτης δυσμενούς πρόγνωσης. Ωστόσο, η αύξηση των επιπέδων της IL-10 στο περιφερικό αίμα μπορεί να παρατηρηθεί ήδη 4 μήνες μετά τον ενοφθαλμισμό πειραματικώς μολυσμένων προβάτων (de Silva *et al.*, 2011), και φαίνεται ότι συνδέεται με την αντίστασή τους στην ασθένεια κατά τη διάρκεια της εξέλιξής της (de Silva *et al.*, 2013). Αυτό υποδηλώνει ότι η ανοσοκατασταλτική δράση της IL-10 μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση περιορίζοντας τη βλάβη στους εντερικούς ιστούς (de Silva *et al.*, 2013; Koets *et al.*, 2015), δίχως όμως να είναι σαφές εάν σε αυτήν αντικατοπτρίζεται επαρκώς το επίπεδο της τοπικής εντερικής ανοσίας (Koets *et al.*, 2015). Μία παραλλαγή της προσαρμοστικής ανοσοαπόκρισης και ιδιαίτερα της έκφρασης της IL-10 μπορεί να παρατηρηθεί στο αίμα συγκριτικά με τους μεσεντέριους λεμφαδένες και τον εντερικό ιστό στην περιοχή του ειλεού. Προκύπτει ότι η έκφραση της IL-10 διαφέρει σαφώς μεταξύ των προβάτων με ολιγοβακτηριακές και πολυβακτηριακές αλλοιώσεις (Marquetoux *et al*., 2018). Η IL-10 υπερ-εκφράζεται στο τοίχωμα του ειλεού σε πρόβατα με πολυβακτηριακές αλλοιώσεις (Smeed *et al.*, 2007), ενώ υπο-εκφράζεται στους μεσεντέριους λεμφαδένες (de Silva *et al.*, 2011).

Αυτή η ανοσοποιητική διαφοροποίηση τύπου Th1 και Th2 (T helper cell type 2) είναι δυναμική (Clarke, 1997). Η πρώτη (Th1), αντιστοιχεί σε ελεγχόμενη λοίμωξη κατά το πρώιμο στάδιο και σε ολιγοβακτηριακές αλλοιώσεις, ενώ η δεύτερη (Th2) συνδέεται με πολυβακτηριακές αλλοιώσεις και με την έναρξη της κλινικής νόσου. Παράγοντες από τους οποίους καθορίζεται η μεταβολή της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ Th1 και Th2 ανοσίας είναι η εξάντληση των T-κυττάρων κυτταρικής ανοσίας, το μέγεθος της έκθεσης στο MAP, και ο βαθμός της καταστροφής των μακροφάγων (Koets *et al.*, 2015).

Από πρόσφατες έρευνες προκύπτει ότι ενδεχομένως το πρότυπο της ανοσοποιητικής αντίδρασης στη λοίμωξη από MAP είναι περισσότερο σύνθετο από αυτό που βασίζεται απλώς στην εναλλαγή μεταξύ Th1 και Th2 κυτταρικής ανοσίας. Αυτό προκύπτει από την παρατήρηση ότι τα μισά από τα πρόβατα που μολύνονται πειραματικά με MAP παρουσιάζουν σε πρώιμο στάδιο έναν συνδυασμό αυτού του τύπου των αντιδράσεων (Begg *et al.*, 2011), ενώ πρόβατα που εμφάνισαν μόνο εστιακές εντερικές αλλοιώσεις παρουσιάζουν επιπροσθέτως μειωμένη σύνθεση IFN-γ (Fernandez *et al.*, 2015). Από τα παραπάνω υποδηλώνεται ότι η εξέλιξη της ασθένειας θα μπορούσε να αποτελεί συνέπεια μιας γενικότερης ανοσοποιητικής απορρύθμισης που πιθανότατα επάγεται από το ίδιο το MAP, και οδηγεί σε αποτυχία της Th1 αντίδρασης και επικράτηση της Th2.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της ανοσιακής ανταπόκρισης της προσβολής από MAP, σε κυτταρικό επίπεδο.

3. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Η παραφυματίωση είναι ενζωοτικό νόσημα στις περισσότερες κτηνοτροφικά ανεπτυγμένες χώρες και η εξάπλωσή της είναι παγκόσμια λόγω της εκτεταμένης μετακίνησης ζωικού κεφαλαίου. Υπολογίζεται πως ο επιπολασμός της νόσου στο πρόβατο κυμαίνεται μεταξύ 2% και 32% αναλόγως της χώρας ή της γεωγραφικής περιοχής (Begg and Whittington, 2010).

Η παραφυματίωση στα μικρά μηρυκαστικά έχει εξαπλωθεί σε πολλές χώρες (Εικόνα 1), μεταξύ των οποίων η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, η Νότιος Αφρική, η Ελλάδα, η Ισπανία, η Πορτογαλία, το Μαρόκο, η Ιορδανία (Benazzi *et al.*, 2010; Djenne, 2010; Hailat *et al.*, 2010; Windsor, 2015), η Γαλλία, η Νορβηγία, η Ελβετία, η Κροατία, ο Καναδάς, οι Ηνωμένες Πολιτείες και η Χιλή (Barkema *et al.*, 2010; Windsor, 2015).

Στην Ελλάδα, αν και η παραφυματίωση ενζωοτεί και αποτελεί νόσημα υποχρεωτικής δήλωσης (Kostoulas *et al.*, 2006; Ikonomopoulos *et al.*, 2007; Dimareli-Malli *et al.*, 2013), δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για τον επιπολασμό της νόσου μετά από την τελευταία σχετικά αναφορά του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων (OIE) το 2004, στην οποία καταγράφονται 18 κρούσματα σε κοπάδια αιγών και 20 κρούσματα σε κοπάδια προβάτων. Στην ίδια έκθεση αναφέρεται ότι ο συνολικός αριθμός των προσβεβλημένων ζώων ήταν 339 αίγες και 806 πρόβατα, από τα οποία επέζησαν αντίστοιχα 67 και 577. Σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ), ο συνολικός πληθυσμός των αιγών για το έτος 2004 ήταν 5.209.138, και των προβάτων 8.912.952, από τα οποία οι 8.030 αίγες και τα 18.737 πρόβατα ήταν εμβολιασμένα κατά της παραφυματίωσης. Από το έτος 2005 έως και το 2016, στις εκθέσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων γίνεται αναφορά στη διάδοση της παραφυματίωσης στην Ελλάδα, αλλά χωρίς αναλυτικά στοιχεία, ενώ και από τις αρμόδιες κτηνιατρικές αρχές της χώρας δεν υπάρχει επίσημη αναφορά για τον επιπολασμό της νόσου. Βάσει ερευνητικών δεδομένων προκύπτει ότι κατά την περίοδο 1987-2003, 322 από τις 777 (41,4%) αίγες και 97 από τα 458 (21,1%) πρόβατα που εξετάσθηκαν, βρέθηκαν ορολογικά θετικά σε MAP στη Βόρεια Ελλάδα (Dimareli-Malli *et al.*, 2009). Σε άλλη ερευνητική μελέτη του 2014 αναφέρεται πως σε σύνολο 1599 αιγών στη Βόρεια Ελλάδα, η οροθετικότητα στην παραφυματίωση ανήλθε στο 10%, ενώ τουλάχιστον ένα ζώο ανά κοπάδι βρέθηκε οροθετικό στο MAP σε ποσοστό 24.1% του συνόλου των κοπαδιών που εξετάσθηκαν (Angelidou *et al.*, 2014).

Εικόνα 2. Παγκόσμια εξάπλωση της παραφυματίωσης (IAP, 2017).

3.2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Η κύρια οδός μετάδοσης του MAP είναι η κοπρανοστοματική. Μέσω της συγκεκριμένης οδού προσβάλλονται κατά κύριο λόγο τα νεαρά ζώα, κατά τον θηλασμό λόγω της μόλυνσης του μαστού με MAP που προέρχεται από τα κόπρανα. Σημαντική πηγή μόλυνσης για τα ζώα αποτελεί επίσης το περιβάλλον της εκτροφής όπου το MAP επιβιώνει για διάστημα πολλών μηνών (Chiodini *et al.*, 1984; Whittington and Sergeant, 2001; Lambeth *et al.*, 2004; Nebbia *et al.*, 2006).

Η έκθεση των ζώων που γαλουχούν στο MAP δεν περιορίζεται στον μολυσμένο με κόπρανα μαστό, αλλά μπορεί να γίνει και μέσω του γάλακτος (Lambeth *et al.*, 2004), δεδομένου ότι σε προχωρημένο στάδιο της νόσου το συγκεκριμένο βακτήριο εντοπίστηκε και στον μαστικό ιστό (Preziuso *et al.*, 2012). Σε αρκετές περιπτώσεις στοιχειοθετείται και ενδομήτρια μετάδοση (Lambeth *et al.*, 2004), ενώ είναι πιθανή η μετάδοσή του μέσω άγριων ζώων (Stevenson *et al.*, 2009).

Η είσοδος της νόσου σε ένα μη μολυσμένο ποίμνιο μπορεί να γίνει μέσω έμμεσης έκθεσης στο MAP κατά τη βόσκηση σε περιοχές που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό από μολυσμένα ζώα (Rast and Whittington, 2005; Marquetoux *et al.*, 2016). Ο συγκεκριμένος τρόπος μετάδοσης είναι σημαντικός για τη μόλυνση μεμονωμένων προβάτων όλων των ηλικιών, συμπεριλαμβανομένου των ενηλίκων (Reddacliff *et al.*, 2004; McGregor *et al.*, 2012).

Η επιβίωση του MAP στο περιβάλλον είναι καθοριστικός παράγοντας της δυναμικής που μπορεί να έχει η μετάδοσή του μέσω μολυσμένης βοσκής. Σε μολυσμένο βοσκότοπο, το έδαφος, τα χόρτα και το νερό απορροής είναι συνήθως μολυσμένα με MAP, το οποίο επιβιώνει για διάστημα έως και 55 εβδομάδες στο έδαφος και 16-24 εβδομάδες στο χόρτο, ιδίως υπο σκιερές συνθήκες (Whittington *et al.*, 2004; Eppleston *et al.*, 2014) και σε αργιλώδες έδαφος (Dhand *et al.*, 2009).

3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η έκβαση της λοίμωξης από το MAP εξαρτάται από έναν αριθμό βιολογικών μεταβλητών όπως η ηλικία του προβάτου, η μολύνουσα δόση, η λοιμογόνος δύναμη του μικροβιακού στελέχους, και η ευαισθησία του ξενιστή (Hines *et al.*, 2007; Begg and Whittington, 2008; Marquetoux *et al.*, 2018). Οι παράγοντες αυτοί αναλύονται παρακάτω:

3.3.1. Η ηλικία του προβάτου

Παλαιότερα, επικρατούσε η άποψη ότι η ευαισθησία του προβάτου στο MAP είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την ηλικία, κάτι που είχε επιβεβαιωθεί για τα βοοειδή (Whittington and Sergeant, 2001; Windsor and Whittington, 2010). Ωστόσο, από μελέτες που έγιναν ειδικά στο πρόβατο προκύπτει ότι τα ενήλικα ζώα είναι επίσης ευπαθή στη μόλυνση από το συγκεκριμένο παθογόνο όταν εκτεθούν κατ’ επανάληψη σε μεγάλο αριθμό βακτηριακών κυττάρων (Fecteau *et al.*, 2010; McGregor *et al.*, 2012). Μάλιστα σε *in vivo* πειράματα διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά σε ότι αφορά την προσβολή από το MAP μεταξύ νεαρών και ενήλικων ζώων (Reddacliff *et al.*, 2004; Dennis *et al.*, 2010;

McGregor *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, ενήλικα πρόβατα ηλικίας 2 έως 10 ετών μολύνθηκαν μετά από πρόκληση με MAP ακόμη και με χαμηλή δόση (10^3 cfu), ενώ τα πρόβατα που εκτέθηκαν σε υψηλές δόσεις MAP ανέπτυξαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, ανεξαρτήτως ηλικίας (Delgado *et al.*, 2012, 2013).

Αντιθέτως προς την ευπάθεια στη μόλυνση, η πιθανότητα εκδήλωσης της κλινικής νόσου φαίνεται ότι σχετίζεται με την ηλικία. Σε πειραματικές μελέτες, ο αριθμός και η έκταση των κοκκιωμάτων στο έντερο προβάτων ηλικίας ενός μηνός ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από ότι σε ενήλικα ζώα (Delgado *et al.*, 2012, 2013). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε πρόβατα που μολύνθηκαν φυσικά με MAP. Πιο συγκεκριμένα, τα πρόβατα ηλικίας έως 2 ετών ανέπτυσσαν σημαντικά περισσότερες και πιο σοβαρές αλλοιώσεις στο έντερο μετά από βόσκηση σε μολυσμένους βοσκότοπους, συγκριτικά με τα ζώα που εκτέθηκαν στο MAP μετά τη συγκεκριμένη ηλικία (McGregor *et al.*, 2012). Μάλιστα, η αποβολή του MAP μέσω των κοπράνων ξεκίνησε νωρίτερα στα ζώα της πρώτης ομάδας (ηλικίας κάτω των 2 ετών). Σε μια σχετική μελέτη διάρκειας 7 ετών, αναφέρεται ότι μόνο τα πρόβατα που εκτέθηκαν στο MAP σε ηλικία μικρότερη του ενός έτους το απέβαλλαν στα κόπρανά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, και μόνο αυτά τα ζώα του κοπαδιού διαπιστώθηκε ότι εκδήλωναν κλινική νόσο (Rast and Whittington, 2005).

3.3.2. Η μολύνουσα δόση

Η ελάχιστη λοιμογόνος δόση για το πρόβατο υπολογίζεται σε περίπου σε 10^3 κυττάρων MAP, αλλά φαίνεται ότι αυτή δεν επαρκεί για την ενεργό προσβολή του εντέρου (Brotherston *et al.*, 1961; Delgado *et al.*, 2012). Αύξηση της μολύνουσας δόσης σε 10^8 κυττάρων MAP επιφέρει βαριά προσβολή του εντέρου, μόλις 7-14 εβδομάδες μετά τη μόλυνση (Nisbet *et al.*, 1962; Reddacliff and Whittington, 2003; Delgado *et al.*, 2013). Αναφέρεται επίσης ότι και η πρόγνωση καθίσταται δυσμενέστερη όσο μεγαλύτερη είναι η μολύνουσα δόση (Brotherston *et al.*, 1961; Marquetoux *et al.*, 2018). Μετά από έκθεση σε βοσκοτόπους με υψηλό επίπεδο μόλυνσης τα πρόβατα είχαν 3.5 φορές περισσότερες πιθανότητες να αποβάλουν το MAP, 18.2 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα θανάτου λόγω κλινικής παραφυματίωσης, απέβαλλαν 3.4 φορές νωρίτερα το MAP, και εκδήλωναν την κλινική νόσο 18.6 φορές νωρίτερα συγκριτικά με ζώα που εκτέθηκαν στο MAP σε βοσκές με χαμηλό επίπεδο μόλυνσης (McGregor *et al.*, 2012).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η έκβαση της μόλυνσης διαφέρει ανάλογα με τη δόση του MAP. Πιο συγκεκριμένα, οι χαμηλές και μεσαίες δόσεις σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα ανάρρωσης, ενώ οι υψηλές, συνδέονται συχνότερα με βαριά προσβολή του εντέρου και κλινική νόσο.

3.3.3. Η λοιμογόνος δύναμη του MAP

Τα στελέχη του MAP διακρίνονται βάσει γενετικής ανάλυσης στον τύπο S (Sheep) και τον C (Cattle) με ειδικότητα αντίστοιχα, στο πρόβατο και σε βοοειδή (Collins *et al.*, 1990). Περαιτέρω μοριακή ανάλυση (Stevenson *et al.*, 2002) ανέδειξε τις γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών αυτών, και έτσι καθιερώθηκε ένα σύστημα διάκρισής τους, με βάση φαινοτυπικά και γονοτυπικά χαρακτηριστικά:

i) Στον τύπο I (ή S) περιλαμβάνονται στελέχη MAP που είναι δύσκολο να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια, παρουσιάζουν ισχυρή εκλεκτικότητα για το πρόβατο και είναι συνήθως πιο λοιμογόνα για αυτά, από τα στελέχη τύπου II (Whittington *et al.*, 2011; Marquetoux *et al.*, 2018).

ii) Στον τύπο II (ή C) περιλαμβάνονται στελέχη που αναπτύσσονται εύκολα σε καλλιέργεια, συνήθως απομονώνονται από βοοειδή, και λιγότερο συχνά από το ελάφι και το πρόβατο (Stevenson *et al.*, 2002).

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένας ακόμη τύπος, ο III, ο οποίος θεωρείται ότι συνιστά υπότυπο του στελέχους S (Stevenson, 2015).

Αν και όπως αναφέρθηκε τα στελέχη C απομονώνονται κυρίως από βοοειδή και τα S από πρόβατα, αυτή η διάκριση δεν είναι απόλυτη, ιδίως για τα στελέχη C και σε μικρότερο βαθμό για τα S (Whittington *et al.*, 2011; Verdugo *et al.*, 2014). Στο πρόβατο τα στελέχη C προκαλούν κατά κύριο λόγο εστιακές αλλοιώσεις, ενώ τα στελέχη S προκαλούν πολλαπλές αλλοιώσεις, εστιακές ή διάχυτες (Verna *et al.*, 2007). Τα συγκεκριμένα στελέχη (C) σχετίζονται στο πρόβατο με βαρύτερη ιστολογική εικόνα, αν και έχουν μεγαλύτερη τάση αυτοΐασης συγκριτικά με τα στελέχη S. Αυτό ίσως να υποδηλώνει ότι τα στελέχη C είναι περισσότερο παθογόνα από τα S για το πρόβατο αλλά προκαλούν μικρότερου βαθμού ανοσοποιητική απορρύθμιση. Αυτό ακριβώς αναδεικνύεται από το γεγονός ότι τα στελέχη C επάγουν υψηλότερη και μεγαλύτερης διάρκειας αύξηση της συγκέντρωσης της IFN-γ. Βάσει των παραπάνω προκύπτει ότι πιθανώς η επικράτηση των στελεχών S στο πρόβατο δεν οφείλεται τόσο στη μεγαλύτερη διάδοσή τους, αλλά στο γεγονός ότι προκαλούν περισσότερο επίμονη λοίμωξη συγκριτικά με τα στελέχη τύπου C (Stewart *et al.*, 2004; Verna *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2014).

Φαίνεται επίσης ότι ενδεχομένως το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα MAP επηρεάζει την έκβαση της λοίμωξης. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι πρόβατα που εκτίθενται πειραματικά στο συγκεκριμένο παθογόνο μετά από μείωση της λοιμογόνου δύναμής του μέσω διόδων, αποβάλλουν το βακτήριο για πολύ μικρότερο διάστημα χωρίς να αυξάνεται η παραγωγή IFN-γ και η πιθανότητα πρόκλησης ενεργής νόσου, συγκριτικά με αυτά που εκτίθενται σε αρκετά μικρότερο αριθμό βακτηρίων που όμως βρίσκονται ομογενοποιημένα μέσα σε εντερικό ιστό (Stewart *et al.*, 2004; Begg *et al.*, 2005; Verna *et al.*, 2007; Kawaji *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2015).

3.3.4. Η ευαισθησία του ξενιστή

Η ευαισθησία του ξενιστή σε επίπεδο ατόμου, καθορίζει την εξέλιξη της ανοσοποιητικής απόκρισης, εάν δηλαδή θα συνεχιστεί επαρκώς η Th1 κυτταρική αντίδραση ή θα επέλθει πρώιμα καταστολή της, και θα επικρατήσει τελικά η Th2.

Τα γονίδια που συμβάλλουν κυρίως στην ανοσιακή ανταπόκριση που έπεται της λοίμωξης από MAP είναι τα εξής: *Solute Carrier Family 11 Member 1 (SLC11A1), Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2 (NOD2), Interferon Gamma (IFN-γ), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 10 (IL-10), Tumor Necrosis Factor (TNF), Toll Like Receptor 2 (TLR2), Toll-Like Receptor 4 (TLR4), Toll Like Receptor 9 (TLR9), Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFB1), Insulin (INS), Vitamin D Receptor (VDR), Mannose Binding Lectin 2 (MBL2), Major Histocompatibility Complex (MHC).*

Ορισμένα από αυτά τα γονίδια αναλύονται παρακάτω:

i. *NOD2* ή παλαιότερα γνωστό ως *CARD15 (Caspase recruitment domain family member 15).* Εκφράζεται κυρίως στα μονοκύτταρα και στα επιθηλιακά κύτταρα (Gutierrez *et al.*, 2002). Ανήκει στους Toll υποδοχείς και έχει τη δυνατότητα αναγνώρισης του μυραμιλικού οξέος, μίας πεπτιδογλυκάνης του μυκοβακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, με το οποίο συνδέεται ενεργοποιώντας προφλεγμονώδη αντίδραση (Lakatos *et al.,* 2006; Kufer *et al.,* 2006). Πολυμορφισμοί στο γονίδιο *CARD15*, το οποίο επηρεάζει τη λειτουργική δραστηριότητα των μακροφάγων, συνδέθηκαν με ανθεκτικότητα στην εκδήλωσή της παραφυματίωσης (Brant *et al.,* 2003, 2007; Bernstein *et al.,* 2007).

ii. *SLC11A1* ή παλαιότερα γνωστό ως *NRAMP1 (Natural resistance associated macrophage protein gene 1).* Εκφράζεται αποκλειστικά σε μακροφάγα, πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα και στους νευρώνες (Cellier *et al.,* 1994). Στο συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιείται η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ιόντων σιδήρου στα φαγοσώματα. Επισημαίνεται ότι η συγκέντρωση σιδήρου έχει πλειοτροπική δράση στην πρώιμη έκφραση των μακροφάγων έναντι της ενδοκυτταρικής μικροβιακής ανάπτυξης (Alter-Koltunoff *et al.,* 2008). Το *SLC11A1* δρα περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων με την επαγωγή της έκφρασης των μορίων του *MHC II (Major histocompatibility complex class II)*, κυτταροκινών και χυμοκινών (Bayele *et al.,* 2007).

iii. *MBL2.* Εκφράζεται σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και σε ορισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα (Alagarasu *et al.,* 2007). Στο γονίδιο *MBL2* κωδικοποιείται η πρωτεΐνη που δρα ως υποδοχέας της μαννόζης (Selvaraj *et al.,* 2000). Ο υποδοχέας αυτός συμβάλλει στην αναγνώριση δομικών πρωτεϊνών του πλάσματος του αίματος και παράγεται από τα ηπατικά κύτταρα συμμετέχοντας στην ανοσοποιητική απόκριση (Alagarasu *et al.,* 2007). Μετά από πρόσδεση του υποδοχέα MBL2 σε συγκεκριμένες δομές υδατανθράκων, οι οποίες συναντώνται σε πολλά παθογόνα στελέχη συμπεριλαμβανομένου και του MAP, διεγείρεται η φαγοκυττάρωση και η παραγωγή κυτταροκινών (Petersen *et al.,* 2001). Σε ότι αφορά τη φυματίωση και την παραφυματίωση, φαίνεται να επιβεβαιώνεται ότι τα υψηλά επίπεδα MBL σχετίζονται άμεσα με την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου (Garred *et al.,* 1997; Bellamy *et al.,* 1998).

iv. *TLR (Toll-like Receptor).* Ομάδα γονιδίων στα οποία κωδικοποιούνται οι πρωτεΐνες αναγνώρισης αντιγονικών προτύπων παθογόνων μικροβίων, με αποτέλεσμα τη φαγοκυττάρωσή τους (Takeda *et al.,* 2003). Συγκεκριμένα οι TLR 1, 4 και 6 συμβάλλουν στην κυτταρική αναγνώριση των μυκοβακτηρίων μέσω της πρόσδεσής τους στο κυτταρικό τοίχωμα (Quesniaux *et al.,* 2004; Delbridge and O'Riordan, 2007; Jo *et al.,* 2007). Η TLR2 συμβάλει κυρίως στην άμεση αναγνώριση παθογόνων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του MAP, στο έντερο (Taylor *et al.,* 2008; Weiss *et al.,* 2008; Purdie *et al.,* 2011).

v. *VDR.* Γονίδιο στο οποίο κωδικοποιείται μία πρωτεΐνη που δρα ως υποδοχέας της βιταμίνης D (Wilkinson *et al.,* 2000), ο οποίος επάγει την αντιμικροβιακή και ανοσοποιητική απόκριση που ενεργοποιούν οι *TLRs* (Liu *et al.,* 2006). Η ενεργός μορφή της βιταμίνης D (1,25 dihydroxyvitamin D3), η οποία δρα και ως ανοσορρυθμιστική ορμόνη, ενεργοποιεί μακροφάγα και περιορίζει σε μεγάλο βαθμό την ενδοκυττάρια ανάπτυξη των *M. tuberculosis* και MAP (Rockett *et al.,* 1998; Dukkipati, 2007).

vi. *MHC.* Ομάδα γονιδίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Sohal *et al.,* 2008) και συμβάλλουν στην αντιγονοπαρουσίαση στα Τ-λεμφοκύτταρα. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο *MHC*, έχουν συνδεθεί με ευαισθησία σε πολλές λοιμώξεις και σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την ενεργοποίηση της Th1/Th2 ανοσοποιητικής απόκρισης του οργανισμού (Brett *et al.,* 1992; Dukkipati *et al.,* 2010), ενώ συνδέονται και με την εκδήλωση των χαρακτηριστικών κλινικών συμπτωμάτων της νόσου του Johne (Reddacliff *et al.*, 2005).

4. MAP ΚΑΙ ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ CROHN

Το MAP δεν θεωρείται επισήμως ως παθογόνο για τον άνθρωπο, αλλά υπάρχουν πολλά δεδομένα βάσει των οποίων θεωρείται πιθανό ότι εμπλέκεται στην πρόκληση της νόσου του Crohn του ανθρώπου, τουλάχιστον για ορισμένες ομάδες ασθενών (Naser *et al.*, 2014; Waddell *et al.*, 2015). Η πιθανή σχέση μεταξύ της νόσου του Crohn και του MAP έχει καταστεί σημαντικό ζήτημα για τη παγκόσμια γαλακτοβιομηχανία, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο παθογόνο ανιχνεύεται συχνά, ακόμα και σε βιώσιμη μορφή, σε πολλά είδη γαλακτοκομικών προϊόντων (Millar *et al.*, 1996; Spahr and Schafroth, 2001; Ellingson *et al*, 2005; Williams and Withers, 2010), στο κρέας (Grant, 2006; Mutharia *et al.*, 2010; Whittington *et al.*, 2010), και στο νερό (Gill *et al.*, 2011).

Παρά τη διαρκή αντιπαράθεση σχετικά με τη συμβολή του MAP στην αιτιολογία της νόσου του Crohn (BANR, 2003), σε πολλές χώρες όπως στην Αυστραλία, στη Δανία, στην Ολλανδία και στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν ήδη καθιερωθεί εθνικά προγράμματα ελέγχου, επιβεβαιώνοντας την κρισιμότητα της εξάλειψης του συγκεκριμένου μικροβίου από τα τρόφιμα, με σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας (Waddell *et al.*, 2015). Μέσω πιο πρόσφατων δεδομένων, η έκθεση του ανθρώπου στο MAP θεωρείται πιθανό ότι εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια ή στην εξέλιξη και άλλων νοσημάτων εκτός της νόσου του Crohn, και συγκεκριμένα του HIV, της σκλήρυνσης κατά πλάκας, του συνδρόμου Blau, της σαρκοείδωσης, του αυτισμού, του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 και 2, της ελκώδους κολίτιδας, του καρκίνου του παχέος εντέρου, της θυρεοειδίτιδας Hashimoto και της νόσου του Parkinson (Sechi *et al.*, 2008; Paccagnini *et al.*, 2009; Dow and Ellingson, 2010; Pierce, 2010; Sisto *et al.*, 2010; Cossu *et al.*, 2013; Waddel *et al.*, 2015; Arru *et al.*, 2016; Niegowska *et al.*, 2017; Thirunavukkarasu *et al.*, 2017; Pierce, 2018).

Ένα ακόμη σημαντικό δεδομένο που αναδεικνύει ενδεχομένως την εξέλιξη σχετικά με τη συσχέτιση της έκθεσης στο MAP και της αιτιοπαθογένειας της νόσου του Crohn, είναι ο ανάπτυξη εμβολίου που προορίζεται για την ανοσοποίηση του ανθρώπου ενάντια στη νόσο. Το συγκεκριμένο έχει ήδη δοκιμαστεί σε βοοειδή (Bull *et al.*, 2014) και σε ποντίκια (Rathnaiah *et al.*, 2017), και βρίσκεται στο στάδιο της πειραματικής εφαρμογής του στον άνθρωπο (http://www.crohnsmapvaccine.com, 2016).

Όσον αφορά την παθογένεια του MAP, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων διενήργησε εμπεριστατωμένη μελέτη, το συμπέρασμα της οποίας είναι ότι το MAP είναι επιλέξιμο για να περιληφθεί στην κατηγορία παθογόνων που απαιτούν την παρέμβαση της Ευρωπαϊκής Ένωσης, βάσει του άρθρου N5 παράγραφος 3 του Νόμου για την υγεία των ζώων (EFSA AHAW Panel, 2017; Rathnaiah *et al.*, 2017). Διάφορα είδη θηλαστικών και πτηνών καταγράφηκαν ως ευπαθή, αν και δεν υπήρξε συναίνεση για τον ζωονοτικό κίνδυνο του MAP στο πλαίσιο ασθενειών του ανθρώπου (Rathnaiah *et al.*, 2017).

5. ΜΕΤΡΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Δεδομένου ότι η θεραπευτική αγωγή σε ζώα με παραφυματίωση δεν είναι δόκιμη, λόγω κόστους, αλλά και επειδή αυτά καθίστανται φορείς (Gwozdz *et al.*, 2000; Fecteau and Whitlock, 2011), η εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων πρόληψης θεωρείται κομβικής σημασίας για τον έλεγχο της νόσου (Nielsen and Toft, 2011; Carter, 2012). Σε αυτό το πλαίσιο προτείνονται συγκεκριμένα μέτρα διαχείρισης της εκτροφής και των ζώων, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις συνδυάζονται με τον εμβολιασμό τους. Τα μέτρα διαχείρισης που ενδείκνυνται για τον έλεγχο της παραφυματίωσης αναλύονται παρακάτω, βάσει της υγειονομικής κατάστασης της εκτροφής:

5.1. ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΠΑΛΛΑΓΜΕΝΗ ΑΠΌ ΤΗ ΝΟΣΟ

Για να θεωρηθεί μία εκτροφή απαλλαγμένη από παραφυματίωση, προϋπόθεση είναι να υπάρχει ένα αξιόπιστο σύστημα τακτικού ελέγχου των ζώων και βάσει αυτού, να μην έχει καταγραφεί μόλυνση από MAP για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ίδιο καθεστώς (εκτροφή απαλλαγμένη) αναγνωρίζεται επίσης στην περίπτωση που έχει καταγραφεί μόλυνση από MAP, αλλά εφαρμόσθηκε έλεγχος και θανάτωση των θετικών ζώων, εντατική παρακολούθηση της εκτροφής με τακτικό επανέλεγχο, χωρίς να έχει διαπιστωθεί νέο περιστατικό για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 2 ετών (IAP, 2017).

Στην περίπτωση εκτροφών που εμπίπτουν στο παραπάνω υγειονομικό καθεστώς, ενδείκνυνται μέτρα ελέγχου για την αποτροπή της εισαγωγής της μόλυνσης. Αυτά τα μέτρα εστιάζονται στην εφαρμογή κλειστού συστήματος εκτροφής, στο πλαίσιο της οποίας η ανανέωση του ζωικού κεφαλαίου γίνεται είτε εσωτερικά (τεχνητή σπερματέγχυση με τη χρήση κατάλληλα επιλεγμένου σπέρματος), είτε με την εισαγωγή ζώων που προέρχονται από ελεγμένες και απαλλαγμένες από MAP εκτροφές (Goodger *et al.*, 1996). Η βόσκηση θα πρέπει να γίνεται σε περιοχές γνωστού υγειονομικού καθεστώτος, να αποφεύγεται η λίπανση του εδάφους με κοπριά προερχόμενη από τα ζώα που πιθανώς έχουν μολυνθεί από MAP, και να αποφεύγεται ο συγχρωτισμός τους με ζώα αγνώστου υγειονομικού καθεστώτος (Kovich *et al.*, 2006). Το προσωπικό της εκτροφής θα πρέπει να είναι ενημερωμένο και εκπαιδευμένο για την εφαρμογή των μέτρων αυτών και την αποφυγή της παθητικής μεταφοράς του βακτηρίου μέσω υποδημάτων, μηχανημάτων, αυτοκινήτων κ.τ.λ., στην εκτροφή.

5.2. ΕΚΤΡΟΦΗ ΜΗ ΑΠΑΛΛΑΓΜΕΝΗ ΑΠΌ ΤΗ ΝΟΣΟ

Μια εκτροφή στην οποία διαπιστώνονται βάσει εργαστηριακής διερεύνησης περιστατικά παραφυματίωσης, θεωρείται θετική - μη απαλλαγμένη από τη νόσο. Στην περίπτωση που ο επιπολασμός της παραφυματίωσης σε μια εκτροφή είναι σταθερά σε χαμηλό επίπεδο βάσει τακτικού ελέγχου, θεωρείται ότι η νόσος έχει εκριζωθεί, χωρίς όμως η εκτροφή να αναγνωρίζεται ως απαλλαγμένη (MacDiarmid, 1988; Martin *et al.*, 1992; More *et al.*, 2013).

Στην περίπτωση εκτροφών που ανήκουν στο υγειονομικό καθεστώς που περιγράφεται παραπάνω, εφαρμόζονται μέτρα με σκοπό τον περιορισμό της διάδοσής του MAP και την αποφυγή νέων μολύνσεων. Αυτά τα μέτρα περιλαμβάνουν την απομόνωση της μολυσμένης εκτροφής και την εφαρμογή ενός ήπιου προγράμματος ελέγχου και απομάκρυνσης των θετικών ζώων, ή ενός πιο επιθετικού προγράμματος, που περιλαμβάνει τη θανάτωση όλων των θετικών ζώων και των απογόνων τους.

Στην εκτροφή θα πρέπει να γίνεται τακτικά αποκομιδή της κόπρου και απολύμανση όλων των χώρων, ενώ είναι σημαντικός και ο διαχωρισμός των ζώων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίτοκα ζώα χωρίζονται από τα υπόλοιπα, και τα νεογνά από τα ενήλικα αμέσως μετά τη γέννησή τους, και λαμβάνουν μόνο παστεριωμένο πρωτόγαλα και γάλα. Τα ενήλικα ζώα δεν πρέπει να βόσκουν μαζί με τα νεαρά ούτε να έχουν πρόσβαση στα σημεία παράθεσης νερού, τροφής και ενσταβλισμού των νεαρών ζώων ηλικίας κάτω των 14 μηνών.

5.3. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Ο εμβολιασμός κατά της παραφυματίωσης δεν αποτρέπει τη μόλυνση, αλλά μειώνει σημαντικά την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων (Stringer *et al.*, 2013), τον αποικισμό των ιστών από το MAP (Sweeney *et al.*, 2009), την αποβολή του μέσω των κοπράνων (Kalis *et al.*, 2001; Reddacliff *et al.*, 2006; Faisal *et al.*, 2013; Bastida and Juste, 2011; Windsor, 2014), και κατά συνέπεια μειώνει την διάδοση του MAP (Knust *et al.*, 2013) και την απώλεια ζωικού προϊόντος (Singh *et al.*, 2007) και κεφαλαίου (Van Schaik *et al.*, 1996; Juste and Perez, 2011).

Τα επιχειρήματα κατά του εμβολιασμού των αιγοπροβάτων βασίζονται σε θέματα σχετικά με την ασφάλειά του για τα ζώα αλλά και για τον χειριστή του, καθώς επίσης τον κίνδυνο διασταυρούμενης αντίδρασης κατά την εφαρμογή μέτρων ελέγχου της φυματίωσης. Σχετικές μελέτες διεξήχθησαν για το εμβόλιο Gudair™ (Windsor and Eppleston, 2006; Eppleston and Windsor, 2007). Ως παρενέργεια αναφέρεται ότι η εξέταση των ιστών κατά τη νεκροψία προβάτων που είχαν εμβολιαστεί ενδομυϊκά μία εβδομάδα πριν με το συγκεκριμένο εμβόλιο (Gudair™), ανέδειξε εκτεταμένη νέκρωση του μυϊκού ιστού σε ακτίνα 10 εκατοστών γύρω από το σημείο έγχυσής του (Windsor, 2014). Αναφορικά με τον άνθρωπο, τυχαία έκθεση στο εμβόλιο Gudair™ επιβάλει ιατρική παρέμβαση και εκτεταμένη χειρουργική απομάκρυνση του ιστού ώστε να περιοριστεί η νέκρωση (Richardson *et al.*, 2005; Windsor *et al.*, 2005).

Σήμερα, υπάρχουν τέσσερα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια κατά της παραφυματίωσης των αιγοπροβάτων παγκοσμίως, τα βασικά χαρακτηριστικά των οποίων αναφέρονται στον Πίνακα 1 (Bastida and Juste, 2011; Gupta *et al.*, 2016; EFSA AHAW Panel, 2017).

Πίνακας 1. Τα κυριότερα εμβόλια που διατίθενται σήμερα για τον έλεγχο της παραφυματίωσης των αιγοπροβάτων και τα βασικά χαρακτηριστικά τους (Bastida and Juste, 2011; Gupta *et al.*, 2016; EFSA AHAW Panel, 2017).

Εμπορική Ονομασία	**Τύπος**	**Ενδείκνυται**	**Αποτέλεσμα**	**Διάκριση εμβολιασμένων από φυσικά μολυσμένα ζώα (DIVA)***
Mycopar®	Νεκρό S18	Πρόβατο	Μείωση 75.31% των ιστολογικών αλλοιώσεων (Thonney and Smith, 2005).	Δεν είναι δυνατή με ELISA. Είναι δυνατή με τη συγκριτική δοκιμή του φυματινισμού.
Gudair™	Νεκρό S316F	Πρόβατο	Μείωση έως 91.25% των κλινικών περιστατικών (Reddacliff *et al.*, 2006). Μείωση έως 90% της αποβολής του MAP (Eppleston *et al.*, 2004).	Δεν υπάρχουν δεδομένα.

		Αίγα	Μείωση έως 100% των ιστολογικών αλλοιώσεων (Reyes *et al.*, 2002). Μείωση 52.38% της αποβολής του MAP (Singh *et al.*, 2007). Μείωση έως 65.88% των ιστολογικών αλλοιώσεων (Corpa *et al.*, 2000).	Δεν είναι δυνατή με τη δοκιμή IFN-γ. Δεν είναι δυνατή με ορολογικές δοκιμές.
Neoparasec®	Ζωντανό S316F	Πρόβατο	Μείωση 71.43% των κλινικών περιστατικών (Gwozdz *et al.*, 2000). Μείωση έως 66.67% της αποβολής του MAP (Gwozdz *et al.*, 2000). Μείωση έως 82.27% των ιστολογικών αλλοιώσεων (Sommerville *et al.*, 1995).	Δεν είναι δυνατή με τη δερματική δοκιμή.

		Αίγα	Μείωση έως 73.08% της αποβολής του MAP (Marly *et al.*, 1988).	Δεν υπάρχουν δεδομένα.
Lio-Johne®	Ζωντανό S316F	Πρόβατο	Μείωση έως 78.29% των κλινικών περιστατικών (Aduriz, 1993). Μείωση 80.01% της αποβολής του MAP (Aduriz, 1993). Μείωση έως 100% των ιστολογικών αλλοιώσεων (Aduriz, 1993).	Δεν υπάρχουν δεδομένα.

*DIVA: Differentiating Infected from Vaccinated Animals.

6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η τεκμηρίωση της διάγνωσης της παραφυματίωσης στο πρόβατο γίνεται με τη νεκροτομική εξέταση του ζώου (*post-mortem*) και την ανάδειξη των χαρακτηριστικών παθολογοανατομικών αλλοιώσεων στο έντερο και στους επιχώριους λεμφαδένες (Windsor, 2014). Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με την ανάδειξη της παρουσίας του MAP αρχικά μέσω της χρώσης Ziehl-Neelsen, και ακολούθως με ιστοκαλλιέργεια και PCR (Pérez *et al.*, 1996, 1997; Corpa *et al.*, 2000; Begg and Whittington, 2010). Η διαγνωστική διερεύνηση περιστατικών παραφυματίωσης πριν τη σφαγή (*ante-mortem*) περιλαμβάνει ορολογικές δοκιμές για την ανίχνευση αντισωμάτων (ELISA, AGID, CFT, δοκιμή της IFN-γ, DTH), καλλιέργεια σε δείγματα κοπράνων, και μοριακή ανάλυση μέσω συμβατικής PCR και real time PCR (Real time PCR) για την ανάδειξη της παρουσίας στα κόπρανα ή στους ιστούς DNA του MAP (Begg and Whittington, 2010).

Σε σχέση με την εφαρμογή ορολογικών μεθόδων διάγνωσης της νόσου, πρέπει να σημειωθεί ότι η αξιοπιστία τους επηρεάζεται από το στάδιο της μόλυνσης και τη μέθοδο εκτίμησης του αποτελέσματος τους (Nielsen and Toft, 2008; Begg and Whittington, 2010). Επισημαίνεται ότι η επικύρωση αυτών των διαγνωστικών τεχνικών με τον προσδιορισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας τους έναντι της μεθόδου αναφοράς, που είναι η καλλιέργεια ιστών ή κοπράνων, δεν έχει γίνει με τρόπο που να τεκμηριώνει της αξιοπιστία τους (Nielsen and Toft, 2008). Όμως το αποτέλεσμα και των άμεσων μεθόδων διάγνωσης επηρεάζεται σημαντικά από το στάδιο της νόσου, δεδομένου ότι η αποβολή του MAP στα κόπρανα είναι διαλείπουσα. Αυτό έχει αρνητική επίπτωση στην ευαισθησία αυτών των μεθόδων με τρόπο αντιστρόφως ανάλογο προς το ελάχιστο όριο ανίχνευσης που τις χαρακτηρίζει (Whittington *et al.*, 2017). Συνεπώς η ανίχνευση προβάτων θετικών στην παραφυματίωση είναι με αύξουσα σειρά περισσότερο πιθανή με τη χρήση ELISA, την καλλιέργεια κοπράνων και την PCR, ενώ η χρώση Ziehl-Neelsen, η AGID και η CFT δεν προτείνονται λόγω της χαμηλής τους ευαισθησίας ή/και ειδικότητας (IAP, 2017).

6.1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

Αναλυτικά παρουσιάζονται οι διαγνωστικές μέθοδοι και τα χαρακτηριστικά τους αναφορικά με την ευαισθησία και την ειδικότητα αλλά και τον καταλληλότερο χρόνο εφαρμογής τους (Πίνακας 2).

6.1.1. Καλλιέργεια MAP

Η καλλιέργεια κοπράνων έχει ελάχιστο όριο ανίχνευσης 100 MAP/gr δείγματος, ποσότητα η οποία αποβάλλεται από το ζώο σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, ενώ σε πρότερο στάδιο η δυνατότητα ανίχνευσης του παθογόνου με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι χαμηλή (Whitlock and Buergelt, 1996; Whittington *et al.*, 2010, 2017). Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής σε κλινικά μολυσμένα πρόβατα είναι 16% (2-48, 95% CI-confidence intervals) και η ειδικότητα 97% (95-99, 95% CI), ενώ σε κλινικά μολυσμένες αίγες είναι 8% (2-17, 95% CI) και 98% (95-100, 95% CI) αντίστοιχα (Kostoulas *et al.*, 2006; Nielsen and Toft, 2008; EFSA AHAW Panel, 2017). Η ιστοκαλλιέργεια συγκριτικά με την καλλιέργεια κοπράνων έχει υψηλότερη ευαισθησία (Whittington *et al.*, 2017).

Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι για την *in vitro* απομόνωση και ταυτοποίηση του MAP, η διάρκεια επώασης των θρεπτικών υποστρωμάτων διαρκεί πολλούς μήνες (Harris and Barletta, 2001; Collins, 2011).

6.1.2. Χρώση Ziehl-Neelsen

Αποτελεί μια απλή, γρήγορη και οικονομική προκαταρκτική μέθοδο ανίχνευσης του MAP, αλλά έχει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα, εξαιτίας αδυναμίας διάκρισης του MAP από τα άλλα μυκοβακτήρια (OIE, 2014).

6.1.3. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής στο πρόβατο είναι 37% (10-80, 95% CI) και η ειδικότητα 97% (93-99, 95% CI), και στην αίγα 63% (42-93, 95% CI) και 95% (90-98, 95% CI) αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις τα μεγαλύτερα ποσοστά αφορούν ζώα σε προχωρημένο στάδιο κλινικής νόσου (Juste *et al.*, 2005; Kostoulas *et al.*, 2006; Sohal *et al.*, 2007; Bastida and Juste, 2011; EFSA AHAW Panel, 2017; Whittington *et al.*, 2017).

6.1.4. AGID (Agar gel immunodiffusion)

Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής σε πρόβατα με κλινική νόσο είναι 13.8% (8.8-20.3, 95% CI) και σε αίγες 39.5% (30.9-48.7, 95% CI). Και στις δυο περιπτώσεις η ειδικότητα της μεθόδου είναι 100% (99.7-100, 95% CI). Η AGID χρησιμοποιείται κυρίως ως μέθοδος επιβεβαίωσης της διάγνωσης (Hope *et al.*, 2000; OIE, 2014; Singh *et al.*, 2014; EFSA AHAW Panel, 2017).

6.1.5. Δοκιμή της IFN-γ

Υπάρχουν λίγες αναφορές σχετικά με την αξιολόγηση της δοκιμής της IFN-γ (Stabel and Whitlock, 2001; Nielsen and Toft, 2008). Στο υποκλινικό στάδιο της νόσου. Ωστόσο, η ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου είναι υψηλότερη συγκριτικά με άλλες ορολογικές δοκιμές, και για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιείται σε πολλές περιπτώσεις για την ανίχνευση φορέων του MAP (Gwozdz *et al.*, 2000; Jungersen *et al.*, 2012; de Silva *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014).

Το αποτέλεσμα της δοκιμής της IFN επηρεάζεται σημαντικά από έναν υψηλό αριθμό παραγόντων σχετικών με τον τρόπο διεξαγωγής της, και προϋποθέτει προηγούμενη μελέτη για τον καθορισμό των θετικών και αρνητικών ορίων βάσει των οποίων προσδιορίζεται η ανάλυση των δειγμάτων (Timms *et al.*, 2011).

6.1.6. DTH (Delayed-type hypersensitivity)

Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως για τη διάγνωση της παραφυματίωσης στο αρχικό στάδιο της νόσου, με μέση ευαισθησία και ειδικότητα, λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα συγγενή παθογόνα. Μειονέκτημα θεωρείται επίσης το γεγονός ότι δεν υπάρχει ευρεία συναίνεση για τα όρια που πρέπει να ισχύουν αναφορικά με τον προσδιορισμό του αποτελέσματος της δερματικής αντίδρασης (OIE, 2014; Singh *et al.*, 2014; EFSA AHAW Panel, 2017).

6.1.7. PCR (Polymerase chain reaction)

Η μοριακή ανίχνευση του MAP διενεργείται μέσω μεθόδων συμβατικής PCR ή real time PCR που στις περισσότερες περιπτώσεις ενισχύουν επιλεγμένα τμήματα της περιοχής ένθεσης *IS900,* η οποία θεωρείται ειδική για το συγκεκριμένο παθογόνο (Garrido *et al*., 2000; Bhide *et al*., 2006; Coelho *et al*., 2008, 2017). Επιπροσθέτως προτείνεται η χρήση της γενετικής περιοχής f57 (Timms *et al*., 2011; OIE, 2014). Το βασικό πλεονέκτημα της μοριακής ανίχνευσης του MAP, δεδομένου του πολύ χαμηλού ελαχίστου ορίου ανίχνευσης που τη διακρίνει και της υψηλής ειδικότητάς της, είναι το γεγονός ότι ολοκληρώνεται εντός μόλις 2 ωρών. Επισημαίνεται ωστόσο ότι η αξιόπιστη εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου προϋποθέτει την εφαρμογή αυστηρών μέτρων ποιοτικού ελέγχου (EPA, 2004; van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Πίνακας 2. Οι κυριότερες μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της παραφυματίωσης του προβάτου και τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους (ευαισθησία, ειδικότητα, στάδιο ανίχνευσης).

Δοκιμή	**Στάδιο ανίχνευσης**	**Ευαισθησία**	**Ειδικότητα**
AGID	Τελικό	Χαμηλή-Μέση	Υψηλή
DTH	Αρχικό και μέσο	Μέση-Υψηλή	Υψηλή
ELISA	Μέσο και τελικό	Χαμηλή-Υψηλή*	Υψηλή
IFN-γ	Αρχικό και μέσο	ΔΔ**	ΔΔ**
PCR	Όλα	Μέση-Υψηλή	Υψηλή
Ziehl-Neelsen	Μέσο και τελικό	Χαμηλή	Χαμηλή-Μέση
Ιστοπαθολογία	Μέσο και τελικό	Μέση-Υψηλή	Υψηλή
Καλλιέργεια ιστών	Μέσο και τελικό	Υψηλή	Υψηλή
Καλλιέργεια κοπράνων	Μέσο και τελικό	Χαμηλή-Υψηλή*	Υψηλή
Κλινικά συμπτώματα	Τελικό	Χαμηλή-Μέση	Χαμηλή-Μέση

* Υψηλή ευαισθησία στο τελικό στάδιο της νόσου

** Δίχως δεδομένα

Δ. ΣΚΟΠΟΣ

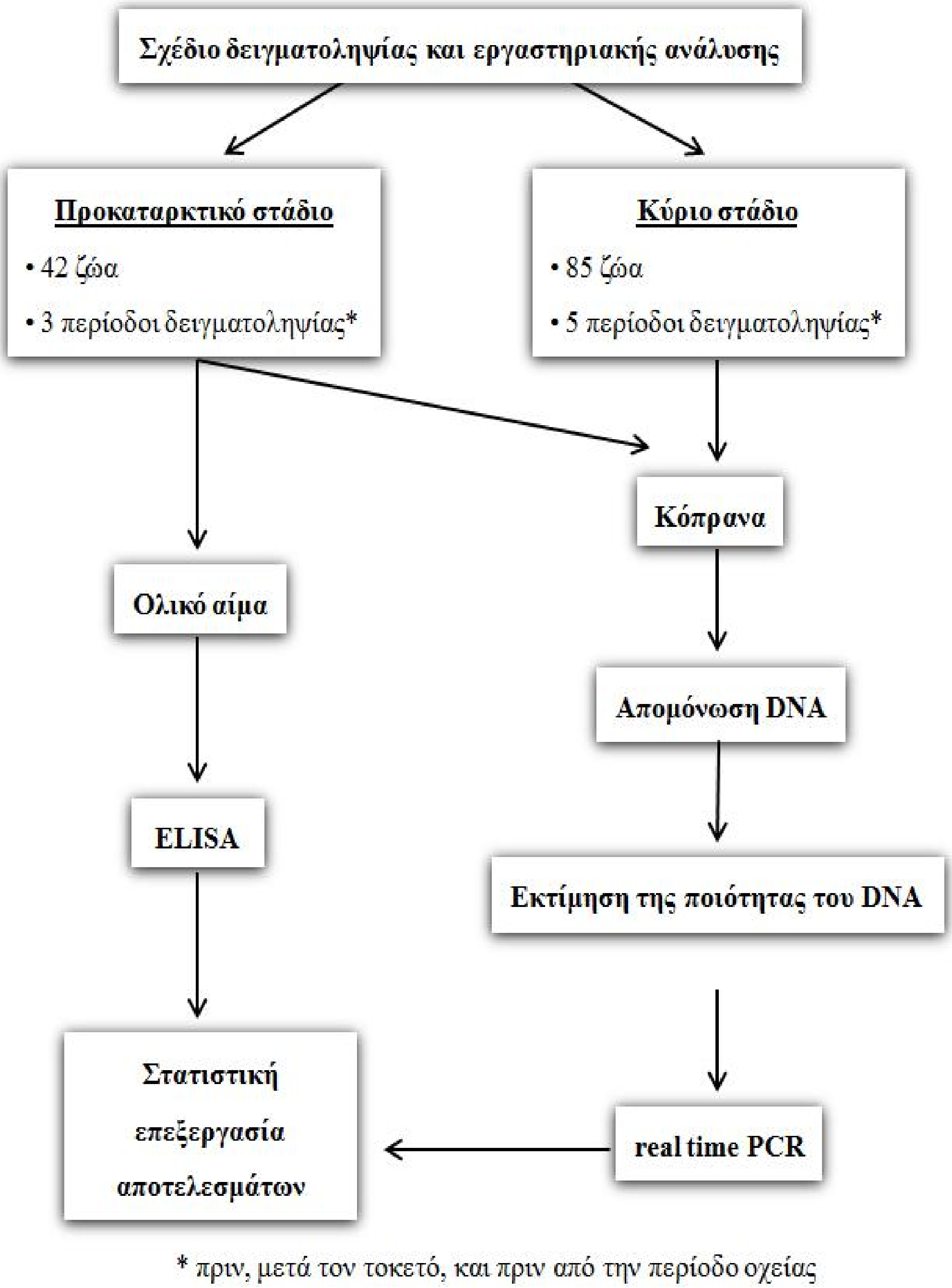
Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της μεταβολής της θετικότητας συγκεκριμένων εργαστηριακών δεικτών, σε πρόβατα με υποκλινική παραφυματίωση, σε σχέση με τον τοκετό.

Ε. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΡΙΓΡΑΜΜΑ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

Η παρούσα μελέτη διενεργήθηκε σε δυο στάδια, το προκαταρτικό και το κύριο (P: προκαταρκτικό, F: τελικό). Ακολούθως παρουσιάζεται σχηματικά το περίγραμμα της εργαστηριακής ανάλυσης των δειγμάτων (Σχήμα 1).

Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της εργαστηριακής διαδικασίας ανάλυσης των δειγμάτων.



2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για αμφότερα στάδια της μελέτης έγινε συλλογή δειγμάτων κοπράνων (συνολικά n=506, n=120 κατά το προκαταρτικό και n=386 κατά το κύριο) από ενήλικα (<2 ετών), θηλυκά ζώα της φυλής Χίου (συνολικά n=86, n=42 κατά το προκαταρτικό και n=85 κατά το κύριο), του ποιμνίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά το προκαταρτικό στάδιο της μελέτης συλλέχθηκαν επιπροσθέτως, δείγματα ολικού αίματος (n=120).

Το ποίμνιο από το οποίο έγινε η δειγματοληψία διατηρείται υπό συνθήκες κλειστής εκτροφής, δίχως τη δυνατότητα εισόδου άλλων οικόσιτων ή άγριων ζώων, και θεωρείται βάσει προηγούμενων μελετών θετικό στην παραφυματίωση, χωρίς όμως ιστορικό κλινικής νόσου (Liandris *et al.*, 2009; Taka *et al.*, 2013).

Οι περίοδοι δειγματοληψίας, η χρονική τους διάρκεια, ο αριθμός και το είδος των δειγμάτων που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται στους πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3. Το σχέδιο δειγματοληψίας που αποτελείται από τα στάδια της ανάλυσης (P: προκαταρκτικό, F: τελικό), τις περιόδους δειγματοληψίας (P1-5) και τον συνολικό αριθμό των ζώων που ελέγχθηκαν.

Προκαταρκτικό στάδιο ανάλυσης: Οκτώβριος 2014 - Ιούνιος 2015			
Περίοδοι	**PP1**	**PP2**	**PP3**
Χρονικά στάδια δειγματοληψίας	Οκτώβριος-Νοέμβριος 2014 1-3 εβδομάδες προ του τοκετού	Δεκέμβριος 2014-Ιανουάριος 2015 2-15 ημέρες μετά τον τοκετό	Μάιος-Ιούνιος 2015 Πριν από την περίοδο οχείας
Αριθμός ζώων	36	42	42

Κύριο στάδιο ανάλυσης: Δεκέμβριος 2016 - Ιούλιος 2017					
Περίοδοι	**FP1**	**FP2**	**FP3**	**FP4**	**FP5**
Χρονικά στάδια δειγματοληψίας	Δεκέμβριος 2016 4-15 ημέρες προ του τοκετού	Δεκέμβριος 2016 1-3 ημέρες προ του τοκετού	Δεκέμβριος 2016 - Ιανουάριος 2017 0-3 ημέρες μετά τον τοκετό	Ιανουάριος 2017 4-15 ημέρες μετά τον τοκετό	Ιούνιος-Ιούλιος 2017 Πριν από την περίοδο οχείας
Αριθμός ζώων	60	81	85	85	75

Πίνακας 4. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ανά ζώο σε καθένα από τα στάδια της ανάλυσης και τις περιόδους τους.

Α/Α Ζώου	**Προκαταρκτικό στάδιο**			**Κύριο στάδιο**				
	PP1	**PP2**	**PP3**	**FP1**	**FP2**	**FP3**	**FP4**	**FP5**
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	+	+	+	+	+
17	-	-	-	+	+	+	+	+
18	-	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	-	+	+	+	+
21	-	-	-	-	+	+	+	+

22	-	-	-	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	-	+	+	+	+	+
25	-	-	-	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	-
27	-	-	-	-	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	-
29	-	-	-	+	+	+	+	+
30	-	+	+	+	+	+	+	-
31	+	+	+	+	+	+	+	+
32	-	-	-	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	-	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+
38	-	+	+	-	+	+	+	+
39	-	-	-	+	+	+	+	-
40	-	-	-	+	+	+	+	+
41	-	-	-	+	+	+	+	-
42	-	-	-	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	+	+	-	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+
46	+	+	+	-	-	-	-	-

47	+	+	+	+	-	+	+	+
48	-	-	-	+	+	+	+	+
49	-	+	+	-	+	+	+	+
50	-	-	-	-	+	+	+	+
51	+	+	+	-	+	+	+	+
52	+	+	+	-	+	+	+	+
53	+	+	+	-	+	+	+	+
54	+	+	+	-	+	+	+	+
55	+	+	+	-	+	+	+	+
56	+	+	+	+	+	+	+	+
57	-	-	-	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+	+	+
59	-	-	-	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	+	+	+	+
61	-	-	-	+	-	+	+	+
62	+	+	+	+	+	+	+	+
63	-	-	-	-	+	+	+	+
64	-	-	-	-	+	+	+	+
65	-	-	-	-	+	+	+	+
66	-	-	-	+	+	+	+	+
67	-	-	-	+	+	+	+	+
68	-	-	-	+	+	+	+	-
69	-	-	-	+	+	+	+	+
70	-	-	-	+	+	+	+	-
71	-	-	-	-	+	+	+	+

72	-	-	-	+	+	+	+	+
73	-	-	-	-	+	+	+	+
74	-	-	-	+	+	+	+	+
75	-	-	-	-	+	+	+	+
76	-	-	-	-	+	+	+	+
77	-	-	-	-	+	+	+	+
78	-	-	-	+	+	+	+	+
79	-	-	-	+	+	+	+	+
80	-	-	-	+	+	+	+	-
81	-	-	-	+	+	+	+	-
82	-	-	-	+	+	+	+	+
83	-	-	-	-	+	+	+	+
84	-	-	-	+	+	+	+	+
85	-	-	-	+	-	+	+	+
86	-	-	-	+	-	+	+	+
Σύνολο	36	42	42	60	81	85	85	75

+: Συλλέχθηκε δείγμα; -: Δεν συλλέχθηκε δείγμα

3. ELISA

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος έμμεσης ELISA για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων κατά του MAP σε δείγματα ορού αίματος του υπό μελέτη πληθυσμού προβάτων, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (IDEXX® Paratuberculosis Screening Ab Test, IDEXX Laboratories Inc., U.S.A.).

4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA MAP ΑΠΌ ΚΟΠΡΑΝΑ

Χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος απομόνωσης γενετικού υλικού από ιστούς (Nucleospin® Tissue, Macheray-Nagel GmbH & Co. KG, Germany), η οποία τροποποιήθηκε για την απομόνωση του MAP από κόπρανα βάσει προηγούμενων μελετών (Korou *et al.*, 2010).

Συνοπτικά, για την προετοιμασία των δειγμάτων, ζυγίζονται 2g κοπράνων από κάθε δείγμα και προστίθενται 20 ml PBS (Phosphate buffered saline) για ομογενοποίηση των δειγμάτων. Τοποθετούνται 600 μl από κάθε ομογενοποιημένο διάλυμα σε φιαλίδια των 1,5 ml που περιέχουν 300 mg γυάλινων σφαιριδίων (Adiagene, France) και ακολουθεί ανάδευση για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 6.000 g για 1 λεπτό. Η απομόνωση DNA πραγματοποιείται στην υγρή φάση των δειγμάτων έπειτα από επώαση για 14-18 ώρες με 30 μl πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml) στους 56^{o}C.

Σε κάθε τεχνική απομόνωσης DNA συμπεριλαμβάνονται θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ο θετικός μάρτυρας (C+) αποτελείται από 200 μl εναιωρήματος MAP σε PBS και ο αρνητικός μάρτυρας (C-) αποτελείται από ddH_2O (double distilled).

5. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA

Η ποιότητα του προϊόντος DNA εκτιμήθηκε ως προς την ακεραιότητά του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους φωτός (Molecular Imager ChemiDoc^{TM} XRS+, Bio-Rad Laboratories Inc., U.S.A.), και με μέτρηση οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm και 280nm με την χρήση σπεκτροφωτόμετρου (NanoDrop^{TM} 8000, Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.).

Η παρουσία αναστολέων της real time PCR στο δείγμα εκτιμήθηκε μέσω μιας μεθόδου συμβατικής PCR, που εστιάζεται στην ενίσχυση τμήματος του ενδογενούς γονιδίου της ακτίνης (Dowling and Bienzle, 2005).

Για τον έλεγχο επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων συμπεριλαμβάνεται κάθε φορά ένας αρνητικός μάρτυρας PCR ($C-_{PCR}$), που περιέχει όλα τα υλικά της μεθόδου, με αντικατάσταση του πρότυπου DNA από ddH_2O, καθώς και ο θετικός (C+) και ο αρνητικός (C-) μάρτυρας της απομόνωσης.

6. Real time PCR

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος real time PCR για την ανίχνευση τμήματος 76 ζευγών βάσεων της ειδικής αλληλουχίας *IS900* του MAP (Kim *et al.*, 2002, 2004; Korou *et al.*, 2010; Liandris *et al.*, 2014).

Συνοπτικά, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές F: 5'-AATGACGGTTACGGAGGTGGT-3', R: 5-GCAGTAATGGTCGGCCTTACC-3', και ο ανιχνευτής P: 5' FAM-TCCACGCCCGCCCAGACAGG-TAMRA 3'.

Για τον έλεγχο επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων συμπεριλαμβάνεται αρνητικός μάρτυρας real time PCR ($C-_{qPCR}$), που περιέχει όλα τα υλικά της μεθόδου, με αντικατάσταση του πρότυπου DNA από ddH_2O, καθώς και ο θετικός (C+) και ο αρνητικός (C-) μάρτυρας της απομόνωσης.

Ένας αριθμός τυχαία επιλεγμένων προϊόντων της real time PCR, που αντιστοιχούσαν στο 50% των θετικών δειγμάτων, υποβλήθηκε σε ανάλυση αλληλουχίας για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της διαδικασίας ενίσχυσης. Διεξήχθη ανάλυση αλληλουχίας σε αμφότερους τους κλώνους χρησιμοποιώντας το BigDye® Cycle Sequencing kit και το ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας το Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) του National Center for Biotechnology Information (NCBI).

7. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα ποιοτικά αποτελέσματα της real time PCR και της ELISA παρουσιάζονται ως ποσοστά (συχνότητες) και συγκρίθηκαν μεταξύ των περιόδων δειγματοληψίας με τη μη παραμετρική δοκιμασία Cochran’s Q test, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύγκριση περισσότερων από δύο εξαρτημένων ποσοστών. Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με την μη παραμετρική δοκιμασία McNemar. Ανάλογα με την περίπτωση, οι συγκρίσεις μεταξύ ανεξάρτητων ποσοστών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον στατιστικό έλεγχο X^2, καθώς και μονόπλευρα ή δίπλευρα z-tests. Η δοκιμασία Shapiro-Wilks κατέδειξε ότι τα ποσοτικά αποτελέσματα της real time PCR (ποσότητα του MAP DNA που ανιχνεύτηκε σε δείγματα κοπράνων) δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και έτσι παρουσιάστηκαν ως διάμεσοι (1^{ο} τεταρτημόριο, 2^{ο} τεταρτημόριο) και συγκρίθηκαν μεταξύ των περιόδων της δειγματοληψίας με τον μη παραμετρικό έλεγχο Friedman. Πολλαπλές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με την μη παραμετρική δοκιμασία Wilcoxon Singed-Rank test. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) και για όλους τους στατιστικούς ελέγχους το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο 5%.

Ζ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν σε καθένα από τα στάδια της ανάλυσης και τις περιόδους δειγματοληψίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 5, μαζί με τη σχετική στατιστική ανάλυση.

Στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυσης, το ποσοστό των ζώων που αντέδρασαν θετικά στην real time PCR διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των 3 περιόδων (PP1-3) της δειγματοληψίας (Cochran's Q test Q=13.4, P=0.0012). Επίσης το ποσοστό των θετικών ζώων της περιόδου PP1 (πριν τον τοκετό) ήταν σημαντικά χαμηλότερό σε σύγκριση με αυτό της PP2 (μετά τον τοκετό), (McNemar's test X^2=10.67, P=0.0015) και PP3 (πριν από την περίοδο οχείας), (McNemar's test X^2= 7.12, P=0.0127). Στο κύριο στάδιο της ανάλυσης, το ποσοστό των ζώων που αντέδρασαν θετικά στην real time PCR ήταν διαφορετικό μεταξύ των 5 περιόδων (FP1-5) της δειγματοληψίας, σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (Cochran's Q test Q=9.89, P=0.042). Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό των θετικών ζώων της περιόδου FP4 (4-15 ημέρες μετά τον τοκετό) ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με αυτό της FP5 (πριν από την περίοδο οχείας), (McNemar's test X^2=7.53, P=0.006), ενώ η αντίστοιχη διαφορά σε όλα τα άλλα στάδια της δειγματοληψίας δεν ήταν στατιστικά σημαντική (McNemar's tests P>0.05).

Η σύγκριση του επιπέδου θετικότητας που καταγράφηκε στα δύο στάδια της ανάλυσης δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις αντίστοιχες περιόδους δειγματοληψίας, δηλαδή πριν από τον τοκετό (PP1: 13.9±11.30%, FP1: 38.3±12.30%, two-tailed z-test Z=2.55, P=0.0108), μετά τον τοκετό (PP2:

59.5±14.85%, FP4: 40.0±10.41%, two-tailed z-test Z=2.07, P=0.0385) και πριν από την περίοδο οχείας (PP3: 47.6±0.05) 15,10%, FP5: 21.3±9.27%, two-tailed z-test Z=2.96, P=0.0031). Τα σχετικά ποσοστά σε όλες τις περιπτώσεις ήταν υψηλότερα στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυσης σε σύγκριση με το κύριο, εκτός από εκείνα που αντιστοιχούσαν στην περίοδο πριν τον τοκετό (FP1> PP1).

Η ποσότητα DNA του MAP που ανιχνεύθηκε στα δείγματα κοπράνων με real time PCR παρουσιάζει μια τάση, η οποία είναι παρόμοια με εκείνη της ποιοτικής ανάλυσης, αναφορικά με αμφότερα τα στάδια της δειγματοληψίας (Πίνακας 5). Ειδικότερα, οι διάμεσοι αναφορικά με την ποσότητα MAP που ανιχνεύθηκε κατά τις 3 περιόδους της δειγματοληψίας του προκαταρτικού σταδίου της ανάλυσης, διέφεραν σημαντικά (Friedman test X^2=15.09, P=0.0005), με εκείνον που αντιστοιχεί στην περίοδο πριν τον τοκετό (PP1) να είναι σημαντικά χαμηλότερος, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μετά τον τοκετό (PP2), (Wilcoxon Singed-Rank test Z=3.30, P=0.0010) και πριν από την περίοδο οχείας (PP3), (Wilcoxon Singed-Rank test Z =2.49, P=0.0129). Οι διάμεσοι αναφορικά με την ποσότητα MAP μεταξύ των 5 περιόδων δειγματοληψίας του κυρίου σταδίου της ανάλυσης διέφεραν επίσης σημαντικά (Friedman test X^2=13.12, P=0.0107), με εκείνον που αντιστοιχεί στην περίοδο 4-15 ημέρες μετά τον τοκετό (FP4) να είναι σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο πριν από την περίοδο οχείας (FP5), (Wilcoxon Singed-Rank test Z=2.52, P=0.0117).

Με μόνο μία εξαίρεση (1.4%, 1 από τα 70), κανένα από τα ζώα που εξετάστηκαν δεν αντέδρασε θετικά σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας, του προκαταρκτικού (n = 36) ή του κυρίου σταδίου (n = 70) της ανάλυσης. Στο προκαταρκτικό στάδιο, το ποσοστό των ζώων που αντέδρασαν θετικά στη real time PCR σε μία και σε δύο από τις τρεις περιόδους δειγματοληψίας ήταν αντίστοιχα, 61.1% (22 από 36) και 38.9% (14 από 36) του συνόλου των θετικών ζώων. Η διαφορά μεταξύ των συγκεκριμένων ποσοστών είναι στατιστικά σημαντική (one-tailed z-test, Z=1.88, P=0.0298). Το ανάλογο ποσοστό που καταγράφηκε στο κύριο στάδιο της ανάλυσης σε σχέση με τα ζώα που αντέδρασαν θετικά σε μία, δύο, τρεις και τέσσερις περιόδους δειγματοληψίας ήταν 47.1% (33 από 70), 27.1% (19 από 70), 15.7% (11 70) και 8.6% (6 από 70). Τα συγκεκριμένα ποσοστά διαφέρουν επίσης μεταξύ τους σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (chi-square test X^2=35.71, P<0.0001).

Στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυσης, από τα ζώα που αντέδρασαν θετικά σε τουλάχιστον δύο από τις περιόδους δειγματοληψίας (n = 14), αυτά για τα οποία καταγράφηκε η υψηλότερη ποσότητα DNA του MAP (χαμηλότερη τιμή Ct) κατά την περίοδο PP1, PP2 ή PP3 ήταν αντίστοιχα, 7.1% (1 από 14), 64.3% (9 από 14) και 25.6% (4 από 14). Τα συγκεκριμένα ποσοστά διαφέρουν μεταξύ τους σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (Cochran's Q test Q=6.50, P=0.0388) και το ποσοστό που αντιστοιχεί στην PP2 είναι σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με αυτό της PP1 (McNemar's test X^2=5.44, P=0.0196). Τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν στο τελικό στάδιο της ανάλυσης στα ζώα που αντέδρασαν θετικά σε τουλάχιστον δύο από τις περιόδους δειγματοληψίας (n = 37) ήταν 16.2% (6 από 37), 10.8% (4 37), 27.0% (10 από 37), 32.4% (12 από 37) και 13.5% (5 από 37), σε σχέση αντίστοιχα με τις περιόδους FP1, FP2, FP3, FP4 και FP5, Η διαφορά μεταξύ των συγκεκριμένων ποσοστών είναι επίσης στατιστικώς σημαντική (Cochran's Q test Q=13.62, P=0.0086), και το ποσοστό που αντιστοιχεί στην FP4 (4-15 ημέρες μετά τον τοκετό) είναι σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με αυτό της FP2 (McNemar’s test X2=4.00, P=0.0455) και την FP5 (McNemar’s test X2=3.86, P=0.0495).

Όσον αφορά την ανίχνευση αντισωμάτων ειδικών για το MAP μέσω ELISA, το αποτέλεσμα ήταν σε όλες τις περιπτώσεις αρνητικό (PP1-3), με εξαίρεση ένα ζώο 3 ετών που αντέδρασε θετικά σε όλα τα στάδια της δειγματοληψίας.

Πίνακας 5. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων κοπράνων με real time PCR, και της στατιστικής ανάλυσης των αντίστοιχων ποιοτικών και ποσοτικών μετρήσεων. Οι αριθμητικές τιμές αντιστοιχούν σε 10^3 κύτταρα MAP. Το δείγμα με Α/Α 53, αντέδρασε θετικά στην ELISA σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας του προκαταρκτικού σταδίου της ανάλυσης.

Α/Α ζώου	**Προκαταρκτικό στάδιο**			**Κύριο στάδιο**				
	PP1	**PP2**	**PP3**	**FP1**	**FP2**	**FP3**	**FP4**	**FP5**
1	0.01	neg	neg	0.01	0.01	0.09	0.01	neg
2	-	neg	3.0	neg	0.01	0.09	neg	neg
3	neg	0.5	0.01	0.09	0.01	0.01	0.01	neg
4	neg	neg	neg	-	0.09	0.01	0.01	neg
5	neg	neg	2.0	neg	0.01	0.09	neg	neg
6	neg	0.01	0.01	-	neg	neg	0.01	neg
7	neg	0.01	neg	0.01	neg	0.01	0.09	neg
8	neg	0.5	0.01	0.3	0.01	0.01	0.01	neg
9	neg	neg	neg	neg	0.01	0.01	0.09	0.01
10	0.01	2.0	neg	0.09	neg	0.01	0.01	neg
11	-	-	-	neg	neg	0.01	0.09	0.01
12	neg	neg	2.0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.09

13	neg	0.01	neg	neg	0.01	neg	0.09	neg
14	neg	0.01	neg	neg	neg	neg	neg	neg
15	-	-	-	-	neg	neg	neg	neg
16	-	-	-	0.01	neg	neg	0.09	neg
17	-	-	-	0.01	0.01	neg	0.09	neg
18	-	0.01	neg	neg	0.01	neg	neg	neg
19	neg	0.01	neg	neg	neg	neg	0.01	neg
20	-	neg	0.01	-	neg	neg	neg	neg
21	-	-	-	-	0.01	neg	neg	neg
22	-	-	-	0.01	0.09	0.01	neg	0.01
23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.09	0.01
24	-	-	-	neg	neg	neg	0.01	neg
25	-	-	-	neg	0.01	neg	neg	neg
26	neg	0.01	neg	0.09	neg	0.01	neg	-
27	-	-	-	-	0.01	neg	neg	neg
28	neg	neg	neg	neg	0.01	0.09	0.01	-
29	-	-	-	neg	0.01	neg	neg	0.09

30	-	0.01	neg	0.01	neg	neg	neg	-
31	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0.09	0.01
32	-	-	-	neg	neg	neg	0.01	neg
33	0.01	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
34	neg	0.01	0.01	0.01	neg	neg	neg	neg
35	neg	0.01	0.01	-	neg	neg	neg	neg
36	neg	neg	0.01	neg	neg	neg	0.01	neg
37	0.01	neg	0.01	neg	neg	neg	neg	neg
38	-	2.0	2.0	-	neg	neg	neg	0.01
39	-	-	-	neg	0.9	1.0	neg	-
40	-	-	-	0.2	0.01	neg	0.9	neg
41	-	-	-	0.1	0.3	21.5	neg	-
42	-	-	-	neg	neg	0.3	neg	0.01
43	neg	0.01	neg	neg	neg	neg	0.01	neg
44	neg	neg	neg	-	neg	0.01	neg	neg
45	neg	0.01	neg	neg	neg	0.01	neg	neg
46	neg	1.0	0.01	-	-	-	-	-

47	neg	0.01	0.01	0.3	-	neg	neg	0.5
48	-	-	-	0.01	neg	0.09	neg	neg
49	-	0.01	0.01	-	neg	neg	neg	neg
50	-	-	-	-	neg	neg	neg	neg
51	neg	1.0	neg	-	0.5	0.01	neg	neg
52	neg	0.01	0.01	-	0.5	neg	neg	neg
53	neg	1.0	neg	-	0.09	neg	neg	0.01
54	neg	neg	0.01	-	neg	neg	0.01	neg
55	neg	0.01	neg	-	0.01	neg	neg	neg
56	0.01	neg	0.01	neg	0.2	neg	neg	0.3
57	-	-	-	0.1	neg	neg	neg	neg
58	neg	neg	0.01	neg	neg	neg	neg	0.01
59	-	-	-	4.3	0.3	neg	0.01	-
60	neg	0.01	neg	neg	neg	0.01	0.3	neg
61	-	-	-	0.01	-	neg	neg	neg
62	neg	0.01	0.01	0.3	neg	neg	0.2	neg
63	-	-	-	-	0.01	neg	0.01	0.09

64	-	-	-	-	0.01	0.09	0.01	neg
65	-	-	-	-	neg	0.3	neg	neg
66	-	-	-	0.01	neg	0.01	0.5	0.4
67	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg
68	-	-	-	neg	neg	neg	neg	-
69	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg
70	-	-	-	0.01	neg	neg	neg	-
71	-	-	-	-	neg	neg	0.01	neg
72	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg
73	-	-	-	-	neg	neg	0.01	neg
74	-	-	-	neg	neg	neg	neg	neg
75	-	-	-	-	neg	neg	neg	neg
76	-	-	-	-	neg	neg	neg	0.01
77	-	-	-	-	neg	neg	neg	neg
78	-	-	-	neg	neg	0.01	0.09	neg
79	-	-	-	neg	neg	neg	0.01	neg
80	-	-	-	neg	0.01	neg	neg	-

81	-	-	-	neg	0.01	neg	neg	-
82	-	-	-	neg	neg	0.01	neg	neg
83	-	-	-	-	neg	0.01	neg	neg
84	-	-	-	neg	0.01	0.09	neg	neg
85	-	-	-	neg	-	neg	0.01	neg
86	-	-	-	0.01	-	neg	neg	neg
Σύνολο / Θετικά	36 / 5	42 /25	42 /20	60 /23	81 /31	85 /29	85 /34	75 /16
Θετικότητα*	13.9 ± 11.30[a]	59.5 ± 14.85[b]	47.6 ± 15.10[b]	38.3 ± 12.30[ab]	38.3 ± 10.59[ab]	34.1 ± 10.08[ab]	40.0 ± 10.41[b]	21.3 ± 9.27[a]
Τιμές real time PCR**	0 (0, 0)[a]	0.01 (0, 0.01)[b]	0 (0, 0.01)[b]	0 (0, 0.01)[ab]	0 (0, 0.01)[ab]	0 (0, 0.01)[ab]	0 (0, 0.01)[b]	0 (0, 0)[a]

-: Δεν συλλέχθηκε δείγμα; neg: Αρνητικό; *Τα ποιοτικά δεδομένα παρουσιάζονται ως ποσοστά (± 95% διαστήματα εμπιστοσύνης); **Τα ποσοτικά δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (1° τεταρτημόριο, 2° τεταρτημόριο); Ποσοστά και διάμεσοι με διαφορετικό εκθέτη ([a,b]) διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο (P≤0.05).

Η. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από το αποτέλεσμα του προκαταρκτικού σταδίου της ανάλυσης καταδεικνύεται ότι σε κοπάδι προβάτων με ιστορικό μη-κλινικής παραφυματίωσης, το ποσοστό των ζώων που αντιδρούν θετικά στην ανίχνευση MAP με real time PCR σε δείγματα κοπράνων, είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο 1-3 εβδομάδες πριν τον τοκετό (PP1), σε σύγκριση με αυτήν μετά τον τοκετό (PP2) και πριν την περίοδο οχείας (PP3), (Mataragka *et al*., 2017). Από το αντίστοιχο αποτέλεσμα του κυρίως σταδίου της ανάλυσης προκύπτει αυξητική τάση στο επίπεδο θετικότητας από την περίοδο FP1 στην FP4. Στην τελευταία (FP4), το ποσοστό των ζώων που αντιδρούν θετικά στην ανίχνευση MAP με real time PCR σε δείγματα κοπράνων μεγιστοποιείται, σε επίπεδο σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με την περίοδο οχείας (FP5). Τα σχετικά ποσοτικά αποτελέσματα είναι ανάλογα με τα παραπάνω ευρήματα αμφοτέρων περιόδων ανάλυσης. Ειδικότερα, η ποσότητα DNA του MAP στα κόπρανα των ζώων που εξετάστηκαν είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη την περίοδο PP1 σε σύγκριση με τις PP2 και 3, και υψηλότερη κατά την περίοδο FP4 σε σύγκριση με την FP5 (Πίνακας 5).

Το γεγονός ότι το αποτέλεσμα του προκαταρκτικού και του κύριου σταδίου της ανάλυσης είναι παρόμοιο αλλά όχι ταυτόσημο, οφείλεται πιθανότατα στο μέγεθος του δείγματος, το οποίο στο πρώτο στάδιο ήταν περίπου το μισό από ότι στο δεύτερο (P: n=42, F: n=85). Στο μικρότερο άλλωστε μέγεθος του δείγματος μπορεί να αποδοθεί επίσης το γεγονός ότι, αναφορικά με την περιγεννητική περίοδο, το επίπεδο θετικότητας παρουσίασε μεγαλύτερη διακύμανση κατά το προκαταρτικό στάδιο σε σύγκριση με το τελικό (PP1 και 2 *versus* FP1-4). Προκύπτει δηλαδή ότι στις περιόδους δειγματοληψίας FP1-4, η αύξηση του μεγέθους του δείγματος είχε ως αποτέλεσμα την εξομάλυνση της διακύμανσης, η οποία παρουσιάζονταν πολύ εντονότερη στις αντίστοιχες περιόδους της προκαταρτικής μελέτης (PP1 και 2). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι το αποτέλεσμα που καταγράφηκε κατά τα δύο στάδια της ανάλυσης δεν ταυτίζεται, τουλάχιστον σε ότι αφορά τη διακύμανση της θετικότητας σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταβολή του ποσοστού των ζώων που αντέδρασαν θετικά στη real time PCR στις διάφορες περιόδους δειγματοληψίας ακολουθεί ένα πρότυπο που είναι παρόμοιο σε αμφότερα στάδια, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται μετά τον τοκετό, δηλαδή στις περιόδους PP2 και FP4 (PP1=13.88%, PP2=59.52%, PP3=47.6%, FP1=38.33%, FP2=38.27%, FP3=34.11%, FP4=40%, FP5=21.3%). Είναι αξιοσημείωτο ότι η ανάλυση με real time PCR ενός και μόνο δείγματος κοπράνων σε καθεμία από τις συγκεκριμένες περιόδους (PP2 και FP4) επέτρεψε την ανίχνευση των θετικών ατόμων σε ποσοστό αντίστοιχα, 59.5 ± 14.85% και 40.0 ± 10.41% (Mataragka *et al*., 2017).

Η αύξηση του επιπέδου θετικότητας στο MAP μετά τον τοκετό ενισχύεται και από τα ευρήματα που καταγράφηκαν στα δύο στάδια της ανάλυσης, σε σχέση με ζώα που αντέδρασαν θετικά στη real time PCR περισσότερες από μία φορές. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των ζώων που αντέδρασαν θετικά περισσότερες από μία φορές στη real time PCR μετά τον τοκετό (PP2 και FP4) ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο και στα δύο στάδια της δειγματοληψίας σε σύγκριση με τις άλλες περιόδους.

Η διακύμανση της αποβολής του MAP μέσω των κοπράνων σε σχέση με τον τοκετό αναλύεται για πρώτη φορά αναφορικά με το πρόβατο, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Ανάλογες μελέτες έχουν διεξαχθεί σε βοοειδή και πρόβατα σε σχέση αντίστοιχα με τον τοκετό και την καταπόνηση, και παρέχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Rossiter and Burhans, 1996, Kennedy, 2011; Kauffman *et al.*, 2014, Pribylova-Dziedzinska *et al.*, 2014). Ασφαλώς αυτό είναι σε μεγάλο βαθμό αναμενόμενο, δεδομένου του αριθμού των παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η επάρκεια των μέσων εργαστηριακής ανάλυσης (χαμηλό όριο ανίχνευσης, ευαισθησία, ειδικότητα, ψευδείς αντιδράσεις), η έκθεση των ζώων σε παράγοντες καταπόνησης (Korou *et al.*, 2010, Kennedy, 2011, Marquetoux *et al.*, 2018), η επαφή με άλλα ζώα, η διατροφή, η υγιεινή κατάσταση, η γενετική προδιάθεση των ζώων στη νόσο σε επίπεδο ατόμου και φυλής, η έκθεση σε περιβαλλοντικές πηγές λοίμωξης, κ.α.. Για να περιοριστεί η δυναμική ορισμένων έστω από αυτές τις παραμέτρους στο αποτέλεσμα της ανάλυσης, η παρούσα μελέτη διεξήχθη με εργαστηριακές μεθόδους διαπιστευμένες κατά ISO17025, επεκτάθηκε χρονικά σε μια περίοδο περίπου τριών ετών, και εφαρμόστηκε σε ομάδα ζώων που εκτρέφεται υπό συνθήκες διαρκώς παρακολουθούμενη διατροφής, χωρίς πρόσβαση σε βοσκότοπους και επαφή με άλλα ζώα.

Σε ότι αφορά τη δομή του πειραματικού σχεδιασμού, πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυση χρησιμοποιήθηκε εκτός της real time PCR και η ELISA, διότι, αντίθετα με την *in vitro* απομόνωση του MAP της οποίας η ολοκλήρωση προϋποθέτει επώαση των δειγμάτων για αρκετούς μήνες (Harris and Barletta, 2001), οι δύο συγκεκριμένες μέθοδοι διεξάγονται μέσα σε λίγες μόνο ώρες και μπορούν συνεπώς να χρησιμοποιηθούν εύκολα για τον έλεγχο της παραφυματίωσης στην πράξη (Lavers *et al.*, 2014, Singh *et al*., 2014, Laurin *et al*., 2015, IAP, 2017, Barkema *et al*., 2018, Gautam *et al*., 2018). Δυστυχώς, η χρήση της ELISA ανέδειξε τη μεγάλη διαγνωστική της ανεπάρκεια σε σχέση με την παραφυματίωση του προβάτου, κάτι που συνάδει με τα ευρήματα και άλλων μελετών από τις οποίες προκύπτει ότι η οροθετικότητα προβάτων με υποκλινική παραφυματίωση είναι πολύ χαμηλή (Kostoulas *et al.*, 2006; EFSA AHAW Panel, 2017; Whittington *et al.*, 2017). Για τον λόγο αυτόν, η ανάλυση που διεξήχθη στο δεύτερο στάδιο αυτής της μελέτης βασίστηκε αποκλειστικά στη real time PCR, της οποίας το πολύ χαμηλό ελάχιστο όριο ανίχνευσης, συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της ευαισθησίας της. Αυτό προϋποθέτει ωστόσο επαναλαμβανόμενους ελέγχους, δεδομένου ότι η αποβολή του MAP στα κόπρανα είναι διαλείπουσα. Σε σχέση με αυτό αξίζει να επισημανθεί ότι ο αριθμός των ζώων που αντέδρασαν θετικά στη real time PCR σε περισσότερες από μία περιόδους δειγματοληψίας, παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση στο προκαταρκτικό στάδιο της ανάλυσης ($P=0.0298$), η οποία ήταν ακόμη πιο έντονη στο τελικό ($P<0.0001$). Είναι ίσως ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι το 10.47% (9 από 86) των εξεταζόμενων ζώων με real time PCR αντέδρασε αρνητικά σε όλα τα στάδια της συλλογής δειγμάτων, ενώ κανένα (0 στα 86) θετικά, το οποίο δείχνει μάλλον σαφώς πόσο δύσκολη είναι η ανίχνευση των θετικών στο MAP ζώων στην πράξη, ακόμη και σε μια εκτροφή προβάτων που αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από μολυσμένα ζώα.

Προσεγγίζοντας αιτιολογικά το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης, τουλάχιστον στον βαθμό που αυτό είναι δόκιμο δεδομένης της δομής της, θα μπορούσε κανείς να αποδώσει τη μείωση της αποβολής του MAP προ του τοκετού κατά το προκαταρτικό στάδιο της ανάλυσης, στη φυσιολογική ελάττωση της γαστρεντερικής δραστηριότητας, κατά τη συγκεκριμένη περίοδο (PP1), (Reece, 2009). Επισημαίνεται ότι οι τελευταίες περίοδοι δειγματοληψίας (PP3 / FP5) συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα έρευνα προκειμένου να προσδιοριστεί το επίπεδο θετικότητας στον πληθυσμό που μελετήθηκε όταν τα ζώα δεν τελούσαν υπό την επίδραση της εγκυμοσύνης ή του τοκετού, ώστε να εκτιμηθεί κατά πόσον η διακύμανση της αποβολής του MAP συνδέεται ειδικά με τον τοκετό. Δεδομένου ότι από το αποτέλεσμα της προκαταρκτικού σταδίου της ανάλυσης αναδεικνύεται η συσχέτιση μεταξύ της αποβολής του MAP και του τοκετού, η σύνδεση μεταξύ τους διερευνήθηκε λεπτομερέστερα στο κύριο στάδιο της ανάλυσης, το οποίο συνίστατο επιπροσθέτως από δύο περιόδους δειγματοληψίας που κάλυπταν τα διαστήματα, λίγες ήμερες πριν (FP2), και μετά τον τοκετό (FP3). Συγκρίνοντας τα σχετικά αποτελέσματα (FP2-3) με αυτά των περιόδων 4-15 ημέρες πριν (FP1), και μετά τον τοκετό (FP4), προκύπτει ότι η αποβολή του MAP παραμένει σχετικά χαμηλή σε όλη την περίοδο μεταξύ FP1 και FP3, και αυξάνεται κατά την FP4, κάτι που συνάδει με τη φυσιολογική μεταβολή της γαστρεντερικής δραστηριότητας των ζώων λόγω του τοκετού. Ωστόσο, αυτό δεν μπορεί να εξηγήσει το υψηλότερο επίπεδο αποβολής του MAP 4-15 ημέρες μετά τον τοκετό (FP4), σε σύγκριση με την περίοδο (FP5). Πιο συγκεκριμένα, εάν ο μόνος παράγοντας που καθόριζε τη διακύμανση της αποβολής του MAP ήταν η μειωμένη γαστρεντερική δραστηριότητα, το ποσοστό των θετικών ζώων κατά την περίοδο FP4 δεν θα ήταν υψηλότερο από την FP5, ασφαλώς όχι σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Με αυτό ως δεδομένο, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι, αν και η μικρή διακύμανση του ποσοστού θετικότητας κατά την περιγεννητική περίοδο μπορεί να σχετίζεται με τη μειωμένη λόγω τοκετού γαστρεντερική δραστηριότητα, η αύξηση του ποσοστού θετικότητας, σε ποιοτικό και σε ποσοτικό επίπεδο 4-15 ημέρες μετά τον τοκετό σε σύγκριση με την ξηρά περίοδο, είναι μάλλον πιθανότερο ότι σχετίζεται με την έναρξη της γαλουχίας. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην καταπόνηση ή και στην αύξηση της γαστρεντερικής δραστηριότητας, η οποία αργότερα επιστρέφει στο φυσιολογικό, οδηγώντας σε χαμηλότερα επίπεδα θετικότητας (αριθμός θετικών ζώων στο MAP και ποσότητα DNA MAP) κατά την περίοδο FP5.

Θ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Σε πρόβατα με ιστορικό μη-κλινικής παραφυματίωσης, η θετικότητα στη real time PCR στα κόπρανα μεγιστοποιείται, σε ποιοτικό και σε ποσοτικό επίπεδο, 4-15 ημέρες μετά τον τοκετό. Από την άποψη αυτή, η συγκεκριμένη περίοδος είναι η πιο κατάλληλη για τον περιορισμό της διάδοσης της νόσου μέσω ελέγχου και απομάκρυνσης των θετικών ζώων. Η χρήση της ELISA για τον ίδιο σκοπό δεν ενδείκνυται σε σχέση με τη συγκεκριμένη κατηγορία ζώων, λόγω χαμηλής ευαισθησίας.

I. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M (2014). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce in vitro granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *PLoS One* 9(8), e104238. doi: 10.1371/journal.pone.0104238.

Aduriz JJ (1993). Epidemiología, diagnóstico y control de la paratuberculosis ovina en la Comunidad Autónoma del País Vasco. University of Zaragoza, Spain.

Alagarasu K, Selvaraj P, Swaminathan S, Raghavan S, Narendran G, Narayanan PR (2007). Mannose binding lectin gene variants and susceptibility to tuberculosis in HIV-1 infected patients of South India. *Tuberculosis* 87(6), 535-543. doi: 10.1016/j.tube.2007.07.007.

Alter-Koltunoff M, Goren S, Nousbeck J, Feng CG, Sher A, Ozato K, Azriel A, Levi BZ. (2008). Innate immunity to intraphagosomal pathogens is mediated by interferon regulatory factor 8 (IRF-8) that stimulates the expression of macrophage-specific Nramp1 through antagonizing repression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 283(5), 2724–2733. doi: 10.1074/jbc.M707704200.

Angelidou E, Kostoulas P, Leontides L (2014). Bayesian validation of a serum and milk ELISA for antibodies against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Greek dairy goats across lactation. *J. Dairy Sci*. 97(2), 819-828. doi: 10.3168/jds.2013-7218.

Arru G, Caggiu E, Paulus K, Sechi GP, Mameli G, Sechi LA (2016). Is there a role for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Parkinson's disease? J. *Neuroimmunol.* 293, 86–90. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.02.016.

BANR - Board on Agriculture and Natural Resources (2003). Diagnosis and control of Johne's Disease. National Research Council (US) Committee on Diagnosis and Control of Johne's Disease. Washington (DC), National Academies Press (US).

Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten V, Bannantine JP, Keefe GP, Kelton DF, Wells SJ, Whittington RJ, Mackintosh CG, Manning EJ, Weber MF, Heuer C, Forde TL, Ritter C, Roche S, Corbett CS, Wolf R, Griebel PJ, Kastelic JP, De Buck J (2018). Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transbound Emerg. Dis.* 65(Suppl. 1), 125–148. doi: 10.1111/tbed.12723.

Barkema HW, Hesselink JW, McKenna SLB, Benedictus G, Groenendaal H (2010). Global prevalence and economics of infection with *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*. In: Behr M, Collins DM (Eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CABI, 10-17.

Bastida F, Juste RA (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *J. Immune Based Ther. Vaccines* 9, 8. doi: 10.1186/1476-8518-9-8.

Bayele HK, Peyssonnaux C, Giatromanolaki A, Arrais-Silva WW, Mohamed HS, Collins H, Giorgio S, Koukourakis M, Johnson RS, Blackwell JM, Nizet V, Srai SK (2007). HIF-1 regulates heritable variation and allele expression phenotypes of the macrophage immune response gene SLC11A1 from a Z-DNA forming microsatellite. *Blood* 110(8), 3039-3048. doi: 10.1182/blood-2006-12-063289.

Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, Connor KM, Stevenson K, McInnes CJ, Sharp JM, Jones DG (1998). Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 63(3), 265–287.

Begg DJ, O'Brien R, Mackintosh CG, Griffin JFT (2005). Experimental infection model for Johne's disease in sheep. *Infect. Immun.* 73(9), 5603–5611. doi: 10.1128/IAI.73.9.5603-5611.2005.

Begg DJ, Whittington RJ (2008). Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet. J.* 176(2), 129–145. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.02.022.

Begg DJ, de Silva K, Di Fiore L, Taylor DL, Bower K, Zhong L, Kawaji S, Emery D, Whittington RJ (2010). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*. 141(3-4), 301–311. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.007.

Begg DJ, Whittington RJ (2010). Paratuberculosis in sheep. In: Behr M, Collins DM (Eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CABI, 157-164.

Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology* 216(7), 840–846. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.004.

Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J, Gilbert SC, Corrah T, Kwiatkowski D, Whittle HC, Hill AV (1998). Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *QJM* 91(1), 13-18.

Benazzi S, Berrada J, Schliesser T (2010). First report of paratuberculosis (Johne's disease) in sheep in Morocco. *J. Vet. Med. B.* 42(6), 339-344.

Bernstein CN, Wang MH, Sargent M, Brant SR, Collins MT (2007). Testing the interaction between NOD-2 status and serological response to *Mycobacterium paratuberculosis* in cases of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* 45(3), 968–971. doi: 10.1128/JCM.02062-06.

Bhide M, Chakurkar E, Tkacikova L, Barbuddhe S, Novak M, Mikula I (2006). IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. *Vet. Microbiol.* 112(1), 33–41. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.004.

Bower KL, Begg DJ, Whittington RJ (2011). Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) from blood and extra-intestinal tissues in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 147(1-2), 127–132. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.06.016.

Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, Nouvet FJ, Bonen D, Karban A, Dassopoulos T, Karaliukas R, Beaty TH, Hanauer SB, Duerr RH, Cho JH (2003). Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm. Bowel Dis.* 9(5), 281-289.

Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Nouvet F, Shugart YY, Bernstein CN (2007). A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 102(2), 313-323. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00926.x.

Brett S, Orrell JM, Swanson Beck J, Ivanyi J (1992). Influence of H-2 genes on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs of chronically infected mice. *Immunology* 76(1), 129-132.

Brotherston JF, Gilmour NJL, Samuel JM (1961). Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep: I. Routes of infection and assay of viable *M. johnei*. *J. Comp. Pathol. Ther.* 71, 286–299.

Bull TJ, Vrettou C, Linedale R, McGuinnes C, Strain S, McNair J, Gilbert SC, Hope JC (2014). Immunity, safety and protection of an Adenovirus 5 prime - Modified *Vaccinia virus* Ankara boost subunit vaccine against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in calves. *Vet. Res.* 45, 112. doi: 10.1186/s13567-014-0112-9.

Carter MA (2012). Prevalence and prevention of paratuberculosis in North America. *Jpn. J. Vet. Res.* 60(Suppl), S9–18. doi: 10.14943/jjvr.60.suppl.s9.

Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P (1994). Human natural resistance associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.* 180(5), 1741-1752.

Chen Z, O'Shea JJ (2008). Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 41, 87–102.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell. Vet.* 74(3), 218–262.

Clarke CJ, Little D (1996). The pathology of ovine paratuberculosis: gross and histological changes in the intestine and other tissues. *J. Comp. Pathol.* 114(4), 419–437.

Clarke CJ (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* 116(3), 217–261.

Coelho AC, Pinto ML, Coelho AM, Rodrigues J, Juste R (2008). Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Rum. Res.* 76, 201-206.

Coelho AC, Coelho AM, García-Diez J, Pires MA, Pinto ML (2017). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by several diagnostics techniques in clinical suspected sheep. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 68(2), 167-174. doi: 10.12681/jhvms.15601.

Collins DM, Gabric DM, Delisle GW (1990). Identification of 2 groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1591–1596.

Collins MT (2011). Diagnosis of Paratuberculosis. *Vet. Clin. Food Anim.* 27, 581–591. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.07.013.

Corpa JM, Pérez V, Sánchez MA, Marín JF (2000). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination of adult animals. *Vet. Rec.* 146(7), 195–196.

Cossu D, Masala S, Cocco E, Paccagnini D, Tranquilli S, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA (2013). Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and SLC11A1 polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(3), 203-207. doi: 10.3855/jidc.2737.

de Silva K, Begg D, Whittington R (2011). The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 139(1), 10–16. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.07.022.

de Silva K, Begg DJ, Plain KM, Purdie AC, Kawaji S, Dhand NK, Whittington RJ (2013). Can early host responses to mycobacterial infection predict eventual disease outcomes? *Prev. Vet. Med.* 112(3-4), 203–212. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.08.006.

Delbridge LM, O'Riordan MX (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 19(1), 10–16.

Delgado L, Juste RA, Munoz M, Morales S, Benavides J, Carmen Ferreras M, Garcia Marin JF, Perez V (2012). Differences in the peripheral immune response between lambs and adult ewes experimentally infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145(1-2), 23–31. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.10.005.

Delgado L, Garcia Marin JF, Munoz M, Benavides J, Juste RA, Garcia Pariente C, Fuertes M, Gonzalez J, Ferreras MC, Perez V (2013). Pathological findings in young and adult sheep following experimental infection with 2 different doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 50(5), 857–866. doi: 10.1177/0300985813476066.

Dennis MM, Reddacliff LA, Whittington RJ (2010). Longitudinal study of clinicopathological features of Johne's disease in sheep naturally exposed to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 48(3), 565–575. doi: 10.1177/0300985810375049.

Dhand NK, Eppleston J, Whittington RJ, Toribio J (2009). Association of farm soil characteristics with ovine Johne's disease in Australia. *Prev. Vet. Med.* 89(1-2), 110–120. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.02.017.

Dimareli-Malli Z, Stevenson K, Sarris K, Sossidou K (2009). Study of microbiological and molecular typing aspects of paratuberculosis in sheep and goats in Northern Greece. *Transbound. Emerg. Dis*. 56(6-7), 285–290. doi: 10.1111/j.1865-1682.2009.01071.x.

Dimareli-Malli Z, Mazaraki K, Stevenson K, Tsakos P, Zdragas A, Giantzi V, Petridou E, Heron I, Vafeas G (2013). Culture phenotypes and molecular characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from small ruminants. *Res. Vet. Sci.* 95(1), 49–53. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.03.010.

Djenne B (2010). Paratuberculosis in goats. In: Behr M, Collins DM (Eds.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CABI, 169-178.

Dow CT, Ellingson JLE (2010). Detection of *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* in Blau syndrome tissues. *Autoimmune Dis.* 127692. doi: 10.4061/2010/127692.

Dowling RJO, Bienzle D (2005). Gene-expression changes induced by *feline immunodeficiency virus* infection differ in epithelial cells and lymphocytes. *J. Gen. Virol.* 86, 2239–2248. doi: 10.1099/vir.0.80735-0.

Dukkipati VSR (2007). A search for genetic factors influencing immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Dukkipati VS, Blair HT, Garrick DJ, Lopez-Villalobos N, Whittington RJ, Reddacliff LA, Eppleston J, Windsor P, Murray A (2010). Association of microsatellite polymorphisms with immune responses to a killed *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine in Merino sheep. *N. Z. Vet. J.* 58(5), 237–245. doi: 10.1080/00480169.2010.69154.

EFSA AHAW Panel - EFSA Panel on Animal Health and Welfare, More S, Botner A, Butterworth A, Calistri P, Depner K, Edwards S, Garin-Bastuji B, Good M, Gortázar Schmidt C, Michel V, Miranda MA, Nielsen SS, Raj M, Sihvonen L, Spoolder H, Stegeman JA, Thulke H-H, Velarde A, Willeberg P, Winckler C, Baldinelli F, Broglia A, Zancanaro G, Beltrán-Beck B, Kohnle L, Morgado J, Bicout D (2017). Scientific Opinion on the assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): paratuberculosis. EFSA Journal 15(7), 4960. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4960.

Ellingson JL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, Sullivan NM (2005). Detection of viable *Mycobacterium avium* suubsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot*. 68(5), 966-972.

EPA - United States Environmental Protection Agency (2004). Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples.

Eppleston J, Reddacliff L, Windsor P, Whittington R, Jonbes S (2004). Field studies on vaccination for the control of OJD in Australia - An overview. *Proc. Aust. Sheep. Vet. Soc.* 14, 56-59.

Eppleston J, Windsor PA (2007). Lesions attributed to vaccination of sheep with Gudair^{TM} for the control of ovine paratuberculosis: post-farm economic impacts at slaughter. *Aust. Vet. J*. 85(4), 129–133. doi: 10.1111/j.0005-0423.2007.00135.x.

Eppleston J, Begg DJ, Dhand NK, Watt B, Whittington RJ (2014). Environmental survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in different climatic zones of eastern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(8), 2337–2342. doi: 10.1128/AEM.03630-13.

Faisal SM, Chen JW, Yan F, Chen TT, Useh NM, Yan W, Guo S, Wang SJ, Glaser AL, McDonough SP, Singh B, Davis WC, Akey BL, Chang YF. (2013). Evaluation of a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* leuD mutant as a vaccine candidate against challenge in a caprine model. *Clin. Vaccine Immunol.* 20(4), 572-581. doi:10.1128/CVI.00653-12.

Fecteau ME, Whitlock RH, Buergelt CD, Sweeney RW (2010). Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *Can. Vet. J.* 51(2), 198–200.

Fecteau ME, Whitlock RH (2011). Treatment and chemoprophylaxis for Paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 27(3), 547–557. doi: 10.1016/j.cvfa.2011.07.002.

Fernandez M, Benavides J, Sevilla IA, Fuertes M, Castano P, Delgado L, Francisco Garcia Marin J, Garrido JM, Ferreras MC, Perez V (2014). Experimental infection of lambs with C and S-type strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: immunological and pathological findings. *Vet. Res.* 45(1), 5. doi: 10.1186/1297-9716-45-5.

Fernandez M, Delgado L, Sevilla IA, Fuertes M, Castano P, Royo M, Ferreras MC, Benavides J, Perez V (2015). Virulence attenuation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* S-type strain prepared from intestinal mucosa after bacterial culture. Evaluation in an experimental ovine model. *Res. Vet. Sci.* 99, 180–187. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.02.001.

Garred P, Richter C, Andersen AB, Madsen HO, Mtoni I, Svejgaard A, Shao J (1997). Mamman-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand. J. Immunol.* 46(2), 204-208.

Garrido JM, Cortabarria N, Oguiza JA, Aduriz G, Juste RA (2000). Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 77(3-4), 379–386.

Gautam M, Ridler A, Wilson PR, Heuer C (2018). Control of clinical paratuberculosis in New Zealand pastoral livestock. *N. Z.. Vet. J.* 66(1), 1-8. doi:10.1080/00480169.2017.1379914.

Gill CO, Saucier L, Meadus WJ (2011). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J. Food Prot*. 74(3), 480–499. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-301.

Goodger WJ, Collins MT, Nordlund KV, Eisele C, Pelletier J, Thomas CB, Sockett DC (1996). Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of Mycobacterium paratuberculosis infections in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208(11), 1877-1881.

Grant IR (2006). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in foods. Current evidence and potential consequences. *Int. J. Dairy Technol*. 59, 112-117.

Gupta S, Singh SV, Chaubey KK, Singh M, Bhatia AK, Sohal JS (2016). Vaccine approach for the 'therapeutic management' of incurable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in domestic livestock population. In: Advances in Animal Sciences and Biomedicine in 21st Century. International Academy of Biosciences (IAB), 44-57.

Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 277(44), 41701–41705. doi: 10.1074/jbc.M206473200.

Gwozdz JM, Thompson KG, Manktelow BW, Murray A, West DM (2000). Vaccination against paratuberculosis of lambs already infected experimentally with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 78(8), 560-566.

Hailat NQ, Hananeh W, Metekia AS, Stabel JR, Al-Majali A, Lafi S (2010). Pathology of subclinical paratuberculosis (Johne's disease) in Awassi sheep with reference to its occurrence in Jordan. *Vet. Med.* 55, 590-602.

Harris NB, Barletta RG (2001). *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3), 489–512. doi: 10.1128/CMR.14.3.489-512.2001.

Hines ME II, Stabel JR, Sweeney RW, Griffin F, Talaat AM, Bakker D, Benedictus G, Davis WC, de Lisle GW, Gardner IA, Juste RA, Kapur V, Koets A, McNair J, Pruitt G, Whitlock RH (2007). Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines. *Vet. Microbiol.* 122(3-4), 197–222. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.009.

Homuth M, Valentin-Weigand P, Rohde M, Gerlach GF. (1998). Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from Mycobacterium paratuberculosis. *Infect. Immun.* 66(2), 710–716.

Hope AF, Kluver PF, Jones SL, Condron RJ (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 78(12), 850–856.

Ikonomopoulos J, Balaskas C, Kantzoura B, Fragiadaki E, Pavlik I, Bartos M, Lukas JC, Gazouli M (2007). Comparative evaluation of positive tests to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in clinically healthy sheep and goats in south-west Greece using molecular techniques, serology, and culture. *Vet. J.* 174(2), 337–343. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.09.004.

IAP - International Association for Paratuberculosis (2017). Guidelines for certification with respect to the movement of livestock for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) infection. The paratuberculosis newsletter (4). http://www.paratuberculosis.net/newsletters/PtbNL_12-2017.pdf

Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV (2007). Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol.* 9(5), 1087-1098. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.00914.x.

Johne HA, Frothingham L (1895). Ein eigenthuemlicher fall von tuberculose beim rind. *Deut. Ztschr. f. Thiermed.* 21, 438–454.

Jungersen G, Mikkelsen H, Grell SN (2012). Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148(1-2), 48–54. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.010.

Juste RA, Perez V (2011). Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 27(1), 127-138. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.020.

Juste RA, Garrido JM, Geijo M, Elguezabal N, Aduriz G, Atxaerandio R, Sevilla I (2005). Comparison of blood polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(4), 354-359. doi: 10.1177/104063870501700409.

Kalis CH, Hesselink JW, Barkema HW, Collins MT (2001). Use of long-term vaccination with a killed vaccine to prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 62(2), 270-274.

Karcher EL, Beitz DC, Stabel JR (2008). Modulation of cytokine gene expression and secretion during the periparturient period in dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123(3-4), 277–288. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.02.006.

Kauffman N, Koren O, Shwimmer A, Baider Z, Mor F, Grinberg K, Elad D (2014). Assessing the fecal shedding consistency of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by dairy cows by qPCR: A preliminary study. *Isr. J. Vet. Med.* 69(3), 136–140.

Kawaji S, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ (2011). A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of a direct faecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep. *Vet. Microbiol.* 148(1), 35–44. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.07.022.

Kennedy D (2011). International efforts at paratuberculosis control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27(3), 647–654. doi:10.1016/j.cvfa.2011.07.011.

Kim SG, Kim EH, Lafferty CJ, Miller LJ, Koo HJ, Stehman SM, Shin SJ (2004). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction for confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a broth-based culture system ESP II. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16(5), 448–453. doi: 10.1177/104063870401600515.

Kim SG, Shin SJ, Jacobson RH, Miller LJ, Harpending PR, Stehman SM, Rossiter CA, Lein DA (2002). Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14(2), 126–131. doi: 10.1177/104063870201400206.

Kluge JP, Merkal RS, Monlux WS, Larsen AB, Kopecky KE, Ramsey FK, Lehmann RP (1968). Experimental paratuberculosis in sheep after oral, intratracheal, or intravenous inoculation lesions and demonstration of etiologic agent. *Am. J. Vet. Res.* 29(5), 953–962.

Knust B, Patton E, Ribeiro-Lima J, Bohn JJ, Wells SJ (2013). Evaluation of the effects of a killed whole-cell vaccine against *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis in 3 herds of dairy cattle with natural exposure to the organism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242(5), 663–669.doi: 10.2460/javma.242.5.663.

Koets AP, Eda S, Sreevatsan S (2015). The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Vet. Res.* 46, 61. doi: 10.1186/s13567-015-0185-0.

Korou LM, Liandris E, Gazouli M, Ikonomopoulos J (2010). Investigation of the association of the SLC11A1 gene with resistance/sensitivity of goats (*Capra hircus*) to paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 144(3-4), 353–358. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.01.009.

Kostoulas P, Leontides L, Enøe C, Billinis C, Florou M, Sofia M (2006). Bayesian estimation of sensitivity and specificity of serum ELISA and faecal culture for diagnosis of paratuberculosis in Greek dairy sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 76(1-2), 56–73. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.04.006.

Kovich DA, Wells SJ, Friendshuh K (2006). Evaluation of the voluntary Johne's Disease herd status program as a source of replacement cattle. *J. Dairy Sci*. 89(9), 3466-3470. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72384-0.

Kralik P, Pribylova-Dziedzinska R, Kralova A, Kovarcik K, Slana I (2014). Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. *Vet. J.* 201(1), 91–94. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.02.011.

Kufer TA, Banks DJ, Philpott DJ (2006). Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072, 19-27. doi: 10.1196/annals.1326.020.

Kurade NP, Tripathi BN, Rajukumar K, Parihar NS (2004). Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation, fecal shedding, and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* 41(4), 378–387. doi: 10.1354/vp.41-4-378.

Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J (2006). Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"? *World J. Gastroenterol.* 12(12): 1829-1841.

Lambeth C, Reddacliff LA, Windsor P, Abbott KA, McGregor H, Whittington RJ (2004). Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep. *Aust. Vet. J.* 82(8), 504–508.

Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT (1988). A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacerium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(4), 910–916.

Laurin EL, Chaffer M, McClure JT, McKenna SL, Keefe GP (2015). The association of detection method, season, and lactation stage on identification of fecal shedding in *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infectious dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98(1), 211–220. doi: 10.3168/jds.2014-8406.

Lavers CJ, Barkema HW, Dohoo IR, McKenna SL, Keefe GP (2014). Evaluation of milk ELISA for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy herds and association with within-herd prevalence. *J. Dairy Sci.* 97(1), 299–309. doi: 10.3168/jds.2013-7101.

Leontides S, Tomopoulos D, Christopoulos C, Tsangaris T, Exarhopoulos G (1975). Paratuberculosis (Johne's disease) in goats in Greece. In: Proceedings of the XXth World Veterinary Congress, Thessaloniki, Greece, 1426–1428.

Liandris E, Gazouli M, Ikonomopoulos J (2009). Characterization of the caprine (*Capra hircus*) SLC11A1 gene: innate resistance to paratuberculosis. *Onl. J. Vet. Res.* 13(1): 41-52.

Liandris E, Gazouli M, Taka S, Andreadou M, Vaiopoulou A, Tzimotoudis N, Kasampalidis I, Mpaseas D, Fyliousis G, Poltronieri P, Cook N, Ikonomopoulos J (2014). Evaluation of the microbial safety of child food of animal origin in Greece. *J. Food Sci.* 79(3), M362–368. doi: 10.1111/1750-3841.12366.

Liu H, Mulholland N, Fu H, Zhao K (2006). Co-operative activity of BRG1 and Z-DNA formation in chromatin remodelling. *Mol. Cell. Biol.* 26(7), 2550-2559. doi: 10.1128/MCB.26.7.2550-2559.2006.

MacDiarmid SC (1988). Future options for brucellosis surveillance in New Zealand beef herds. *N. Z. Vet. J.* 36(1), 39-42. doi: 10.1080/00480169.1988.35472.

Marly J, Thorel MF, Perrin GG, Pardon P, Guerrault PJ (1988). Suivi de vaccination de chevrettes contre la paratuberculose: Consequences cliniques, serologiques et allergiques et epreuve virulente. In: Proceedings of the International Colloquium on Paratuberculosis, II; Laboratoire Central de Recherches Veterinaires. Maisons-Alfort. France. Edited by: Thorel MF, Merkal RS. International Association for Paratuberculosis, 99-109.

Marquetoux N, Heuer C, Wilson P, Ridler A, Stevenson M (2016). Merging DNA typing and network analysis to assess the transmission of paratuberculosis between farms. *Prev. Vet. Med.* 134, 113–121. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.014.

Marquetoux N, Mitchell R, Ridler A, Heuer C, Wilson P (2018). A synthesis of the patho-physiology of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in sheep to inform mathematical modelling of ovine paratuberculosis. *Vet. Res.* 49(1), 27. doi: 10.1186/s13567-018-0522-1.

Martin SW, Shoukri M, Thorburn MA (1992). Evaluating the health status of herds based on tests applied to individuals. *Prev. Vet. Med.* 14(1-2), 33–43.

Mataragka A, Leousi E, Liandris E, Ntafis V, Leontides L, Aggelidou E, Bossis I, Triantaphyllopoulos KA, Theodoropoulou I, Ikonomopoulos J (2017).

Faecal shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* reduces before parturition in sheep? *Small Ruminant Res.* 147, 32-36. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.11.017.

McGregor H, Dhand NK, Dhungyel OP, Whittington RJ (2012). Transmission of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis: dose–response and age-based susceptibility in a sheep model. *Prev. Vet. Med.* 107(1-2), 76–84. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.05.014.

Mijs W, de Haas P, Rossau R, Van der Laan T, Rigouts L, Portaels F, van Soolingen D (2002). Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* to bird-type isolates and *M. avium* subsp. *hominissuis* for the human/porcine type of *M. avium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1505–1518. doi: 10.1099/00207713-52-5-1505.

Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T, Hermon-Taylor J (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9), 3446–3452.

Mitchell RM, Schukken Y, Koets A, Weber M, Bakker D, Stabel J, Whitlock RH, Louzoun Y (2015). Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet. Res.* 46, 66. doi: 10.1186/s13567-015-0188-x.

More SJ, Sergeant ES, Strain S, Cashman W, Kenny K, Graham D (2013). The effect of alternative testing strategies and bio-exclusion practices on Johne's disease risk in test-negative herds. *J. Dairy Sci.* 96(3), 1581–1590. doi: 10.3168/jds.2012-5918.

Mutharia LM, Klassen MD, Fairles J, Barbut S, Gill CO (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *Int. J. Food. Microbiol.* 136(3), 340-344. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.026.

Naser SA, Sagramsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S (2014). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.* 20(23), 7403–7415. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7403.

Nebbia P, Robino P, Zoppi S, De Meneghi D (2006). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Res.* 66(1-3), 116–120. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.049.

Niegowska M, Delitala A, Pes GM, Delitala G, Sechi LA (2017). Increased seroreactivity to proinsulin and homologous mycobacterial peptides in latent autoimmune diabetes in adults. *PLoS One* 12(5), e0176584. doi: 10.1371/ journal.pone.0176584.

Nielsen SS, Toft N (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet. Microbiol.* 129(3-4), 217–235. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.12.011.

Nielsen SS. Toft N (2011). Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. *J. Dairy Sci.* 94(4), 1849–1857. doi: 10.3168/jds.2010-3817.

Nisbet DI, Gilmour NJ, Brotherston JG (1962) Quantitative studies of *Mycobacterium johnei* in tissues of sheep. III. Intestinal pathology. *J. Comp. Pathol.* 72, 80–91.

OIE - World Organization for Animal Health (2014). Chapter 2.1.11. Paratuberculosis (Johnes' disease), in: OIE Terrestrial Manual 2014.

Paccagnini D, Sieswerda L, Rosu V, Masala S, Pacifico A, Gazouli M, Ikonomopoulos J, Ahmed N, Zanetti S, Sechi LA (2009). Linking chronic infection and autoimmune diseases: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, SLC11A1 polymorphisms and type-1 diabetes mellitus. *PLoS One* 4(9), e7109. doi: 10.1371/journal.pone.0007109.

Pérez V, García Marín JF, Badiola JJ (1996). Description and classification of different types of lesion associated with natural paratuberculosis infection in sheep. *J. Comp. Pathol.* 114(2), 107–122.

Pérez V, Tellechea J, Badiola JJ, Gutiérrez M, García Marín JF (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 58(8), 799–803.

Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC (2001). The mannan-binding pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol. Immunol.* 38(2-3), 133-149.

Pierce ES (2010). Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain? *Gut Pathog*. 2(1), 21. doi: 10.1186/1757-4749-2-21.

Pierce ES (2018). Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis…and colorectal cancer? *Infect. Agent. Cancer* 13, 1. doi: 10.1186/s13027-017-0172-3.

Ponnusamy D, Periasamy S, Tripathi BN, Pal A (2013). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* invades through M cells and enterocytes across ileal and jejunal mucosa of lambs. *Res. Vet. Sci.* 94(2), 306–312. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.09.023.

Preziuso S, Magi GE, Renzoni G (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and mammary tissues and in lymph nodes of sheep with different techniques and its relationship with enteric lesions. *Small Rumin. Res.* 105(1-3), 295–299. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.11.015.

Pribylova-Dziedzinska R, Slana I, Lamka J, Pavlik I (2014). Influence of stress connected with moving to a new farm on potentially MAP-infected mouflons. *ISRN Microbiol.* 450130. doi: 10.1155/2014/450130.

Purdie AC, Plain KM, Begg DJ, de Silva K, Whittington RJ (2011). 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(3), 197–208. doi: 10.1016/j.cimid.2010.12.003.

Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, Bihl F, Erard F, Botha T, Drennan M, Soler MN, Le Bert M, Schnyder B, Ryffel B (2004). Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*. 6(10), 946–959. doi: 10.1016/j.micinf.2004.04.016.

Rast L, Whittington RJ (2005). Longitudinal study of the spread of ovine Johne's disease in a sheep flock in southeastern New South Wales. *Aust. Vet. J.* 83(4), 227–232.

Rathnaiah G, Zinniel DK, Bannantine JP, Stabel JR, Gröhn YT, Collins MT, Barletta RG (2017). Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne's Disease. *Front. Vet. Sci.* 4, 187. doi: 10.3389/fvets.2017.00187.

Reddacliff LA, Whittington RJ (2003). Experimental infection of weaner sheep with S strain *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 96(3), 247–258.

Reddacliff LA, McGregor H, Abbott K, Whittington RJ (2004). Field evaluation of tracer sheep for the detection of early natural infection with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Aust. Vet. J.* 82(7), 426–433.

Reddacliff LA, Beh K, McGregor H, Whittington RJ (2005). A preliminary study of possible genetic influences on the susceptibility of sheep to Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 83(7), 435-441.

Reddacliff LA, Eppleston J, Windsor P, Whittington R, Jones S (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Vet. Microbiol.* 115(1-3), 77–90. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.12.021.

Reyes LE, González J, Benavides J (2002). Nuevos adyuvantes en la vacunación frente a la paratuberculosis ovina. In: XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, SEOC; Spain. Edited by: Peris Palau B, P. MP, LA M, GM A. SEOC, 758-761.

Richardson GD, Links II, Windsor PA (2005). Gudair (OJD) vaccine self-inoculation: a case for early debridement. *Med. J. Aust.* 183(3), 151–152.

Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D (1998). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun.* 66(11), 5314-5321.

Rossiter CA, Burhans WS (1996). Farm-specific approach to paratuberculosis (Johne's disease) control. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12(2), 383–415. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30413-8.

Sechi LA, Rosu V, Pacifico A, Fadda G, Ahmed N, Zanetti S (2008). Humoral immune responses of type 1 diabetes patients to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lend support to the infectious trigger hypothesis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15 (2), 320-326. doi: 10.1128/CVI.00381-07.

Selvaraj P, Kurian SM, Uma H, Reetha AM, Narayanan PR (2000). Influence of non-MHC genes on lymphocyte response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens & tuberculin reactive status in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 112, 86-92.

Silva RA, Flórido M, Appelberg R (2001). Interleukin-12 primes CD4+ T cells for interferon-gamma production and protective immunity during Mycobacterium avium infection. *Immunology* 103(3), 368-374.

Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Gupta VK, Vihan VS (2007). Comparative efficacy of an indigenous 'inactivated vaccine' using highly pathogenic field strain of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ‘Bison type’ with a commercial vaccine for the control of Capri-paratuberculosis in India. *Vaccine* 25(41), 7102–7110. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.07.054.

Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Kumar N, Chaubey KK, Gupta S, Rawat KD, Kumar A, Bhatia AK, Srivastava AK, Dhama K (2014) ‘Bio-Load’ and Bio-Type Profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in the domestic livestock population endemic for Johne’s disease: a survey of 28 years (1985–2013) in India. *Transbound. Emerg. Dis*. 61(Suppl 1), 43-55. doi: 10.1111/tbed.12216.

Sisto M, Cucci L, D’Amore M, Dow TC, Mitolo V, Lisi S (2010). Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto’s thyroiditis. *Scand. J. Infect. Dis.* 42(10), 787–790. doi: 10.3109/00365541003762306.

Smeed JA, Watkins CA, Rhind SM, Hopkins J (2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Vet. Res.* 3, 18. doi: 10.1186/1746-6148-3-18.

Smith RL, Grohn YT, Pradhan AK, Whitlock RH, Van Kessel JS, Smith JM, Wolfgang DR, Schukken YH (2009). A longitudinal study on the impact of Johne’s disease status on milk production in individual cows. *J. Dairy Sci.* 92(6), 2653–2661. doi: 10.3168/jds.2008-1832.

Sohal JS, Singh SV, Subhodh S, Singh AV, Singh PK, Sheoran N, Sandhu K, Narayansamy K, Maitra A (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* diagnosis and strain typing-present status and future developments. *Indian J. Exp. Biol.* 45(10), 843-852.

Sohal JS, Singh SV, Tyagi P, Subhodh S, Singh PK, Singh AV, Narayanasamy K, Sheoran N, Singh SK (2008). Immunology of mycobacterial infections: with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Immunobiology* 213 (7), 585-598. doi: 10.1016/j.imbio.2007.11.002.

Sommerville EM, Wakelin RL, Hutton JB (1995). Vaccination of lambs at 3 to 4 months of age protects against Johne's disease. *PTBC Newsletter* 7, 25-29.

Spahr U, Schafroth K (2001). Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9), 4199–4205.

Stabel JR, Whitlock RH (2001). An evaluation of a modified interferon gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79(1-2), 69–81.

Stevenson K, Hughes VM, de Juan L, Inglis NF, Wright F, Sharp JM (2002). Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40(5), 1798–1804.

Stevenson K, Alvarez J, Bakker D, Biet F, de Juan L, Denham S, Dimareli Z, Dohmann K, Gerlach GF, Heron I, Kopecna M, May L, Pavlik I, Sharp JM, Thibault VC, Willemsen P, Zadoks RN, Greig A (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol.* 9, 212. doi: 10.1186/1471-2180-9-212.

Stevenson K (2015). Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Vet. Res.* 46, 64. doi: 10.1186/s13567-015-0203-2.

Stewart DJ, Vaughan JA, Stiles PL, Noske PJ, Tizard MLV, Prowse SJ, Michalski WP, Butler KL, Jones SL (2004). A long-term study in Merino sheep experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*: clinical disease, faecal culture and immunological studies. *Vet. Microbiol.* 104(3-4), 165–178. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.09.007.

Stringer LA, Wilson PR, Heuer C, Mackintosh CG (2013). A randomized controlled trial of Silirum vaccine for control of paratuberculosis in farmed red deer. *Vet.Rec*. 173(22), 551. doi: 10.1136/vr.101799.

Sweeney RW, Whitlock RH, Bowersock TL, Cleary DL, Meinert TR, Habecker PL, Pruitt GW (2009). Effect of subcutaneous administration of a killed *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* vaccine on colonization of tissues following oral exposure to the organism in calves. *Am. J. Vet. Res.* 70(4), 493-497. doi: 10.2460/ajvr.70.4.493.

Taka S, Liandris E, Gazouli M, Sotirakoglou K, Theodoropoulos G, Bountouri M, Andreadou M, Ikonomopoulos J (2013). In vitro expression of the SLC11A1 gene in goat monocyte-derived macrophages challenged with *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Infect. Genet. Evol.* 17, 8-15. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.033.

Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 21, 335–376. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.

Taylor DL, Zhong L, Begg DJ, de Silva K, Whittington RJ (2008). Toll-like receptor genes are differentially expressed at the sites of infection during the progression of Johne's disease in outbred sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124(1-2), 132–151. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.02.021.

Thirunavukkarasu S, Plain KM, Purdie AC, Whittington RJ, de Silva K (2017). IFN-γ fails to overcome inhibition of selected macrophage activation events in response to pathogenic mycobacteria. *PLoS One* 12(5), e0176400. doi: 10.1371/journal.pone.0176400.

Thonney ML, Smith MC (2005). Control of Johne's disease in sheep by vaccination. Preliminary Report. Cornell University, USA.

Timms VJ, Gehringer MM, Mitchell HM, Daskalopoulos G, Neilan BA (2011). How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *J. Microbiol. Methods* 85(1), 1–8. doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.026.

van Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays JP (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-1-4020-6241-4.

van Schaik G, Kalis CH, Benedictus G, Dijkhuizen AA, Huirne RB (1996). Cost-benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* 139(25), 624–627.

Verdugo C, Jones G, Johnson W, Wilson P, Stringer L, Heuer C (2014). Estimation of flock/herd-level true *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* prevalence on sheep, beef cattle and deer farms in New Zealand using a novel Bayesian model. *Prev. Vet. Med.* 117(3-4), 447–455. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.10.004.

Verna AE, Garcia-Pariente C, Munoz M, Moreno O, Garcia-Marin JF, Romano MI, Paolicchi F, Perez V (2007). Variation in the immuno-pathological responses of lambs after experimental infection with different strains of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Zoonoses Public Health* 54(6-7), 243–252. doi: 10.1111/j.1863-2378.2007.01058.x.

Waddell LA, Rajić A, Stärk KD, McEwen SA (2015). The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol. Infect.* 143(15), 3135–3157. doi: 10.1017/S095026881500076X.

Weiss DJ, Souza CD, Evanson OA, Sanders M, Rutherford M (2008). Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium. J. Leukoc. Biol*. 83(1): 48–55. doi: 10.1189/jlb.0707490.

Whitlock RH, Buergelt C (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 12(2), 345–356.

Whittington RJ, Reddacliff LA, Marsh I, McAllister S, Saunders V (2000). Temporal patterns and quantification of excretion of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in sheep with Johne's disease. *Aust. Vet. J.* 78(1), 34–37.

Whittington RJ, Sergeant E (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.* 79(4), 267–278.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5), 2989–3004.

Whittington RJ, Waldron A, Warne D (2010). Thermal inactivation profiles of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lamb skeletal muscle homogenate fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 137(1), 32-39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.009.

Whittington RJ, Marsh IB, Saunders V, Grant IR, Juste R, Sevilla IA, Manning EJB, Whitlock RH (2011). Culture phenotypes of genomically and geographically diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from different hosts. *J. Clin. Microbiol.* 49(5), 1822–1830. doi: 10.1128/JCM.00210-11.

Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Dhand NK, Plain KM (2017). Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). *BMC Vet. Res*. 13(1), 328. doi: 10.1186/s12917-017-1254-6.

Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN (2000). Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet*. 355(9204), 618-621. doi: 10.1016/S0140-6736(99)02301-6.

Williams AG, Withers SE (2010). Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. *Int. J. Dairy Technol.* 63(3), 356-369. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00596.x.

Windsor PA, Bush R, Links I, Eppleston J (2005). Injury caused by self-inoculation with a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature (Gudair) used for control of ovine paratuberculosis. *Aust. Vet. J.* 83(4), 216–220.

Windsor PA, Eppleston J (2006). Lesions in sheep following administration of a vaccine of a Freund's complete adjuvant nature used in the control of ovine paratuberculosis. *N. Z. Vet. J.* 54(5), 237–241. doi: 10.1080/00480169.2006.36704.

Windsor PA, Whittington RJ (2010). Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184(1), 37-44. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.01.007.

Windsor PA (2014). Managing control programs for ovine caseous lymphadenitis and paratuberculosis in Australia, and the need for persistent vaccination. *Vet. Med. Res. Rep.* 5, 11–21. doi: 10.2147/VMRR.S44814.

Windsor PA (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet. Microbiol.* 181(1-2), 161-169. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.019.