

Tesis Doctoral

Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina

Mon, María Laura

2015-03-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mon, María Laura. (2015-03-27). Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mon, María Laura. "Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-27.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Laura Mon

Directora: Dra. María Isabel Romano

Directora Asistente: Dra. María de la Paz Santangelo

Consejero de estudios: Dra. Verónica García

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología. INTA Castelar.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la concreción de este trabajo de Tesis:

A mi Directora de Tesis, Marisa, por haberme dado la oportunidad y el espacio para poder desarrollar esta tesis, confiar en mí y ayudarme a crecer profesionalmente en el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar.

A Andrea por estar siempre, y sobre todo en los momentos más difíciles, dándome calma y motivándome.

A Paz, por la codirección y ayudarme a mejorar la tesis en estos últimos años, transmitiéndome sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio, Marian, Ale, Dami, Vale y Nati, por la ayuda y los momentos compartidos en estos años, soportando mis llantos y mis risas, siendo amigos más que compañeros.

A toda el Área de Bacterias del IB, por los consejos y por la buena predisposición siempre. Principalmente a Vale Rocha, sin la cual mucho de este trabajo no podría haber sido posible.

A Kari, Martín y Mariano, por sus consejos tan sabios y por estar siempre dispuestos a ayudar, y transmitir sus conocimientos.

A Vani, por la amistad y los momentos compartidos durante este camino que transitamos juntas.

Al Instituto de Biotecnología, por las instalaciones prestadas, por la buena onda de la gente, a los directores y secretarias.

Al CONICET y al FONCyT, por brindarme los medios para realizar esta tesis de doctorado.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que me permitió realizar el doctorado.

En lo personal también quiero agradecer a mis padres, por transmitirme la pasión al trabajo, el estudio, por apoyarme en esta carrera y por estar siempre que los necesite. A ellos les dedico mi Tesis.

A mis hermanos y mis cuñadas, por apoyarme siempre en esta carrera y darme unos sobrinos hermosos.

A mis amigas, Flor, Ire, Cyn y Marian por estar siempre, escucharme y alentarme en los momentos difíciles.

Gracias

RESUMEN

“Nuevas estrategias para el diagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina”

La Tuberculosis (TBB) y Paratuberculosis bovina (PTB) son las principales enfermedades que limitan el desarrollo de la industria lechera y de la carne en Argentina, siendo importantes en el contexto de la Sanidad animal debido a las grandes pérdidas económicas que producen en el ganado bovino.

La TBB es producida por *M. bovis*. El hospedador primario es el bovino, pero otras especies de interés económico, así como también especies salvajes se infectan con esta micobacteria. La TBB es considerada una de las zoonosis más importantes en Argentina, siendo más expuestos los trabajadores rurales y de frigorífico, así como, los que consumen leche cruda sin pasteurizar. No existen vacunas comerciales contra la TBB, por lo tanto disponer de métodos de diagnóstico confiables para la identificación de los animales enfermos es esencial. La prueba oficial de diagnóstico más empleada, aprobada por el SENASA, es la intradermoreacción (IDR) con PPD-B, la cual consiste en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado de la cepa de *M. bovis* AN5 (PPD-B), y la posterior medición de la reacción de hipersensibilidad retardada producida. La PPD-B es una mezcla de componentes, principalmente proteínas y lípidos de *M. bovis*. El principal inconveniente de la IDR radica en que algunas proteínas presentes en la PPD-B se encuentran en otras micobacterias, lo cual disminuye la especificidad, ya que animales sensibilizados por exposición previa a otras micobacterias también responden a este reactivo. En la última década se desarrollaron nuevas pruebas para el diagnóstico de tuberculosis, la más difundida consiste en la medición de IFN- γ luego de la estimulación de linfocitos con PPD-B o antígenos específicos de *M. bovis*. Otro método utilizado para el diagnóstico de TBB es la prueba de ELISA, sin embargo esta sólo permite detectar animales en estados severos de la enfermedad o en estado de anergia.

Por otro lado, la PTB es una enfermedad infecciosa, producida por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), la cual se caracteriza por una enteritis crónica que resulta en un deterioro progresivo del animal enfermo. Afecta principalmente al ganado bovino, ovino y caprino. El diagnóstico de certeza de PTB es el aislamiento de MAP, pero este es un microorganismo de crecimiento muy lento. Por estas razones, los métodos inmunológicos para el diagnóstico de PTB resultan más efectivos para aplicar en una campaña de erradicación de la enfermedad que el cultivo. El diagnóstico inmunológico de PTB es principalmente serológico debido a que en estadios tempranos de la enfermedad se detectan anticuerpos. Contrariamente a lo que sucede con TBB, el diagnóstico serológico en PTB permite detectar con mayor especificidad los animales infectados que las pruebas que miden respuesta celular. Actualmente hay varios kits comerciales serológicos disponibles con diferentes antígenos, pero estos han demostrado discrepancia en la capacidad de ser detectados por todos los animales infectados. También hay vacunas comerciales disponibles para PTB, pero estas no son utilizadas en nuestro país debido a que interfieren con el diagnóstico de TBB.

Por lo mencionado, en este trabajo se identificaron y evaluaron antígenos específicos de *M. bovis* y MAP para mejorar el diagnóstico de ambas enfermedades y poder contar en el futuro con herramientas que permitan la utilización de vacunas en desarrollo para la erradicación de la TBB y PTB.

Para este fin, se identificaron por técnicas de proteómica, antígenos en aquellas fracciones proteicas más inmunogénicas de la PPD-B. A partir de las proteínas identificadas, se evaluaron 2 mezclas de antígenos altamente inmunogénicos identificados ya en trabajos previos en nuestro laboratorio, ESAT-6, CFP-10, MPB-83, MPB-70, HSPX y TB10.3. Además de ser altamente inmunogénicos ESAT-6 y CFP-10 tienen la ventaja de que no se encuentran en la vacuna BCG, con lo cual son útiles para un diagnóstico DIVA (diferenciando vacunados de infectados). Estas mezclas resultaron ser más específicas que la PPD-B al no ser detectadas por animales vacunados con BCG, ni animales con PTB o sanos. Para mejorar la sensibilidad de estas mezclas se incluyeron otras proteínas identificadas en este estudio, no estudiadas hasta el momento: FixB y CFP2. Las nuevas mezclas incluyendo a estas proteínas, fueron evaluadas por las técnicas de IFN- γ e IDR, en animales naturalmente infectados con *M. bovis*, animales con PTB y animales sanos. En base a estos resultados, se observó que FixB aumentó la sensibilidad de las mezclas sin comprometer la especificidad. Luego estas mezclas fueron evaluadas en una prueba serológica, siendo detectadas también específicamente por los sueros de animales infectados con *M. bovis*. Nuestros resultados demuestran que una nueva mezcla compuesta por las proteínas recombinantes CFP-10, ESAT-6, MPB83 y FixB, es un promisorio nuevo reactivo para aplicar al diagnóstico específico de TBB tanto celular como serológico, sin interferencias con animales sensibilizados con otras micobacterias o vacunados con BCG.

En cuanto la evaluación de antígenos de MAP para utilizar en el diagnóstico de PTB, se evaluó un panel de 51 antígenos por la técnica de MAPIA. Esto permitió seleccionar 7 antígenos específicos: Map2513, Map1693c, Map2020, Map0038, Map1272, CSP, Map0210c, los cuales fueron detectados específicamente por los sueros de animales con PTB. En base a esto, se realizó una mezcla con los 7 antígenos (M1-PTB), la cual se evaluó también por MAPIA.

Por otra parte se identificaron proteínas antigénicas a partir de PPD-A (Derivado proteico purificado a partir de *M. avium* por técnicas de proteómica identificándose 3 proteínas las cuales también se evaluaron por la técnica de MAPIA, conformando una segunda mezcla (M2-PTB). esta mezcla resultó sensible, pero no específica. Luego M1-PTB y M2-PTB fueron evaluadas con mayor cantidad de sueros de animales con PTB y con un grupo de animales con TBB por la técnica de ELISA, comparando con el ELISA convencional PPA-3 que utiliza un antígeno protoplasmático de MAP. M1-PTB tuvo sensibilidad del 33% y no exhibió reacción cruzada con sueros de animales sanos y la reactividad con el suero de animales con TBB fue muy baja mostrando una mayor especificidad que el ELISA-PPA-3. El panel de 51 antígenos también fue evaluado por la técnica de IFN- γ , ningún antígeno de MAP demostró capacidad de liberar esta citoquina en valores que permitan su utilización en un test que mida respuesta celular.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que varios antígenos específicos tanto de *M. bovis* como de MAP pueden mejorar la detección de la infección pudiendo permitir además el uso de vacunas tanto contra PTB como TBB, sin que estas interfieran en el diagnóstico.

ABSTRACT

"New strategies for the diagnosis of bovine tuberculosis and paratuberculosis "

Tuberculosis (TBB) and bovine paratuberculosis (PTB) are the main diseases that limit the development of dairying and beef in Argentina, being important in the context of animal health, due to the large economic losses that occur in cattle.

TBB is produced by *M. bovis*. The primary host is cattle but other species of economic interest as well as wild species are infected with this mycobacterium. TBB is considered one of the most important zoonoses in Argentina where rural workers and those who consume raw unpasteurized milk are primarily exposed. There are no commercial vaccines against TBB therefore having reliable diagnostic methods its essential. The official diagnostic test, approved by SENASA is the tuberculin test (IDR), which involves intradermal inoculation of a purified protein derivative of *M. bovis* strain AN5 (PPD-B), and subsequent measuring of the delayed hypersensitivity reaction. PPD-B is a mixture of components, proteins and lipids from *M. bovis*. The main disadvantage of the IDR is that some proteins present in the PPD-B are in others mycobacteria, which decreases the specificity, since animals sensitized by previous exposure to other mycobacteria also respond to this reagent. In the last decade, new tests for the diagnosis of tuberculosis were developed; the most widespread is the measurement of IFN- γ after lymphocyte stimulation with PPD- B or specific *M. bovis* antigens. Another method used for TBB- diagnosis is the ELISA, but this only allows detecting anergic animals in severe disease states.

Furthermore, PTB is an infectious disease caused by *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), which is characterized by chronic enteritis resulting in a progressive deterioration of the animal. Primarily affects cattle, sheep and goats. Definitive diagnosis of PTB is the isolation of MAP, but this is a very slow growing organism. For these reasons, immunological methods for PTB diagnosis are more effective to implement in a campaign to eradicate the disease than culture. Immunological PTB diagnosis is primarily serologic because in the early stages of the disease antibodies are detected. Contrary to what happens with TBB, serological PTB diagnosis has a greater specificity to detect infected animals than cellular response test. Currently, several serological commercial kits are available with different antigens, but these have shown discrepancy in the ability to detect all infected animals. There are also commercial PTB-vaccines available, but these are not used in our country because they interfere with TBB diagnosis.

In this study *M. bovis* and MAP specific antigens were identified and evaluated to improve the diagnosis of both diseases and to have tools in the future that allow the use of vaccines in development for the eradication of TBB and PTB.

For this purpose, antigens were identified by proteomic techniques in those immunogenic PPD-B protein fractions. From this, 2 mixtures composed by highly immunogenic antigens

identified in previous studies in our laboratory, ESAT-6, CFP-10, MPB-83, MPB-70, HSPX and TB10.3, were evaluated. Besides, being highly immunogenic ESAT-6 and CFP-10 have the advantage of not to found in BCG, thereby serve as a diagnostic DIVA (differentiating vaccinated from infected). These mixtures were more specific than PPD-B not reacting with BCG-vaccinated animals, or PTB-infected or healthy animals. To improve the sensitivity of these cocktails, two unknown proteins, CFP2 and FixB were included. These new cocktails were evaluated by IFN- γ release assay and IDR. Based on these results, it was observed that FixB increased the sensitivity without compromising the specificity. Our results demonstrate that a novel mixture comprising the recombinant proteins CFP-10, ESAT-6, MPB83 and FixB, is a promising new reagent for specific diagnosis applied to both cellular and serological TBB without interference with other mycobacteria sensitized animals. Thus, the mixture can be used for diagnosis of TBB, and also applied in BCG vaccinated animals without interfering.

As the evaluation of MAP antigens for PTB-diagnosis, a panel of 51 antigens was evaluated by MAPIA (multi-print antigen immunoassay). This allowed selecting 7 specific antigens: Map2513, Map1693c, Map2020, Map0038, Map1272, CSP, and Map0210c. Based on this, a mixture with the seven antigens (M1-PTB) was performed, which was also evaluated by MAPIA.

Moreover, PPD-A antigenic proteins were identified by proteomic techniques. Three proteins from these were also evaluated by the technique of MAPIA, forming a second mixture (M2 -PTB).

After this, both cocktails were evaluated with greater amount of sera from MAP and *M. bovis* infected animals by ELISA, comparing with conventional ELISA-PPA-3 using a *M. avium* protoplasmic antigen. M1-PTB had a sensitivity of 33% and exhibited no cross-reaction with healthy animals and the reactivity of TBB animals was very low, being more specific than ELISA-PPA-3. The panel of 51 antigens was also evaluated by the technique of IFN- γ , any antigen was very immunogenic to allow their use in a test to measure cellular response.

The results presented in this thesis suggest that several specific *M. bovis* and MAP antigens can improve the detection of infection and also allow the use of vaccines for both PTB as TBB, without interfering with the diagnosis.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Search for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis antigens for the diagnosis of Paratuberculosis.

Mon ML, Viale M, Baschetti G, Alvarado Pinedo F, Gioffré A, Travería G, Willemsen P, Bakker D, Romano MI.

Veterinary Medicine International. 2012; 2012:860362. doi: 10.1155/2012/860362. Epub 2012 Jun 24.

Evaluation of cocktails with recombinant proteins of Mycobacterium bovis for a specific diagnosis of bovine tuberculosis.

Mon ML, Moyano RD, Viale MN, Colombatti Olivieri MA, Gamieta IJ, Montenegro VN, Alonso B, Santangelo Mde L, Singh M, Duran R, Romano MI.

Biomed Research International. 2014;2014:140829. doi: 10.1155/2014/140829. Epub 2014 Jul 8.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	4
ABSTRACT	7
PUBLICACIONES	10
ÍNDICE GENERAL	12
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ÍNDICE DE TABLAS	20
ABREVIATURAS Y SIGLAS	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Tuberculosis y Paratuberculosis bovina: infecciones micobacterianas de relevancia en el ámbito local y mundial	28
2. Situación de la Tuberculosis y Paratuberculosis bovina en la República Argentina	29
3. Impacto económico	31
4. Importancia zoonótica de <i>M. bovis</i> y MAP	32
5. Clasificación	34
5.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
5.2 Complejo <i>Mycobacterium avium intracellulare</i> (MAIC)	37
6. Características de las infecciones: Tuberculosis y Paratuberculosis bovina	38
7. Respuesta inmune del hospedador	40
8. Métodos de Diagnóstico	43
8.1 Diagnóstico Post Mortem	43
8.2 Diagnóstico Ante-Mortem	44
9. Avances en el diagnóstico de infección y su relación con la generación de vacunas	60
10. Proteínas antigénicas del género <i>Mycobacterium</i>	61
10.1 Antígenos de <i>M. bovis</i>	62
10.2 Antígenos de <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	63
MATERIALES Y MÉTODOS	70
1. Generales	71
1.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo	71
1.2. Plásmidos y proteínas utilizadas en este estudio	73
1.3. Técnicas de Biología Molecular	74

1.4. Animales	79
1.5. Métodos de Diagnóstico	81
1.6. Métodos gráficos y estadísticos	83
2. Identificación, caracterización y evaluación de antígenos de <i>M. bovis</i>	84
2.1. Obtención de una PPD-B a partir del sobrenadante de cultivo de <i>M. bovis</i> y su utilización para la identificación de nuevos antígenos	84
2.2. Separación de las fracciones proteicas a partir de la preparación de PPD-B	84
2.3. Identificación de antígenos de la PPD bovina por espectrometría de masas	84
2.4. **Protocolo de clonado de los antígenos Fixb y CFP2	86
2.5. Purificación de las proteínas recombinantes de <i>M. bovis</i>	86
3. Identificación, caracterización y evaluación de antígenos a partir de PPD-A y MAP	87
3.1. Identificación de proteínas de PPD-A por MALDI-TOF	87
3.2. Análisis bioinformático	87
3.3. ELISA para diagnóstico de PTB	88
RESULTADOS	89
PARTE I	90
1) Identificación y caracterización de antígenos contenidos en el derivado proteico purificado de <i>M. bovis</i> (PPD-B)	90
1a) Obtención de las distintas fracciones proteicas de la PPD-B	90
1b) Evaluación de la inmunogenicidad de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la PPD-B	91
1bi) Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i> o vacunados con BCG	91
1bii) Evaluación de las fracciones de PPD-B por Intradermoreacción (IDR) en cobayos sensibilizados con <i>M. bovis</i> o con <i>M. avium</i> (MAV)	93
1c) Identificación proteica de las fracciones seleccionadas de la PPD-B por espectrometría de masas	95
2) Evaluación de las proteínas identificadas a partir de la PPD-B	97
2a) Evaluación de las proteínas de la PPD-B caracterizadas previamente como inmunogénicas	98
2ai) Evaluación de M1 y M2 por el ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i> o vacunados con BCG	98
2aii) Evaluación de M1 y M2 por el ensayo de liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con <i>M. bovis</i> y en un rodeo infectado con MAP	100

2a)iii) Evaluación de la potencia biológica de M1 y M2 por IDR en cobayos sensibilizados con <i>M. bovis</i> y con <i>M. avium</i>	101
2a)iv) Evaluación de M1 y M2 por intradermoreacción (IDR) en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i>	103
2b) Evaluación de las proteínas de la PPD-B aún no caracterizadas en bibliografía, CFP2 y FixB	105
2b)i) Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes FixB y CFP2...	105
2b)ii) Evaluación de la inmunogenicidad celular de las proteínas CFP2 y FixB <i>ex vivo</i> mediante el ensayo de liberación de IFN- γ	106
2b)iii) Evaluación de los nuevos antígenos adicionados a M1 y M2 mediante liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB	108
2b)iv) Evaluación de las nuevas mezclas mediante liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con PTB y en un rodeo libre de TBB y PTB.....	111
2b)v) Evaluación de M1-FixB por el ensayo de liberación de IFN- γ e IDR en animales infectados con <i>M. bovis</i>	112
2c) Evaluación serológica de los antígenos de <i>M. bovis</i>	116
2c)i) Evaluación de las mezclas de antígenos de <i>M. bovis</i> por la técnica de MAPIA.....	116
PARTE II	120
1) Evaluación de antígenos de MAP y antígenos contenidos en el derivado proteico purificado de <i>M. avium</i> (PPD-A).....	120
1a) Caracterización de antígenos de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	121
1b) Evaluación del panel de antígenos de MAP para el diagnóstico serológico de paratuberculosis	126
1b)i) Características y evaluación de los siete antígenos de MAP seleccionados por la técnica de MAPIA	129
1c) Caracterización y evaluación de antígenos contenidos en la PPD-A	131
1c)i) Evaluación serológica de la mezcla de antígenos identificados a partir de la PPD-A por la técnica de MAPIA.....	133
1c)ii) Evaluación de las mezclas de antígenos de MAP por la técnica de ELISA	134
1d) Evaluación del panel de 51 antígenos de MAP en el diagnóstico inmunológico celular in vitro (ensayo de IFN- γ) en un rodeo con PTB.....	135
DISCUSIÓN	139
IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS CONTENIDOS EN EL DERIVADO PROTEICO PURIFICADO BOVINO (PPD-B)	140

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS DE <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) Y ANTÍGENOS CONTENIDOS EN EL DERIVADO PROTEICO PURIFICADO AVIAR (PPD-A)	150
CONCLUSIÓN	156
BIBLIOGRAFÍA.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS
Introducción

Figura 1. Distribución de la TBB a nivel establecimientos en Argentina.....	30
Figura 2. Árbol filogenético de Micobacterias basado en la secuencia RNAr 16s.....	36
Figura 3. Lesiones de TBB y PTB.....	44
Figura 4. Ziehl-Neelsen.....	46
Figura 5. Prueba tuberculínica.....	50
Figura 6. Dispositivo utilizado para la técnica de MAPIA.....	59

Materiales y Métodos

Figura 7. Inoculación intradérmica en cobayo.....	81
Figura 8. Nano-HPLC.....	85

Resultados**Parte I**

Figura 9. SDS-PAGE y tinción con <i>coomassie blue</i> de las distintas fracciones de la PPD-B.....	90
Figura 10. Respuesta de liberación de IFN- γ inducida por las fracciones de la PPD-B en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i> y vacunados con BCG.....	92
Figura 11. Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i> y vacunados con BCG.....	99
Figura 12. Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con <i>M. bovis</i> y en un rodeo infectado con MAP.....	100
Figura 13. Respuesta de hipersensibilidad retardada en cobayos.....	102
Figura 14. Respuesta de hipersensibilidad retardada en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i>	104
Figura 15. Figura 18. SDS-PAGE 15% de purificación de la proteína FixB.....	106
Figura 16. SDS-PAGE 15% de purificación de la proteína CFP2.....	106

Figura 17. Evaluación de los antígenos FixB y CFP2 en la prueba de liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB y en un rodeo naturalmente infectado con PTB.....	107
Figura 18. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos por IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB.....	109
Figura 19. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos por IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con MAP y en rodeo libre de TBB y PTB.....	112
Figura 20. Evaluación de M1-FixB por IDR y ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i> 90 dpi.....	113
Figura 21. Evaluación M1-FixB por IDR y ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con <i>M. bovis</i>	115
Figura 22. Evaluación serológica de las mezclas con los antígenos de <i>M. bovis</i> por la técnica de MAPIA.....	117
Figura 23. Evaluación serológica de las mezclas con los antígenos de <i>M. bovis</i> por la técnica de MAPIA a los distintos tiempos post-infección.....	118
Figura 24. Evaluación serológica de M1-FixB por la técnica de ELISA.....	119
Parte II	
Figura 25. SDS-PAGE de las proteínas recombinantes seleccionadas de MAP.....	129
Figura 26. MAPIA con los 7 antígenos de MAP (MAP 0038, MAP 0210c, MAP 1272, MAP 1693, MAP 2020, MAP 0209c y MAP 2513) aplicados de forma individual y su combinación en una mezcla por la técnica de MAPIA.....	130
Figura 27. Análisis de las proteínas de la PPD-A. Tinción con azul de <i>Coomasie</i> y <i>Western blot</i>	132
Figura 28. Evaluación de los antígenos identificados a partir de PPD-A por la técnica de MAPIA.....	133
Figura 29. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos para el diagnóstico de PTB por la técnica de ELISA.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS
Introducción

Tabla 1. Genes únicos y compartidos entre las principales especies micobacterianas.....	61
---	----

Materiales y Métodos

Tabla 2. Plásmidos y proteínas utilizadas en este estudio.....	73
--	----

Resultados**Parte I**

Tabla 3. Evaluación de las fracciones de la PPD-B por intradermoreacción (IDR) en cobayos sensibilizados con <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i> (MAV).....	94
---	----

Tabla 4. Proteínas identificadas por espectrometría de masas.....	96
---	----

Tabla 5. Composición de las mezclas antigénicas M1 y M2.....	98
--	----

Tabla 6. Resultados de los bovinos experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i>	104
---	-----

Tabla 7. Análisis de similitud de los nuevos antígenos identificados de <i>M. bovis</i> con respecto a otras micobacterias.....	105
---	-----

Tabla 8. Valores de IDO obtenidos frente a las diferentes mezclas de antígenos en el ensayo de liberación de IFN- γ en un primer muestreo en un rodeo naturalmente infectado con <i>M. bovis</i>	109
---	-----

Tabla 9. Valores de IDO obtenidos frente a las diferentes mezclas de antígenos en el ensayo de liberación de IFN- γ en un segundo muestreo en un rodeo naturalmente infectado con <i>M. bovis</i>	110
--	-----

Tabla 10. Resultados de segunda experiencia en bovinos experimentalmente infectados.....	114
--	-----

Tabla 11. Intensidad de los <i>spots</i> obtenidas por la técnica de MAPIA para las mezclas de antígenos de <i>M. bovis</i>	117
---	-----

Parte II

Tabla 12. Caracterización bioinformática del panel de 54 antígenos potenciales de MAP evaluados en el presente estudio.....	122
---	-----

Tabla 13. Intensidad de los <i>spots</i> obtenidas por la técnica de MAPIA para el panel de antígenos de MAP.....	127
Tabla 14. Reactividad de sueros bovinos frente a un panel de antígenos seleccionados de MAP.....	128
Tabla 15. Intensidad de los <i>spots</i> obtenidas por la técnica de MAPIA para la mezcla de antígenos de MAP.....	131
Tabla 16. Reactividad de sueros bovinos frente a la mezcla de antígenos seleccionados de MAP.....	131
Tabla 17. Proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de la PPD-A.....	132
Tabla 18. Intensidad de los <i>spots</i> obtenidas por la técnica de MAPIA para la mezcla de antígenos identificados a partir de PPD-A.....	134
Tabla 19. Evaluación de los antígenos de MAP por el ensayo de IFN- γ en animales naturalmente infectados con MAP.....	136
Tabla 20. Evaluación de los antígenos de MAP por el ensayo de IFN- γ en animales experimentalmente infectados con <i>M. bovis</i>	138

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa	Aminoácidos
ABTS	Ácido 3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACN	Acetonitrilo
AGID	<i>Agar gel immunodiffusion</i> / inmunodifusión en agar gel
APS	Amonio persulfato
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fostato
BLAST	Del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BREFA	<i>Buffer</i> de revelado de fosfatasa alcalina
CFP-10	<i>Culture Filtrate Protein of 10 kDa</i>
cm	Centímetros
col	Colaboradores
CTAB	Del inglés <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
Da	Dalton
DIVA	Del inglés <i>differentiating infected from vaccinated individuals</i>
DO	Densidad óptica
dpi	Días post infección
dpv	Días post vacunación
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ESAT-6	Antígeno <i>Target</i> de Secreción Temprana de 6 kDa
FC	Fijación de complemento
FCEyN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
gr	Gramos
HPLC	Del ingles <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
hs	Horas
Hsp	<i>Heat Shock protein</i>
IDO	Índice de densidad óptica
IDR	Intradermoreacción
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
m	Masa
M	Molar
M1	Mezcla 1 de TBB
M2	Mezcla 2 de TBB
M1-FixB	Mezcla 1 adicionada con FixB

ABREVIATURAS Y SIGLAS

M1-CFP2	Mezcla 1 adicionada con CFP2
M1-PTB	Mezcla 1 de PTB
M2-PTB	Mezcla 2 de PTB
mA	Miliamperes
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MAIC	<i>Mycobacterium avium intracellulare complex</i>
MALDI-TOF	Del inglés <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time of flight</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
MAPIA	<i>Multi antigen print immunoassay</i>
MAV	<i>Mycobacterium avium</i>
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
n	Número
N	Normal
Nro.	Número
NaCl	Cloruro de Sodio
NBT	Del inglés <i>Nitroblue tetrazolium</i>
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
O.N	Del inglés <i>Over night/ durante la noche</i>
ORF	Del inglés <i>Open Reading frame/</i> marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Del inglés <i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	Del inglés <i>Polimerase chain reaction/</i> Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pi	Post-inoculación
PM	Peso molecular
PMSF	Del inglés <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PPA-3	<i>Paratuberculosis Protoplasmic Antigen</i>
PPD-B	Derivado proteico purificado bovino
PPD-A	Derivado proteico purificado aviar
PTB	Paratuberculosis bovina
PWM	Del inglés <i>Pokeewed mitogen</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Del inglés <i>Sodium dodecil sulphate/</i> dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/</i> electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
seg	Segundos
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
t	Tiempo
T	<i>tween</i>

ABREVIATURAS Y SIGLAS

TB	Tuberculosis
TBB	Tuberculosis bovina
TBS	Del inglés <i>tris buffered saline</i>
TCA	Ácido tricloroacético
Temed	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	<i>T helper</i>
TNF- α	<i>Tumoral necrosis factor alpha</i> / factor de necrosis tumoral alfa
UBA	Universidad de Buenos Aires
UE	Unidades enzimáticas
UFC	Unidades formadoras de colonias
μg	Microgramo
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
v	Volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

1. Tuberculosis y Paratuberculosis bovina: infecciones micobacterianas de relevancia en el ámbito local y mundial

La Tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial producida por *Mycobacterium bovis*. Esta es una infección crónica que afecta principalmente a las vías respiratorias provocando un deterioro del estado general de salud, tos y a la larga la muerte. Aunque se considera que el verdadero hospedador es el ganado vacuno también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales domésticos y no domésticos. Aunque en algunos países desarrollados se encuentra erradicada o con niveles próximos a la erradicación, en otros países como la Argentina continúa siendo una enfermedad endémica que afecta sobre todo a las cuencas lecheras. Las repercusiones económicas que esta infección supone para las explotaciones ganaderas, el potencial zoonótico y las implicancias legales debido a las restricciones para el comercio, la convierten en uno de los principales desafíos de la sanidad animal a nivel mundial. Por este motivo, muchos países han implementado programas de control o erradicación basados en el diagnóstico y la eliminación de los animales detectados como positivos. La mayoría de los países han realizado grandes esfuerzos para establecer filtros sanitarios, como la inspección en los mataderos y la obligatoriedad de la pasteurización de la leche, encaminados a eliminar el riesgo de las micobacterias para la población general [1].

Por otro lado, la Paratuberculosis bovina (PTB) es una enteritis granulomatosa crónica e infecciosa que afecta principalmente a rumiantes además de un amplio rango de animales no rumiantes, como equinos, cerdos, conejos, roedores, primates no humanos y especies silvestres. Esta infección es producida por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Muchos investigadores asocian a MAP con la enfermedad de Crohn, una enterocolitis granulomatosa que afecta a humanos [2]. Las características de resistencia a factores físicos y químicos de MAP y su adaptabilidad a diferentes hospedadores hacen que sea poco probable que haya regiones libres como algunos países reivindican. Si bien existen vacunas contra MAP, su uso está restringido a regiones libres de TBB, ya que interfieren con el diagnóstico de esta enfermedad. En nuestro país por ejemplo, su utilización no está permitida, ya que su aplicación debería realizarse acompañada de un diagnóstico diferencial de TBB Y PTB. La determinación de la prevalencia de ambas enfermedades es subestimada considerándose sólo las formas clínicas avanzadas y no las infecciones subclínicas, ya que

el diagnóstico temprano es difícil, siendo estas últimas formas de infección justamente las más frecuentes [3].

El alto impacto económico de las infecciones por *M. bovis* y MAP, su importancia en la salud pública y la interferencia que existe en el diagnóstico de ambas enfermedades muestran la necesidad de profundizar en el diagnóstico de estas enfermedades para contribuir a su control y erradicación.

2. Situación de la Tuberculosis y Paratuberculosis bovina en la República Argentina

La prevalencia de TBB en Argentina se estima en base a la realización de las pruebas tuberculínicas y la posterior detección de animales con lesiones compatibles con TBB, tanto en los frigoríficos con inspección federal como en los mataderos provinciales y municipales. En Argentina, la población bovina es de aproximadamente 50 millones de cabezas, con respecto a la producción láctea, el país cuenta con 2 millones de vacas en ordeño. [4]. Cabe destacar que el 62,87% de los bovinos del país se encuentran en las cuencas lecheras de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba donde se concentran el 21 % de los rodeos lecheros nacionales que producen el 34% de la producción láctea de Argentina, siendo las zonas con las mayores tasas de prevalencia de TBB del país (Figura 1) [4]. Nuestro grupo de trabajo realiza investigación sobre tuberculosis bovina desde el año 1995 y recibe periódicamente consultas de veterinarios que abordan establecimientos de cría y especialmente lecheros, con problemáticas muy serias de esta enfermedad. Es frecuente encontrar prevalencias mayores al 30% e incluso mortandad en animales en la guachera, siendo menores a 60 días de edad. Otros autores en nuestro país, también hallaron lesiones en terneros que apenas superaban los 90 días de vida [5]. En 1999, Noste y col. observaron un 83,3% de tambos positivos y un 5,69% de animales reaccionantes en una cuenca lechera del sur de la provincia de Santa Fe [6]. Estudios de prevalencia comparando dos cuencas lecheras de la provincia de Córdoba, arrojaron resultados muy dispares. En uno de ellos, Navarro, F. y col (1997) observaron un 71% de establecimientos infectados y el 12,3% de animales positivos [7]. Por otro lado, Magnano, G. y col. (1997) encontraron prevalencias del 30,8% y 2,1% para tambos y animales respectivamente [8]. Estas diferencias estarían sustentadas principalmente por un

elevado movimiento de animales en la cuenca de mayor prevalencia. Datos a nivel nacional recolectados en frigoríficos, en el año 2009, sobre unas 13.500.000 cabezas faenadas, el 0,9% presentaron lesiones tuberculosas [9]. Es importante resaltar que los registros con que se cuentan a nivel provincial y nacional por lo general pertenecen a establecimientos que de alguna manera están aplicando medidas de saneamiento, ya que se encuentran incluidos dentro de los planes nacionales de control y erradicación, especialmente si hablamos de rodeos lecheros. No ocurre lo mismo al querer evaluar datos de prevalencia en establecimientos que por distintas razones no están incluidos en estos planes. Según la información suministrada por el área estadística de la dirección de contralor del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), sobre un promedio de faena anual que oscila entre 9 y 13 millones de bovinos, las prevalencias de TBB detectadas entre 1969-2012 fluctuaron entre 6,7 % y 0,3% respectivamente [10]. Sin embargo, esta información es sesgada dado que no todos los animales se faenan en establecimientos con control oficial de SENASA.

En el caso de paratuberculosis, la seroprevalencia de la enfermedad en bovinos varía entre un 2,5% y 51,5%, siendo este valor dependiente de la región de Argentina evaluada (EEA-INTA Balcarce, 2003). Los establecimientos afectados corresponden principalmente a aquellos enfocados en la producción lechera donde los porcentajes de seroprevalencia se hallan entre el 14,4% y 43,7% [11]. Cabe destacar que en la Argentina no existe ningún plan de control y erradicación de PTB como en el caso de la TBB, con lo cual no se cuenta con datos oficiales de prevalencia de esta enfermedad.



Figura 1. Distribución de la TBB a nivel establecimientos en Argentina. SENASA. 2009 [9]

3. Impacto económico

La paratuberculosis y tuberculosis bovina, son enfermedades de interés veterinario y zoonótico que causan cuantiosas pérdidas económicas directas en la industria bovina de producción lechera, de carne y de sus derivados. También se estiman pérdidas económicas indirectas debido a la disminución de los valores de comercialización de los animales y de sus subproductos en el mercado interno y en la exportación. A nivel mundial, se estiman pérdidas de US\$ 3 billones anuales debido a la TBB [12]. Las pérdidas anuales directas e indirectas debidas a la TBB en Argentina fueron estimadas en US\$ 55 millones (SENASA, 1988), produciendo pérdidas estimadas del 18% en la producción lechera. Esto es consecuencia de la demora de la aparición de la primera lactancia en un 10% y de la reducción de la duración de la lactancia entre un 5 y 20% con respecto a los animales sanos [10]. Además de la disminución del volumen de leche que se obtiene diariamente en los animales infectados, la calidad de los subproductos se ve afectada debido a la disminución de la cantidad de grasa obtenida. Por otro lado, el ganado infectado con TBB es decomisado en mataderos y frigoríficos inspeccionados por SENASA; el porcentaje de los animales decomisados es el 1,3% de los animales faenados, siendo la faena anual aproximada de 12 millones de cabezas [10].

Con respecto a PTB, también existe una importante pérdida económica en la producción ganadera, como en la industria láctea y cárnica. En 1963 la FAO concluyó que la PTB era una de las enfermedades que más seriamente afectaba a la industria bovina [11]. La oficina internacional de epizootias (OIE) estableció que las pérdidas económicas directas por PTB son de 250 millones de dólares/año en Estados Unidos. En Argentina se realizó una aproximación de las pérdidas económicas relacionadas con la PTB, tomando en cuenta los datos de prevalencia obtenidos por la EEA-Balcarce (INTA); considerándose las pérdidas que afectan a los productores, a la industria y a los involucrados en la comercialización, concluyendo en un valor aproximado de US\$ 22 millones para la zona de cría de la Cuenca del Salado y de US\$ 6,3 millones para las cuencas lecheras de la provincia de Buenos Aires (1992). Este es el único trabajo de esta magnitud realizado en Argentina [11]. En investigaciones realizadas en otros países, se ha concluido que la pérdida de peso de bovinos que sufren la infección es de aproximadamente 33,4 kg por debajo de la media al

compararse con animales no infectados; mientras que la tasa de mortalidad aumenta en un 3% respecto de los sanos [13].

4. Importancia zoonótica de *M. bovis* y MAP

La tuberculosis humana (TB) se produce principalmente por la infección con *M. tuberculosis*. Sin embargo, *M. bovis*, el agente etiológico de la tuberculosis bovina, también puede ser responsable de la enfermedad en los seres humanos; lo que hace a esta bacteria una especie zoonótica principalmente para trabajadores de tambos, veterinarios, carniceros, personal de la industria frigorífica y todo aquel que se encuentre en contacto con animales o que consuma leche no pasteurizada. Antes de la pasteurización de la leche, *M. bovis* solía ser una causa importante de la tuberculosis humana, ya que gran número de micobacterias son secretadas en la leche de los animales con mastitis tuberculosa y sólo el tratamiento térmico de la leche cruda utilizando protocolos convencionales de pasteurización, asegura la adecuada eliminación de la bacteria. La literatura médica sobre la incidencia de la tuberculosis zoonótica está marcada por numerosas descripciones clínicas de casos, pero hay muy pocos estudios sistemáticos a nivel nacional de la incidencia de *M. bovis* [14, 15, 16, 17]. Dos situaciones actuales plantean a *M. bovis* como un serio riesgo aún en países con baja prevalencia de TBB. Una es el número creciente de personas en todo el mundo infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que las predispone a enfermedades que se han reconocido como enfermedades emergentes y re-emergentes, causadas principalmente por agentes oportunistas, tales como *Mycobacterium* sp. El primer brote de *M. bovis* multiresistente fue documentado en pacientes hospitalizados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [18]. Este brote alerta sobre el riesgo que significa la presencia de animales infectados con *M. bovis*, sobre todo en países donde animales enfermos y personas con SIDA coexisten. En segundo lugar, la tuberculosis zoonótica ha vuelto a surgir en países desarrollados, debido a inmigrantes procedentes de regiones donde la TBB es endémica [19]. A nivel global, la incidencia de TBB en humanos es heterogénea. En muchos países desarrollados fue erradicada hace 30–40 años gracias a campañas fuertes basadas en la prueba tuberculínica y en el sacrificio obligatorio de animales positivos. Actualmente, la infección en humanos causada por *M. bovis* en países desarrollados representa alrededor de 1% de todos los casos de TB [20]. Ocurre en personas de edad avanzada por reactivación de antiguas infecciones o en inmigrantes de países donde

la TB bovina no ha sido erradicada [21]. En Argentina, fue realizado un estudio de incidencia de tuberculosis zoonótica en la provincia de Santa Fe, donde *M. bovis* fue identificado en 2,4% de pacientes humanos con TB, 64% de ellos eran trabajadores de mataderos o rurales [22].

La ausencia de diferencias clínicas entre TB causada por *M. tuberculosis* y *M. bovis* es la principal razón de la falta de información con respecto a la contribución de *M. bovis* a la carga global de TB. Otro factor importante es el tipo de medio utilizado para cultivar muestras humanas de pacientes sospechados de tuberculosis; la mayoría de los laboratorios utilizan exclusivamente Lowenstein–Jensen (LJ), medio suplementado con glicerol, que no promueve el crecimiento de *M. bovis*. Además, para muchos países de bajos ingresos, un cultivo de micobacterias es siempre una opción costosa en comparación con la coloración ácido-alcohol resistente que es más barata y rápida, pero que no permite diferenciar las micobacterias. En nuestro laboratorio realizamos un estudio durante 2004–2005, sobre 448 muestras de esputos de pacientes con diagnóstico de TB [23]. Se realizó una PCR diferencial que permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, y los resultados mostraron que el 2% de las TB pulmonares fueron debido a *M. bovis*. Registrándose en este mismo trabajo la transmisión persona–persona de una cepa de *M. bovis* multiresistente a las drogas de primera línea contra la TB. Este caso ocurrió entre convivientes, que no presentaban enfermedades que comprometieran su sistema inmune [23].

Con respecto a MAP, muchos trabajos sostienen que tendría un papel zoonótico por su asociación con la enfermedad de Crohn, una inflamación intestinal crónica humana, la cual podría darse por el consumo de productos de origen bovino, por ejemplo lácteos pasteurizados, dada la resistencia térmica que presenta MAP [24, 25]. En varios estudios se ha aislado la bacteria de pacientes con la enfermedad de Crohn, sin embargo también ha sido encontrado en pacientes con otras enfermedades y en personas sanas [26]. Con lo cual su papel zoonótico hasta el día de hoy no se ha elucidado del todo. Recientemente un investigador japonés desarrollo un modelo animal, en el cual demuestra que estos conejos expuestos a antígenos de MAP pueden desencadenar colitis, por lo que concluye que los antígenos de MAP podrían desencadenar la enfermedad de Crohn en individuos susceptibles [27].

Los animales infectados que excretan MAP y los reservorios de vida silvestre contribuyen a la contaminación del medio ambiente con la micobacteria. MAP puede sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente a diferencia de *M. bovis*, por lo tanto es inevitable que los seres humanos que comparten las mismas áreas geográficas con animales que están infectados, estén expuestos a este patógeno [26]. Asimismo, hay que tener en cuenta que por la contaminación ambiental se ha visto la llegada de MAP al agua de los ríos [26] y por su resistencia a la pasteurización también se ha aislado MAP de leche comercial [28] e inclusive en leche en polvo maternizada [29]. Estos hallazgos hacen pensar que la leche y subproductos de origen animal serían posibles agentes para la transmisión de la infección de los animales al humano. En nuestro país se ha encontrado la presencia de MAP en productos lácteos de consumo y ha sido relacionada con la resistencia del microorganismo a la pasteurización, lo que enfatiza el rol de los alimentos como vía de transmisión al humano [28].

5. Clasificación

Las micobacterias pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Este género está formado por más de 150 especies de bacilos rectos, aerobios, débilmente Gram-positivos, inmóviles, con un alto contenido en G+C (60-70%) [30, 31]. Algunos de ellos son patógenos importantes para personas y animales como se mencionó anteriormente, destacando entre ellos los agentes etiológicos de TB, PTB y la lepra. En la estructura de la pared celular de las micobacterias se destaca el alto contenido lipídico, muchos de ellos específicos del género. Esta les confiere su característica ácido-alcohol resistencia, y por lo tanto, la necesidad de aplicar técnicas de tinción especiales, como la tinción de Ziehl-Neelsen y de auramina. La pared es también responsable en parte de la patología que causan y de su resistencia a determinadas condiciones medioambientales. Las micobacterias ambientales pueden metabolizar compuestos hidrofóbicos como lípidos e hidrocarburos. Esto está sustentado por la inusual cantidad de genes involucrados en el catabolismo lipídico presentes en el genoma micobacteriano, que es aproximadamente 5 veces que la presente en *Escherichia coli*. La hidrofobicidad es un factor que permite la unión de las micobacterias al material particulado. Los bacilos con características hidrofóbicas son

fácilmente aerosolizados y los aerosoles son el principal mecanismo de distribución para las micobacterias ambientales que tienen acceso por vía pulmonar al hospedador [32].

La hidrofobicidad de las micobacterias se debe a la composición de su pared celular constituida por tres capas. La más interna compuesta por peptidoglicano cuya estructura es similar a la de otras bacterias; la capa media, más gruesa que la anterior, compuesta por arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las micobacterias (70-90 átomos de carbono); la capa externa, de grosor variable, posee glicolípidos y lipoglicanos como LAM y gran variedad de formas glicosiladas derivadas de fosfolípidos como el fosfatidilinositol manosidos (PIMs). También contiene poliquétidos como el fenilftiocerol, el cual forma un complejo con el ácido micocerósico para construir el fenilftiocerol-dimicocerosato (PDIM). Estos complejos determinan una capa hidrofóbica que es responsable de la impermeabilidad hacia compuestos hidrofílicos. Otro compuesto de las micobacterias son los micolatos de trehalosa, los cuales son ácidos micólicos unidos a una trehalosa, que cuando están acetilados constituyen parte de la trehalosa dimicolato (TDM) o factor cuerda o parte del ftiocerol dimicocerosato (DIM). El factor cuerda se encuentra en la capa periférica de la envoltura siendo abundante en todas las micobacterias patógenas, recibe ese nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones.

La clasificación actual de las micobacterias se basa en la velocidad de crecimiento, la patología que producen y en algunas características bioquímicas y moleculares. Respecto a la velocidad de crecimiento, se clasifican en micobacterias de crecimiento rápido, que forman colonias visibles entre dos a siete días, y las de crecimiento lento, que necesitan más de 15 días para formar colonias, y en algunos casos, requieren más de tres o seis meses. La mayoría de las micobacterias de crecimiento rápido son saprófitas; mientras que la mayoría de las micobacterias de crecimiento lento pueden ser patógenas. Desde un punto de vista práctico, también se agrupan de acuerdo a la patología que producen, como el complejo *M. tuberculosis*, el complejo *M. avium*, micobacterias no cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*), y un amplio grupo denominado micobacterias atípicas. El cultivo bacteriológico se considera la prueba definitiva de diagnóstico; sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas micobacterias tienen requerimientos nutricionales complejos y una

velocidad de crecimiento extremadamente lenta. Además, el cultivo no da una evidencia exacta de la identidad de la micobacteria que se encuentra en el cultivo. Por este motivo, se requiere de técnicas moleculares para su mejor clasificación, como la secuenciación del ARNr 16S entre otras (Figura 2).

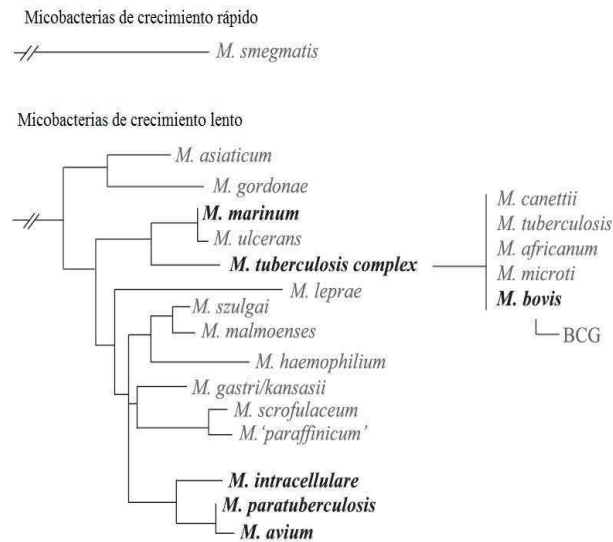


Figura 2. Árbol filogenético de Micobacterias basado en la secuencia ARNr 16s. [33]

5.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El complejo *M. tuberculosis* incluye las especies responsables de la tuberculosis de los seres humanos y los animales mamíferos. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de curso crónico, caracterizada por la aparición de lesiones granulomatosas en diversos órganos, principalmente pulmón, linfonódulos u otros órganos. Este complejo es un grupo de especies muy homogéneo desde el punto de vista genético y taxonómico, de hecho, podrían ser consideradas subespecies desde un punto de vista estricto, ya que tienen una similitud del 99% en el gen que codifica el ARNr 16S. Hasta la fecha, el complejo está formado por *M. canetti*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. bovis* y la cepa vacunal *M. bovis* BCG. [34, 35]. La evaluación mediante PCR y secuenciación del gen *hsp65*, codificante de la proteína de shock térmico de 65 kDa, demuestra que existe una alta similitud entre las bacterias del complejo. Sin embargo, esta región es polimórfica al compararla con el resto de las micobacterias, por lo que su amplificación y análisis de restricción del producto amplificado (PCR-REA) permite

diferenciar las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* del resto de las micobacterias, aunque no distingue entre las micobacterias dentro del complejo [36].

5.1.1 *Mycobacterium bovis*

M. bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina. Su principal hospedador es el bovino, aunque puede provocar tuberculosis en un amplio rango de hospedadores como otras especies domésticas (pequeños rumiantes, cerdo), de fauna salvaje y animales de compañía (perros y gatos); como se mencionó anteriormente puede infectar al humano. Pertenece a las micobacterias de crecimiento lento con un tiempo aproximado de generación de 16 a 20 hs.

A partir de una cepa de *M. bovis*, se generó la cepa vacunal *M. bovis* BCG (bacilo Calmette-Guérin), a través del cultivo y sub-siembra sucesiva por 13 años en medio papa-glicerol, lo que originó la atenuación de la cepa. Uno de los eventos relacionados en este proceso es la delección de la región RD1 [37].

En el año 2003 se obtuvo la secuencia genómica completa de la cepa *M. bovis* AF2122/97 proveniente de un bovino infectado [38]. La misma posee un contenido de GC del 65,6%, 4.345.492 pares de bases, identificándose 3.941 genes codificantes para proteínas, siendo en un 99,95% idéntica con el genoma de *M. tuberculosis* [38].

5.2 Complejo *Mycobacterium avium intracellulare* (MAIC)

Para apreciar mejor la variabilidad natural entre organismos de este complejo, es más seguro considerar el MAIC como un microcosmos del género micobacteriano que incluye tanto micobacterias ambientales como patógenos asociados a hospedadores con sus propias identidades genómicas [39, 40]. *M. avium* y *M. intracellulare* pertenecen al grupo de micobacterias clasificadas como el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAIC), un grupo de organismos genotípica y fenotípicamente relacionados, patogénicos para las poblaciones humanas y animales. Basados en análisis bioquímicos y de ADN, *M. avium* puede ser subdividido en las siguientes subespecies: *M. avium* subsp. *avium* (MAA), MAP, *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) y *M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS). Estas últimas micobacterias comprenden el complejo MAC (*Mycobacterium avium complex*). MAA

produce lesiones granulomatosas en diversos tipos de aves, afectando especialmente animales en centros de recuperación y aviarios. MAH frecuentemente causa infección en pacientes inmunocomprometidos y también produce lesiones granulomatosas localizadas en los ganglios de la cabeza y sistema digestivo de cerdos, asociada a contaminación con fuentes ambientales; como esta bacteria afecta también a personas, se ha sugerido una relación zoonótica apoyada por técnicas moleculares, aunque este hecho no está absolutamente demostrado. Por otro lado, se ha descrito que MAS produce lesiones granulomatosas en palomas, pero su inoculación experimental en bovinos mostró que esta bacteria también puede producir lesiones en estos animales [41].

5.2.1 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis

MAP es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne, afecta principalmente a rumiantes, tal como los bovinos, ovejas, cabras, búfalos, alpacas y llamas. MAP es un patógeno intracelular que se caracteriza por ser un bacilo corto de un tamaño entre 0.5 μm a 1-2 μm . Para su aislamiento en medio de cultivo, es necesaria la adición de micobactina, sustancia que media el transporte de hierro entre el medio de cultivo y el bacilo. Se caracteriza por ser de crecimiento extremadamente lento, siendo necesario entre 3 y 4 meses para su aislamiento inicial en medio de cultivo.

En el año 2005 se finalizó la secuenciación del genoma de la cepa MAP K-10, obtenida a partir de un aislamiento bovino [42]. La misma posee un contenido de GC del 69,3%, con 4.829.781 pares de bases que codifican para 4.350 marcos abiertos de lectura [42]. Aproximadamente el 1,5% del genoma de MAP corresponde a secuencias de inserción, familias de multigenes y genes duplicados [43]. Al comparar los resultados de la secuenciación de los genomas de especies de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, podemos citar, que MAP posee el mayor número de genes codificantes para proteínas funcionales.

6. Características de las infecciones: Tuberculosis y Paratuberculosis bovina

Tanto la TBB como PTB son enfermedades infecciosas crónicas progresivas. En el caso de la TBB, la sintomatología puede variar de acuerdo a los órganos y los sistemas afectados

por el microorganismo, siendo la infección pulmonar la más frecuente. Las hembras en estado de preñez, parición y alta producción lechera son un grupo en riesgo de contraer la enfermedad. Los animales jóvenes constituyen también un grupo de riesgo ya que pueden contraer fácilmente la enfermedad al estar expuestos a animales infectados o al consumir leche contaminada. La enfermedad se caracteriza por la pérdida de peso progresiva afectando directamente la producción de leche y carne; debilidad, agrandamiento de los nódulos linfáticos y tos en etapas avanzadas de la enfermedad [6]. Como parte de la patología se pueden desarrollar granulomas, lesiones características que se pueden presentar en pulmones, región retrofaríngea, nódulos linfáticos mediastinales y bronquiales, en ocasiones en hígado, bazo, membrana serosa y glándulas mamarias. Habiendo o no patología en la glándula mamaria, los bacilos pueden ser eliminados por leche, ya que se ha observado que los animales con mastitis tuberculosa contienen gran cantidad de micobacterias en la leche. En estos casos, la vía oral a través de consumo de leche contaminada por los terneros es la principal forma de transmisión de la enfermedad [5].

En el caso de PTB, esta infección se caracteriza por ser una enteritis granulomatosa donde la principal ruta de ingreso de la bacteria es la vía oral a través de las heces contaminadas de animales infectados [44]; también puede ocurrir mediante la ingestión de leche o calostro contaminado con el microorganismo [45]. Los animales contraen la enfermedad a edad temprana, luego desarrollan la infección en un período de 2 a 5 años post-ingreso de la bacteria al organismo, y finalmente se manifiesta en la etapa adulta. La sintomatología de los animales enfermos se caracteriza por una infección afebril, que produce pérdida de peso progresiva, diarrea que no cesa y edema submandibular al final de la enfermedad. Los signos y síntomas desarrollados en la enfermedad son un reflejo de la mala absorción intestinal debido al daño del epitelio y mucosa intestinal y de los defectos en la fermentación en el colon, además de la presencia de diarrea.

La existencia de cuatro estadios de la infección por MAP describe en parte, la complejidad de la misma. La primera etapa se caracteriza por una infección silenciosa, sin síntomas clínicos, donde no hay, o existen cantidades mínimas de micobacterias que pueden ser detectadas. En algunos casos, la infección puede ser puesta en evidencia mediante pruebas basadas en la respuesta inmune mediada por células. En la segunda etapa, la fase subclínica, no hay signos visibles de la enfermedad pero los animales pueden eliminar

intermitentemente a la bacteria en sus heces. Los animales adultos pueden tener anticuerpos detectables contra MAP y/o una respuesta inmune celular y puede arrojar un número bajo a moderado de la bacteria en sus excreciones. En esta etapa, una parte de los animales infectados son detectables por las técnicas de diagnóstico disponibles. En la tercera fase, aparecen los signos clínicos tales como la pérdida de peso y diarrea. La mayoría de los animales resultan positivos al cultivo fecal, y a las pruebas serológicas. La cuarta etapa es la etapa final de la enfermedad que se caracteriza por un estadio clínico avanzado con síntomas como adelgazamiento, deshidratación con una importante eliminación de MAP en heces. Estos animales son fáciles de identificar por cultivo de materia fecal y pruebas serológicas, pudiendo extraerlos del rodeo de inmediato para evitar la diseminación de la enfermedad [46].

7. Respuesta inmune del hospedador

M. bovis ingresa al organismo del hospedador principalmente por vía aérea: nasal y/o traqueal y por el consumo de leche contaminada. La ingesta de agua, fómites y pasto contaminados constituye también una ruta de ingreso del organismo al hospedador [47].

La infección ocurre principalmente en los macrófagos alveolares y probablemente en las células dendríticas intersticiales [48], donde *M. bovis* es capaz de sobrevivir y replicarse y desde allí extenderse a otros sitios [49]. Las células dendríticas presentan los antígenos micobacterianos a los linfocitos T e inducen por este medio una respuesta protectora de tipo celular. Aunque las células dendríticas no son los blancos primarios para la infección por micobacterias, su función específica en la respuesta inmune celular hace que éstas participen como moduladores inmunopatológicos. Se postula que una respuesta inmune eficaz contra la infección de la tuberculosis se basa principalmente en el desarrollo de una respuesta celular T *helper* 1 (Th1) [48, 50, 51]. La respuesta inmune adaptativa T CD4 +, CD8 + y $\gamma\delta$ implica la activación de células dendríticas específicas, que migran desde el sitio de la infección en los alvéolos al drenaje linfático [52]. La producción de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) por células dendríticas (CD) o macrófagos infectados con *M. bovis* contribuye al desarrollo de células Th1 [51, 53, 54]. Por otro lado, la respuesta de T *helper* 2 (Th2) inducida por la infección *M. bovis* contrarresta la respuesta Th1, suprimiendo la respuesta inmune mediada por

células y aumentando la respuesta humoral a medida que la enfermedad progresa. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-10. Un número de estudios han determinado la contribución de las respuestas Th1 y Th2 a la protección inmune y la patología de la infección por *M. bovis* [51, 55, 56]. Así como también otros trabajos demostraron que las células CD4⁺, CD8⁺ y las células T $\gamma\delta$ son los subconjuntos predominantes de células T que participan en la defensa contra la infección por *M. bovis* y esta se evidencia en respuesta a la estimulación de la sangre de animales infectados con PPD-B [50, 52].

La respuesta humoral se desarrolla en estadios avanzados de la enfermedad, a la vez que la respuesta celular disminuye, pudiendo llegar al estado de anergia donde no es detectable la respuesta mediada por células. Por lo tanto, es importante la medición de los títulos de anticuerpos en el diagnóstico de TBB, ya que permite la detección de animales en estadios avanzados de la enfermedad, fuente de contagio para otros animales.

En el caso de MAP, la bacteria infecta el intestino a través de las células M, que recubren las placas de Peyer en la superficie del epitelio de la mucosa intestinal del íleon distal [57]. Las placas de Peyer constituyen órganos linfoides primarios en el íleon de rumiantes y están compuestos principalmente por macrófagos y linfocitos. Luego de la internalización del bacilo en la mucosa intestinal, la infección se propaga mediante la migración de los macrófagos infectados a los nódulos linfáticos regionales, donde se inicia la respuesta inmune adquirida frente al patógeno. También se describió que MAP puede infectar a través de los enterocitos con la misma eficiencia que a través de las células M en modelos murinos [58]. En la infección temprana con MAP los numerosos macrófagos infectados en las Placas de Peyer comienzan a producir citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y IL-8, que atraen a neutrófilos, linfocitos y macrófagos para que fagociten los bacilos extracelulares, y además generan un foco inflamatorio [59, 60]. Posteriormente, los linfocitos T CD4⁺ *naive* se transforman en linfocitos Th1 bajo la influencia de IL-12 secretada por las células presentadoras de antígenos (que pudieron degradar eficientemente a MAP y migraron a los linfonódulos locales). Estos linfocitos tras su activación secretan otras citoquinas, principalmente IFN- γ . Esta citoquina activará los macrófagos infectados, inducirá la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno y favorecerá la eliminación de la bacteria. Sin embargo, mientras se desencadena esta respuesta inmune innata, los

bacilos se van diseminando hacia los nódulos linfáticos regionales y los vasos sanguíneos. Se ha atribuido un papel importante en la resolución de la infección a las citoquinas producidas por Th1, mientras que a las células Th2 con la producción de IL-4 e IL-10 se han asociado con el control del proceso inflamatorio que podría afectar al hospedero (pudiendo causar la muerte). Las células Th1 proliferan y pasan a circulación periférica y presumiblemente migran a los sitios donde hay infección por MAP por acción de la IL-8 producida por los macrófagos infectados y, a su vez, estos son activados por el IFN- γ que producen los linfocitos T. En un esfuerzo para detener el daño tisular debido a las respuestas inflamatorias locales, comienza a proliferar una población de células T (Th2 CD4⁺) que producen, además de IL-10 e IL-4, TGF β e IL-2 y aparece también una población de células citotóxicas (CD8⁺), la cual también colabora en el control de la infección. Recordemos que aparecen en el curso de la infección las células T reguladoras para el control de la respuesta inflamatoria [61]. El fenotipo citotóxico “*natural killer*” (NK) se da principalmente en animales jóvenes, apareciendo tempranamente en las lesiones, en circulación sanguínea y en leche de bovinos infectados con MAP, con lo cual se lo ha propuesto como un posible marcador de infección temprana [62], mostrando aumento del título de anticuerpos y disminución de la inmunidad celular y de niveles de IFN- γ . En un primer momento la respuesta inmune celular periférica constituye el mecanismo inicial de protección mientras que la respuesta humoral se asocia con la progresión de la enfermedad ocurriendo mayor migración de macrófagos y liberación de antígenos que activan los linfocitos B. Las lesiones denominadas lepromatosas ocurren en los últimos estadios de la enfermedad y su aparición se relaciona con la disminución de la respuesta celular y el aumento de la respuesta humoral, pudiendo ser determinados títulos altos de anticuerpos [63]. En apoyo de esto, se han observado aumentos en la expresión de genes de citoquinas de tipo Th2 en animales con la enfermedad multibacilar mientras que las lesiones de tipo paucibacilares están asociadas con un perfil inmunológico Th1 [64]. Bajo un examen más detallado se ha visto en rumiantes en estadio temprano de paratuberculosis, una respuesta de anticuerpos y producción de IL-10 [65]. Además, se ha observado que los patrones de transición de Th1 a Th2 varían dramáticamente entre individuos [62]. La patología de la infección por MAP se desarrolla a un ritmo diferente en los distintos animales a medida que la respuesta Th1 disminuye [61]. Aunque la mayoría de

los casos clínicos tienen la enfermedad bacilar múltiple, algunos animales se enferman con lesiones graves paucibacilares, demostrando que el síndrome clínico puede ser debido a la respuesta inmune celular en lugar del número de micobacterias *per se* [66].

La complejidad de los distintos estadios de ambas enfermedades como de la respuesta inmunológica frente a la infección con *M. bovis* o MAP, hacen el diagnóstico complejo.

8. Métodos de Diagnóstico

El control y erradicación de TBB y PTB depende principalmente de los métodos de diagnóstico. Aunque la prueba de referencia diagnóstica es el aislamiento de la bacteria mediante el cultivo bacteriológico, existen diferentes pruebas diagnósticas para detectar animales o rodeos infectados. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas varían según el estadio de la enfermedad de los animales que se evalúan. La correcta elección y aplicación de cada una de estas pruebas asegura el éxito del diagnóstico y permite establecer un programa de control. Dentro de los métodos de diagnóstico, estos se pueden clasificar en post-mortem y ante-mortem.

8.1 Diagnóstico Post Mortem

El diagnóstico post-mortem se basa en el examen macroscópico y microscópico de las lesiones características de ambas enfermedades, como la formación de granulomas en los distintos tejidos afectados para la subsecuente confirmación de la enfermedad.

8.1.1 Necropsia e Histopatología

En el caso de TBB, en la necropsia, las muestras para cultivo se deben recolectar de los ganglios linfáticos anormales y de los órganos afectados como los pulmones, el hígado y el bazo (Figura 3).

En el caso de PTB, en la necropsia se puede visualizar una mucosa ileal corrugada, aumento de volumen de nódulos linfáticos mesentéricos y engrosamiento de los vasos linfáticos mesentéricos (Figura 3).

Se puede realizar un diagnóstico presuntivo por histopatología y/o demostración microscópica de bacilos ácido-alcohol resistentes en los tejidos afectados. Los frotis provenientes de muestras clínicas o tejidos se pueden teñir con colorante de Ziehl/ Neelsen,

fluorescente ácido-resistente o técnicas de inmunohistoquímica [67, 68, 69]. También hibridación *in situ* con IS900 [70, 71, 72].

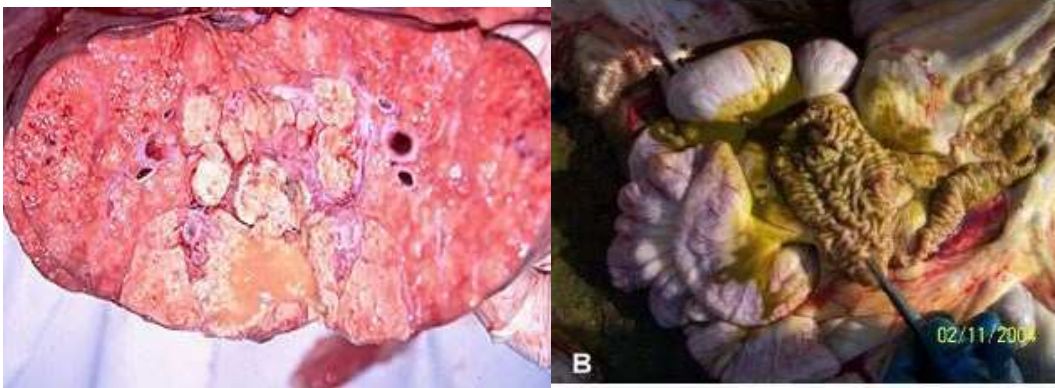


Figura 3. Lesiones de TBB y PTB. a la derecha se puede observar pulmón de bovino con lesiones producidas por *M. bovis*, a la izquierda la mucosa intestinal de vaca con PTB. Adaptado de Cirone 2007 [27].

8.2 Diagnóstico Ante-Mortem

Existen 2 tipos de ensayos usados para el diagnóstico *ante mortem* de ambas enfermedades: los que detectan a la bacteria (Directos) y los que detectan la respuesta inmunológica frente a la infección (Indirectos).

8.2.1. Técnicas de diagnóstico directas

Dentro de las técnicas directas se encuentran las bacteriológicas, como el cultivo a partir del aislamiento de la bacteria y la visión microscópica de las micobacterias mediante la coloración de Ziehl-Nielsen.

8.2.1.1 Técnicas bacteriológicas

8.2.1.1.1 Cultivo

El cultivo tradicional de *M. bovis* es utilizado rutinariamente como apoyo en el diagnóstico de la TBB en el laboratorio. Esta es considerada la técnica estándar de oro para confirmar la presencia del agente etiológico en la muestra clínica analizada. La muestra que se utiliza mayormente para el diagnóstico por cultivo de TBB es el órgano afectado, por lo tanto constituye un diagnóstico *post mortem* como se mencionó anteriormente. Además, dicho procedimiento resulta extremadamente lento, pudiendo insumir en algunos casos hasta dos

meses para arribar a un resultado. Es conocido también que la sensibilidad del cultivo no es del 100%, pudiendo ocurrir falsos negativos, esto puede estar sujeto a la calidad de la muestra remitida, como al método de decontaminación utilizado. Rutinariamente se utiliza el método de decontaminación de Petroff, el cual es muy agresivo, afectado a la viabilidad de un gran número de micobacterias [73]. El cultivo de MAP, a partir de heces o tejidos, es considerado la prueba de oro para detectar animales infectados [74]. La sensibilidad estimada del cultivo fecal es de 33% y su especificidad de 100% [75]. Una desventaja del uso de métodos de cultivo convencionales es el largo período de incubación necesario para el desarrollo de la bacteria ya que se requiere de hasta 20 semanas de incubación, dependiendo del hospedador del cual proviene el aislamiento. La variación en la sensibilidad es otro aspecto a considerar. Esto último puede deberse por un lado a la dificultad que presentan algunas cepas para su desarrollo *in vitro* y por el otro, al entrenamiento del operador. El agregado de aditivos, como el piruvato, al medio de cultivo ha mostrado ser a la vez favorecedor [76] e inhibidor [77] del crecimiento de ciertos aislamientos de MAP. Los métodos de cultivo tradicionales utilizan el medio con yema de huevo de Herrold (HEYM) suplementado con micobactina J, un agente quelante que ayuda a la bacteria a adquirir el hierro que necesita para su crecimiento [78]. Un número creciente de micobacterias han sido identificadas con características bioquímicas idénticas, esto deja a la identificación bioquímica como un método inefectivo. En el pasado, MAP era diferenciado de MAA y MAS por su dependencia de la micobactina, pero en la actualidad existen aislamientos de MAP que poseen independencia de micobactina para su crecimiento [79].

Los métodos de cultivo, con el monitoreo automático de subproductos metabólicos marcados con ^{14}C , como BACTEC (radiométrico) y BACTEC MGIT (*mycobacteria growth indicator tube*)(no radiométrico), que utiliza un sensor de consumo de oxígeno que produce fluorescencia, son una forma de cultivo más rápida ya que un cultivo positivo puede ser detectado antes de la formación visual de las colonias bacterianas con una mayor sensibilidad y especificidad comparado con los métodos de cultivo convencionales [80, 81], estos métodos modernos de cultivo se utilizan tanto para *M. bovis*/*M. tuberculosis* como para MAP. Una comparación entre medio 7H10 con Tween y el medio HEYM mostró la detección de MAP a los 27 y 49 días respectivamente utilizando el sistema BACTEC [82].

Stich y colaboradores evaluaron el sistema automatizado no radiométrico basado en medio sólido, y hallaron que era considerablemente más sensible y más rápido que el uso de HEYM para la detección de MAP en heces de bovinos [83]. Desafortunadamente, los ensayos automatizados requieren de una mayor inversión en equipamiento.

8.2.1.1.2. Ziehl-Nielsen

La observación microscópica de las micobacterias a través de la coloración específica de Ziehl-Neelsen, se basa en que estos bacilos son ácido alcohol resistentes (BAAR), esta metodología se puede realizar tanto a partir de tejido, como de cultivo o materia fecal en el caso de la PTB. Esta técnica a pesar de ser rápida, carece de sensibilidad, ya que puede detectar micobacterias en concentraciones mayores a 10.000 células por mililitro, y la concentración de micobacterias es generalmente menor principalmente en muestras de tejidos de bovinos [84]. Cabe mencionar además, que el resultado tampoco es específico, ya que no permite definir ni concluir la especie micobacteriana [85]. Sin embargo, la observación de lesiones compatibles, sintomatología y la presencia de BAAR, son importantes indicadores de TBB o PTB.

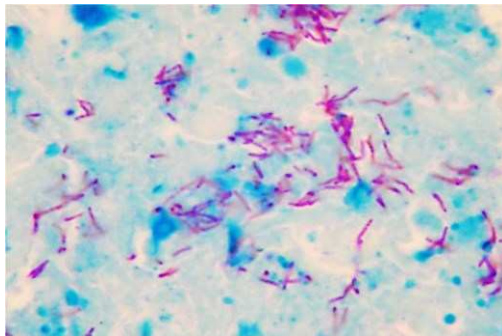


Figura 4. Bacilos ácido alcohol resistentes en fucsia, teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen.

8.2.1.2 Métodos moleculares

En los últimos años, los métodos moleculares como diagnóstico tanto de TBB como de PTB han mejorado sustancialmente. Por otra parte, los avances en la caracterización molecular también han proporcionado nuevas herramientas para mejorar el conocimiento de la epidemiología y el control de ambas enfermedades.

En el caso de la TBB, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la secuencia específica de inserción *IS6110*, presente en múltiples copias

en el genoma de *M. bovis* (10-20 copias) [86]. Diferentes estudios han demostrado la potencialidad de la PCR a partir de diversas muestras clínicas en la detección de la TBB, con resultados comparables al cultivo, pero en un tiempo menor [87, 88]. Sin embargo, se tienen problemas de inhibición, como de baja recuperación de ADN a partir de las muestras, por lo tanto también se ha intentado mejorar esta técnica tratando de utilizar otras metodologías para la extracción de ADN como la separación inmunomagnética. Actualmente, hay una gran diversidad de sistemas comerciales para extracción de ADN a partir de diferentes tipos de tejidos, como también a partir de sangre o leche, los cuales suelen ser muy efectivos. En los últimos años nuestro grupo ha desarrollado una PCR para detección de *M. bovis* a partir de tanque de leche en tambos [89]. La técnica de PCR detecta bacterias vivas y muertas, por lo tanto puede aplicarse en muestras que han sufrido diferentes procesos, es así que ha sido descrito su uso a partir de tejidos incluidos en parafina [90].

En el caso de MAP se han desarrollado varios métodos de detección de secuencias específicas de ADN de la bacteria basados en PCR [91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98]. La secuencia de inserción IS900 es una secuencia específica de MAP que se encuentra repetida 14-18 veces en el genoma. La detección de MAP por métodos de amplificación génica está limitada por la baja recuperación de ADN debida a la pared celular altamente especializada y resistente a la lisis [99] y también por la presencia de sustancias inhibitorias en las muestras de heces [100]. Para superar estas limitaciones se han desarrollado distintos métodos para la lisis de la pared celular y la remoción de inhibidores [100]. Un método efectivo consiste en la separación por partículas inmunomagnéticas acopladas a un agitador y PCR en tiempo real [101]. El uso de centrifugación en gradiente de densidad y PCR de captura de secuencias también ha resultado eficiente para purificar y concentrar MAP a partir de muestras fecales [102]. Se desarrolló una PCR en tiempo real que posee una sensibilidad equivalente a la del cultivo fecal y tiene la habilidad de detectar productos de amplificación sin necesidad de electroforesis [103]. La PCR en tiempo real tiene la ventaja de ser un ensayo muy rápido y puede ser realizada en un solo tubo para limitar la contaminación entre muestras. Originalmente se pensó que IS900 era específico de MAP [104], pero desde entonces se ha demostrado que existen secuencias similares a IS900 en otras especies de *Mycobacterium* [105]. Por lo tanto, si bien IS900 sigue siendo

considerada la secuencia emblemática para el diagnóstico y tipificación de MAP, se incorporan nuevas secuencias para complementar el análisis como la secuencia denominada F57 [106].

8.2.2 Técnicas de diagnóstico indirectas

Dentro de las técnicas de diagnóstico que detectan la respuesta inmunológica frente a la infección se encuentran las que detectan la respuesta celular *in vivo*, y las que detectan una respuesta inmune celular y serológica frente a la bacteria *in vitro*.

8.2.2.1 Evaluación de la respuesta inmune in vivo

8.2.2.1.1 PPD o Intradermoreacción

En 1890, Robert Koch elaboró un extracto a partir de un cultivo líquido en glicerol de *M. bovis*. Esta técnica ha sido objeto de refinamiento durante varios años, logrando desarrollar un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-B). Para este fin se cultiva el microorganismo en medio líquido sintético, se lo somete a tratamiento térmico, se filtra, se concentra por precipitación, luego se lava y se redisuelve en una preparación estéril, libre de micobacterias [107]. La mezcla obtenida a partir de este proceso está compuesta además de proteínas, por lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, muchos de estos conservados en las especies del género. Este reactivo denominado PPD-B o tuberculina bovina es similar a la tuberculina aviar y humana, diferenciándose en las cepas de las cuales se obtienen. La PPD-B se obtiene a partir del bacilo de *M. bovis* AN5, mientras que la PPD-A que se utiliza en el diagnóstico de PTB, se obtiene a partir de *M. avium* D4ER. La tuberculina humana que se utiliza para la prueba de Mantoux se produce a partir de una cepa de *M. tuberculosis*.

La prueba cutánea de la tuberculina o intradermoreacción (IDR) se realiza mediante la inyección intradérmica de PPD y la posterior detección de la reacción de hipersensibilidad retardada mediada por una población de células T sensibilizadas [107]. Este tipo de reacción utilizando PPD-B es el método de elección para los programas de control y la erradicación de la tuberculosis bovina en varios países, incluido el nuestro [108]. En animales infectados, la respuesta se evidencia por medio de vasodilatación, hinchazón, eritema y dureza de la zona debido a la movilización de linfocitos y la liberación de citoquinas con inflamación concomitante. La lectura del ensayo consiste en medir la

induración producida a las 72 horas post- inoculación, y en caso de repetirse es necesario esperar 60 días. Las micobacterias tienen antígenos conservados, por lo que es común la obtención de reacciones cruzadas, lo que reduce la especificidad de la prueba [109]. Los animales expuestos a otras micobacterias patógenas o ambientales no patógenas, pueden reaccionar de manera inespecífica, obteniéndose resultados falsos positivos de la prueba. La presencia de resultados falsos negativos se observa en animales con infección tuberculosa avanzada en estadios de anergia, donde la respuesta celular es menor e incluso puede desaparecer. Entre los factores asociados a falsos negativos en la prueba tuberculínica se describen inmunosupresión *post partum* [110], infección generalizada, vejez [111, 112], tratamiento con glucocorticoides sintéticos [113], estrés ligado al transporte, deficiencias metabólicas y co-infección con virus inmunosupresores. Estas reacciones falso negativas también pueden deberse a que los animales con infección reciente (18 a 50 días post-infección) no reaccionan porque se encuentran en fase pre-alérgica y serán detectados con el empleo de la prueba en forma consecutiva. Otros factores independientes del animal que son causa de resultados falsos negativos son la utilización de PPD-B con potencia reducida o en dosis insuficiente, la desensibilización posterior a una prueba intradérmica, la incorrecta identificación de los animales y la variación en la lectura por diferentes operarios [113]. Además del estadio de la infección, la preñez puede generar un estado de anergia. Hasta el momento no se ha determinado la magnitud ni el momento de esta supresión en los animales domésticos pero se ha corroborado una depresión en las reacciones inmunes mediadas por células ya que se observa una mayor tolerancia a los injertos de piel en las hembras gestantes. Existe un consenso generalizado a nivel mundial que en bovinos tuberculosos ocurre inmunosupresión *post partum* temprana. Contrariamente, en animales jóvenes puede haber falsos positivos debido a la producción de IFN- γ por parte de las células T- $\gamma\delta$, aún sin haber estado previamente en contacto con antígenos micobacterianos, lo cual es otra limitante de esta técnica.

Hay básicamente dos maneras de aplicar la prueba en los animales: la prueba intradérmica simple o única donde se inocula la mezcla PPD-A o PPD-B en el pliegue ano caudal del animal (Figura 5) [107] o la prueba intradérmica doble comparativa, en la que la inoculación se realiza en la tabla del cuello (Figura 5). Los resultados son evaluados al comparar la induración producida por ambos antígenos, PPD-A y PPD-B, con el propósito

de evaluar infecciones por MAP o *M. bovis*, respectivamente. También, en el caso de evaluar la presencia de animales infectados con *M. bovis*, la prueba doble comparativa, permite reducir los falsos positivos por reacción cruzada con MAP u otras micobacterias ambientales; su utilización también permite aplicar vacunas contra PTB basadas en cepas inactivadas de MAP. La tuberculina simple ano caudal con PPD-B, es la prueba oficial aprobada por el SENASA para el diagnóstico de la TBB en la República Argentina. A pesar del amplio uso de esta técnica, la sensibilidad de la misma varía entre 68 y 95%, por esta razón, su utilización como única prueba diagnóstica no es recomendada, ya que animales anérgicos podrían ser reservorio de la bacteria [109]. Actualmente el plan nacional de control y erradicación de la TBB de Argentina (Resolución N° 128 año 2012) autoriza la complementación de IDR, con pruebas moleculares de diagnóstico. Otras de las limitantes de la IDR es que requiere de dos visitas al rodeo dentro de las 72hs [107], haciendo el diagnóstico más caro, laborioso y objeto de fraude [114]. Además, como se mencionó anteriormente, sólo puede repetirse cada 2 meses, caso contrario se puede interferir en el resultado de la prueba.



Figura 5. Prueba tuberculínica. Lectura de reacción de hipersensibilidad retardada en el pliegue ano-caudal (Izquierda) y en el pliegue cervical (derecha). Figura adaptada del cuadernillo de SENASA sobre Tuberculosis Bovina.

8.2.2.2 *Evaluación de la respuesta inmune in vitro*

Dentro de las técnicas de diagnóstico que evalúan la respuesta inmune *in vitro* se encuentra el ensayo de liberación de IFN- γ que detecta la respuesta celular y por otro lado las técnicas de diagnóstico de tipo serológicas que evalúan la respuesta humoral frente a la infección con micobacterias.

8.2.2.2.1 *Detección de IFN- γ*

Wood y col. (1990^a) desarrollaron un ensayo celular *in vitro* y rápido (24 hs) basado en la cuantificación del IFN- γ liberado por los linfocitos presentes en la sangre total al ser estimulados con PPD-A, PPD-B y otros antígenos específicos [115]. La detección del IFN- γ se realiza mediante un ELISA indirecto utilizando un anticuerpo monoclonal [115]. El ensayo puede ser utilizado sin límite de tiempo entre pruebas, lo cual es una ventaja frente a la IDR, otra de las ventajas de la técnica es que es capaz de detectar casos en estadios muy tempranos de la infección, algunos con IDR negativa [116, 117]. Sin embargo, su uso en animales jóvenes al igual en el caso de IDR puede dar falsos positivos debido a una respuesta inespecífica por parte de las células T- $\gamma\delta$. A pesar de que se pueden detectar animales con infección subclínica, los animales con infección avanzada, en estado de anergia, poseen una respuesta celular nula; estas limitaciones son las mismas que para la IDR. A pesar de esto y de tener un costo elevado, sumada la necesidad de contar con laboratorios bien equipados, es considerada una herramienta complementaria muy útil. Las ventajas de esta técnica es que solamente requiere encerrar a los animales una vez para la extracción de sangre y puede ser repetida sin tener que esperar 2 o 3 meses a diferencia de la IDR [118].

Cagiola y col. (2004) reportaron que la especificidad del ensayo de IFN- γ es mayor que la de la IDR en TBB, variando entre 97,3 y 98,6%, dependiendo de la PPD utilizada [119]. Por otro lado, Lilenbaum y col. compararon la técnica de IFN- γ con la IDR para el diagnóstico de la TBB y reportaron que su sensibilidad era mayor que la de la intradermoreacción (100 y 88,3% respectivamente) [114]. Por último esta prueba es más objetiva que la intradermoreacción, ya que la interpretación de los resultados se basa en valores numéricos [114].

En distintos trabajos se ha estudiado el efecto de la tuberculinización previa al ensayo de IFN- γ , en algunos se informó que la respuesta de IFN- γ se veía reducida durante un período de 7 días luego de la aplicación de la IDR con un aumento gradual hasta los 60 días [120]. Sin embargo, otros estudios no encontraron ningún impacto en la interpretación del IFN- γ debido a la previa tuberculinización de los animales [113, 121, 122]. En este sentido, Ryan y col. evaluaron esta técnica a los 8 y 28 días luego de la tuberculinización y no vieron interferencias, con lo cual los resultados podrían ser complementarios [123]. Marassi y col. evaluaron la utilización del ensayo de IFN- γ como una herramienta confirmatoria en aquellos animales con resultados inconclusos por IDR [124]. Cuando se realizó el ensayo a los 7 y 21 días después de la inoculación con PPD-B, la sensibilidad fue de 74,3 y 71,4% respectivamente, mientras que la especificidad fue 86, 7 y 80%. De esta manera se concluyó que la técnica de IFN- γ podría ser efectivamente utilizada como una prueba confirmatoria a los distintos tiempos post tuberculinización [124].

Si bien esta técnica se desarrolló inicialmente para el diagnóstico de la TBB, en distintos trabajos se ha estudiado su potencial uso como diagnóstico de PTB utilizando PPDA y/o PPDj en comparación a la PPD-B al igual que en el caso de IDR; los resultados obtenidos con PPD-A y PPD-B se pueden relacionar entre sí para determinar si la infección ocurre por MAP o por *M. bovis*, [77, 125, 126, 127, 128]. A pesar de que en algunos de estos trabajos se evaluó la utilización de la prueba de IFN- γ como diagnóstico de PTB en animales en estado subclínico de la enfermedad, obteniendo una sensibilidad entre 71,8% y 93,3% [125, 127], en otros trabajos se obtuvo una sensibilidad variable entre 13 y 85%, teniendo las mismas limitaciones que en el caso de la TBB mencionadas anteriormente.

Hay trabajos donde se evaluó la utilización de esta técnica en rodeos co-infectados con PTB y TBB para ver el impacto de PTB sobre el diagnóstico de TBB. En este caso, el ensayo de IFN- γ detectó el 69,6 % de los animales con cultivo positivo a *M. bovis* [129].

Cabe destacar que en nuestro país esta técnica no se encuentra entre las que menciona SENASA en el plan de control y erradicación de la TBB (Resolución N°128 año 2012). Esta técnica solo se ha aprobado en algunos programas nacionales como en el de la Unión Europea, Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia. En Nueva Zelanda y Reino Unido la

prueba de IFN- γ es utilizada en pruebas seriadas para incrementar la especificidad y con pruebas paralelas para incrementar la sensibilidad [130].

8.2.2.2 Detección de la respuesta humoral en TBB y PTB bovina

La respuesta humoral en TBB es detectable mayormente en estadios avanzados de la enfermedad por lo que el empleo de técnicas basadas en su detección ha sido limitado. Sin embargo, varios trabajos indican su utilidad para detectar animales anérgicos o desensibilizados, además de detectar animales en estado avanzado de la TBB, luego de la aplicación de sucesivas IDR. Recientemente el grupo de Alicia Aranz demostró que la incorporación de un ELISA al diagnóstico de TBB a los 15 días realizada la IDR permite aumentar la sensibilidad de la técnica detectando entre 66.7% y 85.2% de los animales infectados [131]. En el caso de animales con PTB la respuesta humoral puede ser detectada en los estadios subclínicos de la enfermedad (incluso cuando el animal aún no elimina la bacteria) por lo que este tipo de pruebas son relevantes en el diagnóstico de la infección. Las pruebas descritas y desarrolladas para evaluar respuesta humoral son: ELISA (*enzyme linked immuno assay*), fijación de complemento (FC) e inmunodifusión en gel de agar (AGID), estas dos últimas utilizadas solamente en diagnóstico de PTB. Otra alternativa para evaluar la presencia de anticuerpos específicos es a través de un ensayo de *immunoblot* que puede incorporar el análisis de distintos antígenos al mismo tiempo, MAPIA (del inglés *multi antigen printed immunoassay*) y que permite evaluar estos antígenos con varios sueros a la vez. Estas pruebas constituyen ensayos de fácil implementación ya que se requiere el suero del animal enfermo, de fácil obtención en una sola visita al rodeo. Las ventajas de estas técnicas son que permiten la detección de anticuerpos aún con anergia donde la respuesta celular disminuye o desaparece y además pueden repetirse las veces que sea necesario sin alterar el estado inmune del animal, lo cual las hace de mucha utilidad como técnicas complementarias a las técnicas que determinan respuesta celular.

En el caso de la TBB y PTB, existe una amplia heterogeneidad en el reconocimiento de antígenos. En el caso de TBB se ha utilizado para estos fines, antígenos como PPD-B, que es una mezcla de antígenos de *M. bovis*, así como también se han empleado antígenos individuales como MPB70 y MPB83, los cuales han sido descritos como inmunoreactivos y específicas de *M. bovis*, porque a pesar que los genes también está presente *M. tuberculosis*,

en este último su expresión se encuentra disminuida [132]. La prueba de ELISA ha sido utilizada en el diagnóstico y valoración de tuberculosis en ciervos y animales de vida silvestre, cuya respuesta humoral al parecer es temprana y predecible, mostrando resultados de sensibilidad mayores al 85% [133]. En los primeros estudios sobre el uso de un ELISA para el diagnóstico de TBB, utilizando como antígeno PPD-B, se reportó una sensibilidad de 90% y una especificidad de 89,8%. Sin embargo, en un estudio más extenso, el mismo grupo mostró una sensibilidad más baja de la prueba de ELISA que la reportada anteriormente [134]. De los primeros resultados obtenidos con las pruebas serológicas para el diagnóstico de TBB se reconoce que, debido a la gran reactividad antigénica cruzada entre las especies de micobacterias, se requiere de antígenos específicos para desarrollar pruebas serológicas altamente específicas [134]. El alto nivel de reactividad antigénica cruzada entre las micobacterias, puede ser explicado por la presencia de antígenos comunes (homólogos), sustentado hoy en día por los datos derivados de las secuencias genómicas completas de distintas micobacterias. Se ha desarrollado comercialmente una inmunocromatografía de flujo lateral utilizando el antígeno de *M. bovis*, MPB70, estudios sobre esta técnica indican una sensibilidad de 83% y una especificidad de 99 % [135]. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos fueron realizados con pocas muestras o solamente utilizando muestras de animales experimentalmente infectados, con lo cual los valores de sensibilidad y especificidad son relativos.

En el caso de PTB, los ensayos de detección serológicos, como AGID, FC y el ELISA, pueden ser muy sensibles cuando la producción de anticuerpos es máxima, como en la etapa tardía de la enfermedad. A pesar de que la sensibilidad de las pruebas serológicas se incrementa con la progresión de la enfermedad, se ha visto que animales con PTB desarrollan títulos altos de anticuerpos aún en etapas de iniciales de la enfermedad siendo una herramienta ampliamente utilizada en el diagnóstico de PTB junto al cultivo a partir de materia fecal [136].

8.2.2.2.1. ELISA

En el caso de la TBB, el ELISA siempre fue propuesto como una prueba complementaria a las técnicas que evalúan respuesta celular, en aquellos casos de anergia. En algunos casos se ha producido la detección de animales infectados recientemente mediante la utilización de

diversos antígenos inmunodominantes (PPD-B, Rv0899, ESAT-6, MPB70, MPB64, MPB83, MPB59) entre otros, los cuales podrían revelar la presencia del agente etiológico [137, 138, 139, 140]. En términos generales, la detección de la respuesta inmune mediada por anticuerpos se describe como más eficaz en TBB en aquellos estadios avanzados de la enfermedad, asociándose a cuadros severos [135, 141]. La prueba de ELISA en TBB ha mostrado resultados variables de sensibilidad y especificidad, lo cual debe ser optimizado, como para ser incorporada como única herramienta efectiva en el diagnóstico [141].

La proteína MPB70, la cual representa aproximadamente el 10% de la PPD-B, ha sido identificada como blanco de las células B en ganado con TBB [142], siendo considerada un antígeno específico [143, 144]. Se ha indicado que MPB70 y la proteína con la que presenta una homología importante, MPB83, muestran niveles altos de expresión en *M. bovis*, pero mínimamente en *M. tuberculosis* [132]. Wiker y col. (1998) demostraron el potencial diagnóstico de estas proteínas [132]. A pesar de la similitud de secuencia entre MPB83 y MPB70, nuevos estudios demostraron la utilidad de MPB83 en diagnosticar TBB en animales experimentalmente infectados antes que MPB70 [145]. El ELISA con MPB83 detectó anticuerpos específicos 4 semanas post-infección mientras que el ELISA con MPB70 detectó la respuesta recién entre 18-22 meses post-infección [146]. Por otra parte, las pruebas de ELISA que emplearon a MPB70 como antígeno de captura tuvieron una buena especificidad (88 a 96%), mientras que la sensibilidad fue muy variable, de entre 18 y 73% [146]. También se ha evaluado una estrategia que involucra la expresión recombinante de un antígeno quimera: rM70-83-E6, que representa la recombinación de los antígenos MPB70, MPB83 y ESAT-6. Se ha demostrado que esta proteína quimera reacciona específicamente con sueros bovinos positivos a TBB mejorando la sensibilidad y especificidad del ELISA [147]. En trabajos donde emplearon a PPD-B como antígeno de captura en ELISA, se obtuvo 90% de sensibilidad y 89,8% de especificidad para el diagnóstico de TBB [148]. Para la detección de anticuerpos contra *M. bovis* en sueros bovinos, hay en el mercado varios sistemas comerciales, como el de IDEXX (IDEXX *M. bovis* Antibody Test Kit) y el de Chembio (Dual Path Platform (DPP) BovidTB-M Assay), sugiriendo que también existe interés por este tipo de diagnóstico para TBB. Aunque las pruebas serológicas no pueden ser el primer método de elección a la hora de diagnosticar TBB, muchos investigadores describen estrategias para su uso como método

complementario [131, 141, 149, 150]. Sus recomendaciones se basan en la existencia de animales anérgicos [150, 151], así como el aumento de los títulos de anticuerpos en las etapas más avanzadas de la enfermedad [75, 151]. Casal y col. evaluaron dos sistemas comerciales serológicos para la detección de TBB, *M. bovis Ab Test* y *Enferplex TB assay*, y observaron que aumentaba la sensibilidad de la técnica al tomar las muestras 15 días post-IDR, de un 23-30 % antes de la IDR a 66-85 % 15 días post IDR, teniendo una alta especificidad.

En el caso de PTB, el ELISA para la determinación de anticuerpos específicos constituye el ensayo de mayor difusión y aplicación como diagnóstico de la enfermedad. Puede realizarse en unas pocas horas, pero la sensibilidad puede variar dependiendo de la etapa de la infección [152]. En 1983, Yokomizo y col. desarrollaron un ELISA utilizando el antígeno PPA (del inglés *protoplasmic antigen*) de una cepa de *M. avium* [153]. Este antígeno es una mezcla preparada a partir de la ruptura física de MAP seguida de la eliminación de restos celulares y componentes de la pared celular [154]. En estudios posteriores, el mismo grupo informó la existencia de resultados falsos positivos en la prueba de ELISA desarrollada causados por anticuerpos de reacción cruzada, y que con la pre-absorción de los sueros con *M. phlei* los mismos se reducían [155]. La reacción cruzada de anticuerpos bovinos a PPA parece inevitable ya que la preparación contiene numerosas proteínas citosólicas y antigénicas bien conservadas que están involucrados en procesos bioquímicos, tales como la transcripción y la biosíntesis de lípidos. Se han realizado algunos intentos para purificar antígenos específicos a partir de PPA. Bech-Nielsen y col. purificaron parcialmente las proteínas de PPA utilizando SDS-PAGE y observaron una banda principal de proteína de aproximadamente 34-38 kDa [156]. Un ELISA desarrollado con estas proteínas mostró una sensibilidad más alta (83%) que la mezcla PPA. Abbas y col. (1983) también aislaron una proteína mayoritaria a partir de PPA que fue probada en un formato ELISA, el cual no mostró ninguna reacción falso positiva [157]. Durante los últimos años se han descrito distintos ensayos de ELISA a partir de suero y leche. La sensibilidad fluctúa entre 28 y 45% mientras que la especificidad se encuentra entre 84,7 y 94,9% según análisis comparativos de varios ELISA comerciales los cuales necesitan ser optimizados [158].

Existen varios sistemas comerciales para el diagnóstico serológico de PTB, que sugieren su potencial aplicación y valor para el diagnóstico de PTB, como el comercializado por Allied

Monitor Inc. que utiliza PPA como antígeno. Desde entonces, esta preparación de antígeno se ha utilizado en sistemas comerciales de ELISA e informado en varios trabajos [67]. También se han realizado estudios de sensibilidad y especificidad empleando los ELISAs comerciales más difundidos, HerdCheck *M. paratuberculosis* ELISA; IDEXX Laboratories, Inc., y ParaCheck; CSL/Biocor, en ganado infectado en estadio subclínico [158]. Los sistemas demostraron una sensibilidad del 47,3% y una especificidad del 99%; la comparación de la sensibilidad y especificidad del ensayo con otros ensayos útiles en etapas subclínicas de infección indicaría que este sistema es, hasta hoy, el más eficiente disponible comercialmente para PTB en ganado; sin embargo tiene limitaciones para detectar animales en estadios muy tempranos de la infección.

A pesar de que la respuesta Th2 se asocia a estadios avanzados de la infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, algunos investigadores han encontrado anticuerpos específicos en ganado experimentalmente infectado con menos de 1 año de edad, a 134 y 170 días post-inoculación (dpi). El método de FC establecido por Eda y col. dio a conocer una seroconversión específica de MAP temprana a los 170 dpi. [159]. De modo similar, Water y col. detectaron anticuerpos específicos a los 134 dpi utilizando un ELISA con Lipoarabinomano (LAM) y por *Western blot* a las 2 semanas post infección [160]. Más aún, Bannantine y col. demostraron que pueden detectarse anticuerpos en suero contra varias proteínas de MAP a los 70 días post-infección [161]. Hasta el momento se han evaluado múltiples ELISA, con valores de sensibilidad y especificidad muy variables [67]. Por lo tanto, no es posible proporcionar una estimación puntual de estas pruebas, con lo cual necesitan una mayor evaluación antes de utilizarse en una población específica [162].

Como ya se ha mencionado anteriormente, se pueden obtener falsos positivos en la prueba de ELISA debido a la reacción cruzada de los anticuerpos comunes a otras micobacterias, sobre todo cuando se utiliza mezclas antigénicas no purificadas, como PPD-A o PPA, o antígenos conservados en los microorganismos. Cabe señalar que los animales vacunados contra MAP pueden ser reactores en pruebas inmunológicas por un período de tiempo considerable [163], estando libres de la infección. No obstante, con la interpretación adecuada, las pruebas inmunológicas pueden ser más confiables que las pruebas microbiológicas, dependiendo de la finalidad [162].

8.2.2.2.2.2 AGID- Inmunodifusión en agar gel

Esta técnica consiste en la utilización de un extracto crudo protoplásmico de la cepa *M. avium* como antígeno, el cual se coloca en el centro de una placa de Petri con agar. Los sueros de prueba, y los sueros control positivo y negativo se añaden en pocillos periféricos alternativos en forma hexagonal. Luego de la incubación de 24 y 48 horas, la aparición de una o más líneas de precipitación definida, constituye un resultado positivo. La ausencia de líneas de precipitación se registra como un resultado negativo. Se pueden producir líneas inespecíficas.

Ferreira y col. evaluaron el ensayo AGID para su posible adopción como examen de diagnóstico para PTB en condiciones a campo [164]. Se demostró que AGID era poco satisfactorio como método de sondeo diagnóstico para animales infectados en etapa subclínica de la PTB, aunque podría servir como confirmatorio de animales sospechosos que demuestren señales de PTB. Esta técnica puede tener una especificidad del 100%, pero es menos sensible que el ELISA [46].

En un trabajo realizado por Hope y col. la especificidad y sensibilidad obtenida de la AGID comparando con los resultados obtenidos por histología fueron 99-100% (IC del 95%) y 38 a 56% (IC del 95%), respectivamente [165].

8.2.2.2.2.3. Fijación del Complemento (FC)

La prueba de FC, descrita por primera vez por Morris en 1977, ha sido durante muchos años la prueba diagnóstica estándar para PTB [166]. Para esta técnica se emplea como antígeno un extracto acuoso de la bacteria del que se han eliminado los lípidos (cepa *M. paratuberculosis* 316F). También algunos autores usan la cepa *M. avium* D9. Esta técnica se basa en que el complemento posee la capacidad de unirse a los complejos antígeno anticuerpo (fijación), aprovechándose esta capacidad. Metodológicamente, la prueba se desarrolla en dos fases, una primera que es una reacción antígeno anticuerpo en un medio líquido y una segunda consistente en la adición de complemento, una hemolisina dependiente de complemento y eritrocitos. Si se ha producido reacción antígeno-anticuerpo, es decir, si el suero analizado contenía anticuerpos frente al antígeno, el complemento queda fijado y no puede activar la hemólisis de los glóbulos rojos. La prueba de FC es adecuada cuando se trata de animales clínicamente sospechosos, pero no presenta suficiente

especificidad como para ser usada con fines de control en la población general. Sin embargo, a menudo es solicitada por países que importan ganado.

En diferentes trabajos se ha reportado que la sensibilidad de la prueba de FC es muy variable (entre 10% y 90%) [167, 168], mientras que la especificidad se considera que es aproximadamente de un 70% [167]. Por otro lado, varios estudios han demostrado la baja sensibilidad de la FC al aplicarse en muestras de animales subclínicos [63, 158].

8.2.2.2.4. MAPIA (*multi antigen print immunoassay*)

La técnica de MAPIA consiste en un *immunoblotting*, donde se evalúa la respuesta humoral frente a varios antígenos adheridos a una membrana (nitrocelulosa o PVDF). Las proteínas son dispensadas en el soporte y luego se evalúa el patrón de reconocimiento de cada uno de los sueros estudiados (Figura 6). Debido a la heterogeneidad de la respuesta humoral en las infecciones intracelulares, la valoración de la respuesta humoral utilizando varias proteínas antigénicas en un mismo ensayo es promisoria. El MAPIA fue descrito en el año 2000 por Lyashchenko y col. [169]. Varios trabajos utilizan esta metodología para evaluar antígenos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* [170, 171, 172]; en uno de estos estudios donde se utilizaron 11 antígenos diferentes se obtuvo una sensibilidad del 69,39% y una alta especificidad del 90,27% [172]. Una de las ventajas de esta técnica es que permite evaluar numerosos antígenos y hasta 45 sueros en un mismo ensayo.

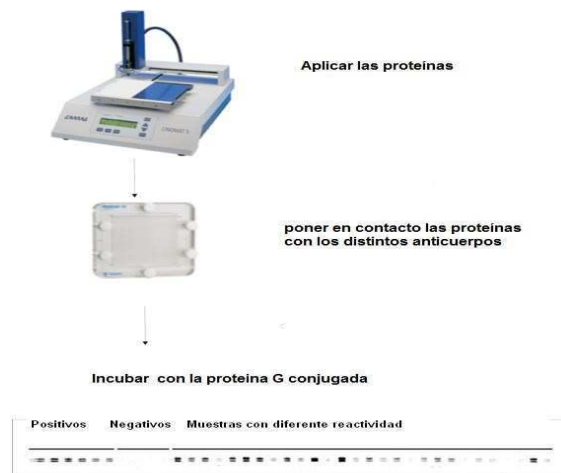


Figura 6. Dispositivo utilizado para la técnica de MAPIA. En la parte superior se muestra el equipo aerolizador automático (Linomat, Camag Scientific Inc.), utilizado para la aplicación de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa y en la parte inferior se muestra el dispositivo *Miniblotter* (Isogen BioSolutions) el cual permite el análisis de hasta 45 sueros al mismo tiempo con 15 antígenos.

9. Avances en el diagnóstico de infección y su relación con la generación de vacunas

La implementación de planes de control junto con la investigación orientada a producir reactivos de nueva generación para el diagnóstico, son pilares fundamentales pero no suficientes en la lucha contra la TBB y PTB. Así, se ha renovado el interés en la obtención de vacunas como herramientas de control, siendo considerada como una de las opciones para reducir el riesgo y la incidencia de la infección por *M. bovis* y MAP. Hoy en día, se cuenta con vacunas comerciales para PTB, pero estas no son permitidas en la mayoría de los países por su interferencia con el diagnóstico de TBB. Por otro lado, la posible vacunación con BCG u otras cepas atenuadas de *M. bovis* para el control de TBB presenta también una limitación, dado que interferirían con el diagnóstico por IDR, basado en la inoculación de la PPD-B, la cual se produce a partir de una cepa de *M. bovis*. En consecuencia, se pone en evidencia la necesidad del desarrollo de una técnica de diagnóstico DIVA que, por un lado permita diferenciar animales vacunados de infectados y que también posibilite la diferenciación de la sensibilización por la presencia de otras micobacterias ambientales o de la infección con otras micobacterias patógenas. La disponibilidad de los genomas secuenciados de las micobacterias y los estudios comparativos genómicos y transcriptómicos permitieron describir antígenos en regiones de *M. bovis* que se encuentran delecionadas en el genoma de BCG. Estos antígenos fueron reconocidos solamente por los animales infectados con *M. bovis* y no por aquellos vacunados con BCG, lo cual es útil para un diagnóstico DIVA [173].

10. Proteínas antigénicas del género *Mycobacterium*

Las especies micobacterianas comparten un número variable de genes codificantes para proteínas y familias proteicas (Tabla 1):

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. Leprae</i>	MAP
<i>M. tuberculosis</i>	26	3732	1396	2624
<i>M. bovis</i>	3732	47	1394	2622
<i>M. Leprae</i>	1396	1394	155	1366
MAP	2624	2622	1366	966

Tabla 1. Genes únicos y compartidos entre las principales especies micobacterianas.

En negrita: genes únicos de cada especie [34].

Sin dudas, el interés está enfocado en aquellas proteínas antigénicas diferenciales o especie/subespecie específicas. La secuenciación de los genomas ha permitido el estudio masivo de estas proteínas mediante su clonado, posterior expresión en forma recombinante y análisis vía MAPIA o macroarreglos de proteínas [169, 174]. Se pueden remarcar dos ventajas importantes en la utilización de proteínas recombinantes en el diagnóstico. En primer lugar, las técnicas tradicionales de diagnóstico para detectar anticuerpos o respuesta celular en animales con TBB o PTB, utilizan mezclas con extractos de proteínas, con una variabilidad sustancial entre las distintas preparaciones de los mismos. En segundo lugar, tales extractos, como PPD o PPA, son propensos a la reactividad cruzada con anticuerpos o generan respuestas celulares inespecíficas por la exposición de los animales a diferentes bacterias. Estudios previos con otras micobacterias tales como *M. tuberculosis* han proporcionado suficientes evidencias para dirigir de forma racional la búsqueda de nuevos antígenos. De hecho, varias proteínas recombinantes de MAP han sido analizadas en base a estudios inmunológicos con *M. tuberculosis* o *M. leprae* [175, 176]. Un estudio demostró que las proteínas recombinantes pueden ser detectadas por un mayor porcentaje de ciervos infectados que los antígenos PPD o PPA cuando se utilizan en un formato de ELISA [178]. Esto sugeriría que la selección apropiada de antígenos recombinantes sería un reactivo diagnóstico más eficiente que el empleo de un extracto crudo de la bacteria. Hay que considerar también que la alternativa de purificación por métodos bioquímicos de antígenos

particulares representa una estrategia muchas veces más compleja, siendo el crecimiento lento de la micobacteria y la peligrosa exposición al patógeno, dos factores no menores a tener en cuenta. En la actualidad, un número importante de antígenos han sido descritos y caracterizados en ambas especies con distinta profundidad y constituyen sin dudas un pilar para la futura complementación de las técnicas actuales de diagnóstico.

10.1 Antígenos de *M. bovis*

El genoma de *M. bovis* posee 3.952 genes que codifican para proteínas. El genoma es similar a *M. tuberculosis* en un 99,95%, por lo que muchas de las proteínas codificadas se encuentran conservadas en las dos especies [38]. Algunas de las proteínas diferenciales son las lipoproteínas y las proteínas codificadas por los genes *rpf*, relacionados con la resucitación de bacilos en estadios de dormancia [179]. Además, los genes codificantes para las proteínas de las familias PE-PGRS y PPE, muy variables, se asume que están involucradas en la adhesión y modulación de la respuesta inmune [180, 181]. Dentro de las proteínas identificadas en el secretoma de *M. bovis* (proteínas secretadas al medio de cultivo) se encuentran: MPB64, una proteína inmunogénica presente en las bacterias del complejo *M. tuberculosis* [182] propuesta como potencial candidato vacunal al fusionarla con otras proteínas [183]; MPB70, una proteína que constituye el 10% de las proteínas secretadas [184] y MPB83, una glicolipoproteína secretada asociada a la pared [185, 186]. Estas dos últimas, son proteínas de secreción involucradas en la unión a las células huésped y son sumamente específicas de *M. bovis*, expresándose diferencialmente con respecto a *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG [146, 187]. Las proteínas antigénicas ESAT-6 y CFP10 son sin duda los antígenos mejor caracterizados, los genes codificantes se encuentran en la región RD1 ausente en la cepa vacunal *M. bovis* BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales, con lo cual permiten diferenciar animales vacunados con BCG de infectados con *M. bovis* [188]; por otra parte, en MAP tampoco están presentes las proteínas ESAT-6 y CFP-10, permitiendo también diferenciar animales con TBB de PTB. Otras proteínas son las de la familia de proteínas micolil-transferasas, constituida por los antígenos 85A, 85B, 85C conformando el complejo 85; este complejo tiene un rol importante en la virulencia de *M. bovis*, además de la capacidad de promover inmunogenicidad [189]. El estudio del proteoma de *M. bovis* ha permitido la descripción de otros antígenos con potencialidad

diagnóstica, los cuales se encuentran bajo evaluación, siendo candidatos a formar parte de las mezclas de nueva generación en el diagnóstico de TBB [190, 191]. Entre las proteínas testeadas, la quimera de ESAT-6/MPB70/MPB83 demostró, al ser implementada en la prueba de ELISA, una correlación satisfactoria con la IDR doble comparativa (índice kappa: 0.688), reflejando una sensibilidad de 83.2% y una especificidad de 86.5%. Sin embargo, fue útil en discriminar animales positivos de negativos solamente en rodeos antes de realizar la tuberculinización, ya que observaron que al realizar la tuberculinización antes de la prueba de ELISA no podían discriminar entre animales negativos de positivos probablemente debido a las sucesivas tuberculinizaciones realizadas para definir el estado libre del rodeo [192].

10.2 Antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Los trabajos enfocados en la identificación de antígenos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* estuvieron a la vanguardia respecto del desarrollo de las líneas respectivas de MAP. Pese a esto, la diversidad de antígenos identificados en MAP es amplia y aún hoy, constituye un campo muy activo.

Dentro de los antígenos estudiados se encuentran los de secreción, los cuales se espera que sean altamente inmunogénicos o inmunodominantes debido a su presencia en el entorno extracelular donde es más probable encontrar células inmunes sensibilizadas. Esto fue confirmado en un estudio donde se compararon los antígenos secretados del sobrenadante y los antígenos de origen intracelular [193]. La mayoría de los antígenos candidatos fueron evaluados con relativamente pocos sueros, sin embargo, cinco antígenos recombinantes, MAP2411, ClpP (MAP2281c), Pap (MAP0435c), MAP0593c y GreA (MAP1027c), fueron probados con 41 sueros de ovejas infectadas por MAP y 41 ovejas control no infectadas [194]. Dos de estos antígenos, MAP0593c y ClpP reaccionaron contra el 58,5% y el 46,3% de los sueros positivos y el 12,1% y el 4,9% de los sueros controles negativos. Sin embargo, estos no fueron evaluados con un panel de sueros más amplio que permita conocer con precisión su sensibilidad y especificidad. Un estudio anterior evaluó los antígenos recombinantes Ag85A, Ag85B, Ag85C y SOD en un ELISA con 60 sueros de vacas que eliminaban MAP por materia fecal y 22 vacas en estadio subclínico [195]. Los antígenos del complejo Ag85 y SOD mostraron alta reactividad frente a sueros de vacas que

eliminaban MAP y poca reactividad frente a sueros de las que no lo hacían. Las proteínas conservadas tales como los antígenos del complejo Ag85 se encuentran en todas las especies de micobacterias [176]. A nivel de proteína los tres componentes del complejo Ag85 de MAP comparten 99% de identidad con MAA [198]. Este complejo de MAP a su vez tiene una alta homología con *M. bovis*, con lo cual para fines de diagnóstico, esta reactividad cruzada no es deseable ya que se busca una alta especificidad, además de la sensibilidad.

Al igual que los antígenos secretados, se espera que los antígenos de la pared celular y de membrana sean altamente inmunogénicos debido a su accesibilidad a componentes del sistema inmune. Varios estudios han caracterizado y evaluado como antígeno de MAP una proteína de membrana de 34 kDa (P34) [197, 198] o partes de la proteína [199, 200, 201], que pertenece al complejo antigénico A36. La proteína P34 provoca predominantemente una respuesta inmune humoral [202] y demostró ser específica de MAP [203], el polipéptido A362, que representa el extremo carboxilo terminal de P34, se evaluó por ELISA con 208 sueros positivos a PTB y 175 negativos reaccionando con 40,4% de las muestras positivas y con el 5% de las muestras negativas [200].

Un estudio comparativo de los genomas de diferentes especies de micobacterias mostró que las principales diferencias se encuentran en los productos génicos que constituyen la pared celular y en genes particulares que codifican para las proteínas PE y PPE [204], los cuales son exclusivos de micobacterias. Los nombres de estas proteínas PE y PPE se debe a la presencia de motivos prolina-ácido glutámico (PE) y prolina-prolina-ácido glutámico (PPE) conservados que se encuentran en dominios cercanos a los extremos N-terminales de estas proteínas. Su función sigue siendo desconocida, sin embargo, algunos miembros de la familia se han relacionado con la virulencia [42]. Un reciente estudio de comparación genómica con otros miembros del complejo *M. avium* llegó a la conclusión de que varias proteínas PPE eran exclusivas de MAP [205]. Dado que las proteínas de la familia PE y PPE son diferentes entre las micobacterias, se ha considerado que pueden ser útiles como antígenos en ensayos de diagnóstico específicos de MAP.

Dentro de los antígenos lipoproteicos se encuentra el LAM (lipoarabinomano) [206], un componente altamente inmunogénico de la pared celular de las micobacterias, el cual ha

sido utilizado en varios ensayos diagnósticos serológicos para PTB [207, 208]. Sin embargo, a pesar de que LAM es capaz de inducir una fuerte respuesta humoral [160], se encuentra altamente conservado entre las micobacterias, lo cual no lo hace una herramienta específica para el diagnóstico.

Otro de los componentes de pared son los lipopéptidos, en MAP uno de estos componentes denominado Para-LP-01, ha sido caracterizado como inmunogénico [209]. Eckstein y col. demostraron mediante un ensayo de ELISA, empleando este lípido como antígeno de captura, que es específico e inmunoreactivo para MAP.

Otro lípido de MAP, un lipopentapéptido denominado LP5, fue sintetizado con éxito y se ha demostrado que es exclusivo de MAP [210]. En un estudio de nuestro grupo se comparó este lípido con PPDj en un formato de ELISA y se obtuvo una sensibilidad 74.1% y 37% respectivamente, pero una especificidad mayor con el lipopentapéptido 98.9% y 100% [211].

Por otra parte, las proteínas de choque térmico son moléculas altamente conservadas. Durante condiciones de estrés celular, la expresión de estas proteínas se ve aumentada en respuesta a una infección o inflamación [212]. Además de su función como chaperona, estas proteínas han demostrado tener un rol importante en la activación y modulación de células dendríticas [213]. Al ser moléculas altamente conservadas, no son antígenos ideales debido al cruzamiento que podría tener con otras micobacterias. En distintos trabajos se ha evaluado el poder antigénico de las distintas proteínas (GroES, Hsp65K, Hsp70, MAP3840 and MAP3841), ninguna de ellas resultó ser específica. [213, 214, 215, 216, 217, 218, 219].

Por último, varias proteínas de función desconocida han sido caracterizadas como antígenos a partir de trabajos de proteómica de MAP [215, 220]. Lamentablemente, estos fueron validados con pocos sueros de animales.

Se ha tratado de identificar factores de virulencia de MAP principalmente a través de estudios sobre proteínas antigénicas de la bacteria, ya que éstas pueden ser la llave de los mecanismos patogénicos. Algunas de ellas son específicas de MAP y potencialmente útiles en el desarrollo de vacunas y métodos diagnósticos. Inicialmente, la detección de proteínas antigénicas, se llevó a cabo evaluando bibliotecas de expresión con antisueros de animales experimentalmente o naturalmente infectados (método hoy día conocido como IVIAT;

tecnología de antígenos inducidos *in vivo*). Algunas de las proteínas identificadas por IVIAT han sido utilizadas posteriormente en pruebas serológicas, pero no han arrojado antígenos inmunodominantes útiles [221].

Gracias a la secuenciación del genoma completo de MAP, fue posible realizar la síntesis de proteínas a gran escala y desarrollar macroarreglos de proteínas para identificar aquellas con poder inmunogénico utilizando sueros de animales enfermos. Bannantine y col. detectaron mediante esta metodología 10 proteínas, de las cuáles 7 no eran conocidas [222]. Por medio de la prueba de IFN- γ con células mononucleares de sangre periférica de bovinos con PTB, Nagata y col. han identificado tres proteínas recombinantes de las cuales 2 son de la familia PPE (Pro-Pro-Glu) [223]. Existen numerosos avances en la identificación de posibles factores de virulencia y antígenos mediante electroforesis en dos dimensiones, y posterior espectrometría de masas de las proteínas totales de MAP o la identificación de aquellas reconocidas por el suero de los animales con PTB [224]. Cho y col. lograron identificar por este método 14 posibles antígenos proteicos (ModD, Antígeno 85C, PepA, MAP1693c, y MAP2168c) del filtrado de cultivo que fueron luego expresados en su forma recombinante y evaluados en ensayos serodiagnósticos [225, 226].

En nuestro grupo de trabajo, la investigación de antígenos potenciales para el uso en el diagnóstico de TBB y PTB ha sido uno de los temas prioritarios. Como parte de ello, se elaboró una biblioteca de expresión a partir del ADN genómico de MAP que se evaluó por *immunoblot* utilizando sueros de bovinos infectados. Mediante este estudio se identificaron varias proteínas antigénicas, entre ellas el antígeno D (bactoferritina), el antígeno Lpp24 y ModD [227, 228, 229].

10. Producción de proteínas recombinantes de M. bovis y MAP para su uso en el diagnóstico

M. bovis y MAP poseen una tasa de replicación muy baja naturalmente. Este valor decrece todavía más cuando se intenta cultivarlas en medios sintéticos en el laboratorio, lo cual no es beneficioso si uno intenta obtener cantidades de proteína suficientes para ensayos de diagnóstico. De esto se desprende que es necesaria la producción de las proteínas en sistemas heterólogos capaces de aportar un mayor nivel de expresión requerido para

investigación y diagnóstico.

E. coli es el microorganismo de elección debido al fácil manejo y su elevada tasa de crecimiento. Para introducir la secuencia que codifica para la proteína de interés en *E. coli*, se utilizan plásmidos autoreplicativos que poseen promotores inducibles.

A pesar de que numerosos antígenos han sido descritos en la literatura, hay una falta de antígenos bien definidos, suficientemente caracterizados y estandarizados para su utilización en ensayos de diagnóstico [230]. Las características ideales de nuevos antígenos para diagnóstico son, que sean específicos, reconocidos en estadios tempranos de la infección y que continúen siendo detectados durante el transcurso de la enfermedad. Es probable que una prueba diagnóstica requiera una mezcla de antígenos debido a la heterogeneidad de los antígenos que son reconocidos por el suero de animales en diferentes estadios de la infección y la propia heterogeneidad en la respuesta entre los animales [231], y a los patrones diferenciales de expresión de antígenos de las bacterias [232]. Esto sienta las bases para el presente trabajo de Tesis.

OBJETIVOS

Objetivo general

Las pruebas diagnósticas que se utilizan actualmente en el diagnóstico inmunológico de la tuberculosis bovina (TBB) y la paratuberculosis (PTB), emplean los reactivos PPD-B y PPD-A, que presentan reactividad cruzada debido a la presencia de antígenos idénticos o muy similares en ambas bacterias. El objetivo de la presente Tesis es mejorar el diagnóstico inmunológico de ambas enfermedades.

Para desarrollar nuestro objetivo general, se planteó la siguiente Hipótesis de trabajo:

"La elaboración de nuevas mezclas antigénicas con componentes inmunogénicos específicos de *M. bovis* y MAP contribuirá a mejorar las pruebas diagnósticas de TBB y PTB"

Objetivos específicos:

A fin de poner a prueba la hipótesis planteada, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la composición de las PPDs utilizadas en el diagnóstico de tuberculosis y paratuberculosis bovina mediante técnicas de proteómica.
- 2) Producir nuevas mezclas enriquecidas con los componentes más antigénicos que desencadenan una respuesta inmune sensible y específica.
- 3) Evaluar las nuevas mezclas antigénicas tanto en animales naturalmente o experimentalmente infectados como vacunados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generales

1.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

1.1.1. *Mycobacterium* sp.

La manipulación de las distintas cepas de micobacterias patógenas se realizó de manera íntegra en el laboratorio de bioseguridad (BSL3) para bacterias patógenas del Instituto de Biotecnología del CICVyA, en INTA Castelar. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo según las estrictas normas de seguridad impresas en el manual de dicha instalación.

Las cepas *Mycobacterium avium* (MAV) D4ER y *Mycobacterium bovis* AN5 (cepas de referencia), empleadas para las producciones de PPD-A y PPD-B utilizadas en este estudio, fueron crecidas en el laboratorio del Dr. Bernardo Alonso del SENASA. Estas fueron crecidas en medio líquido Dorset-Henley modificado (según protocolo de SENASA (<http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1011-tuberbov.pdf>) sin agitación a una temperatura de 37° C, durante 8 a 10 semanas hasta llegar a fase exponencial.

Para la preparación de PPD-A y PPD-B se autoclavaron las botellas del lote de producción a vapor fluente (100°C, durante 3 hs). Se dejó en contacto el cultivo con el medio líquido, durante 24 a 48 hs, agitando los frascos periódicamente a lo largo de este lapso.

Luego se separó la masa bacilar utilizando tamices de malla metálica de 180 micrones y se clarificó el líquido con una malla metálica.

Para precipitar las proteínas provenientes de la micobacteria durante su desarrollo y posterior lisis, se agregó un volumen de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 40% por cada 9 volúmenes de la filtración clarificante. Se mezcló mediante agitación enérgica y se incubó durante toda la noche produciéndose la sedimentación del precipitado.

Al día siguiente, para evitar un contacto más prolongado del TCA con el producto, se aspiró el líquido sobrenadante y se lavó el precipitado con solución de TCA al 1% y una o dos veces con solución de cloruro de sodio (NaCl) 5%. En cada lavado se levantó el precipitado del fondo del vaso de la centrífuga con una varilla de vidrio mediante agitación de modo tal de permitir el contacto entre el sólido y las soluciones de lavado. Los lavados con la solución de NaCl 5% se realizaron hasta que el líquido sobrenadante proveniente de la centrifugación, alcanzara un pH de 2,7. Se centrifugó entre cada lavado a 1.000xg durante

30 a 60 min.

Luego se resuspendió el precipitado en solvente alcalino (Fosfato disódico 17,8 g/L, Hidróxido de sodio al 45% 2 mL/L) con agitación hasta que se disolvieron todas las partículas, el líquido de color marrón oscuro tenía un pH de 6,7 a 7,0. Por último se centrifugó para eliminar partículas insolubles a 1.000xg durante 30 min.

La cepa de referencia *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP) K10, se creció en medio líquido 7H9 (BD) suplementado con AD (Albumina al 40%, Dextrosa 50%) al 10% final, glicerol al 2,5% (Sigma) y 2 µg/mL de micobactina J (Allied Monitor). Los cultivos fueron cosechados cuando alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento: DO \geq 1 y entre 8-10 semanas. En ese momento se tomó una alícuota para realizar una tinción de Ziehl-Neelsen y así comprobar la ausencia de contaminación del cultivo. Como control de rutina se realizó una PCR sobre la secuencia IS900 (específica de MAP) e IS1245 (específica de MAV) para confirmar la identidad del cultivo y descartar posibles contaminaciones.

1.1.2. Cepas de *E. coli*

Para los distintos clonados y expresión de proteínas se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α , y BL21 (DE3) pLysS. Las células se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB: NaCl 10 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L, bacto triptona 10 gr/L, NaOH 1N 1mL, PH 7) o en placas con LB-agar 1,5%. Cuando fue necesario se agregó ampicilina (50-100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) a los medios de cultivo. Se crecieron en agitación a 200 rpm, a 37°C empleando un agitador orbital (Thermo scientific). Para la selección de colonias blancas y azules se utilizó en las placas de LB agar: X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (100 µg/mL) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (40 µg/mL).

1.2. Plásmidos y proteínas utilizadas en este estudio

Antígeno	Bacteria	Origen
ESAT-6/Rv3875	<i>M. bovis</i>	NR-36431 Plásmido pMRLB.7. Bei Resources Colorado State University. USA
CFP-10/Rv3874	<i>M. bovis</i>	NR-13297 Plásmido pMRLB.46. Bei Resources Colorado State University. USA
MPB83/Rv2873	<i>M. bovis</i>	A partir de un plásmido recombinante de nuestro laboratorio
MPB70/Rv2875	<i>M. bovis</i>	LioneX. Alemania
HSPX/Rv2031c	<i>M. bovis</i>	LioneX. Alemania
TB10.3/Rv3019c	<i>M. bovis</i>	LioneX. Alemania
FixB/Rv	<i>M. bovis</i>	**Obtenida en este estudio
CFP2/Rv	<i>M. bovis</i>	**Obtenido en este estudio
MAP 0011	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0034	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0038	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0047c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0187/SodA	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0209c/CSP	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0210c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0211	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0297	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0334	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0693	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0900	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 0946c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1012c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1050c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1272	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1293	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1308	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1564c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1589c/AhpC	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1653=Tpx	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1693c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1754c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1889c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 1962	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2020	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2167	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2182	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2513	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2609	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2676c	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2685	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2878	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2942	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 2956	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3175	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
Mb 3341	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3402	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3457	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP3491	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3527	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3627	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*
MAP 3651	MAP	CIDC- Lelystad, Lelystad, Holanda.*

MAP 3692c	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 3840	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 3841	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 3857	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 3936	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 4000c	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 4147	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*
MAP 4227c	MAP	CIDC- <i>Lelystad, Lelystad</i> , Holanda.*

Tabla 2. Plásmidos y proteínas utilizadas en este estudio.

* Los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a las proteínas de interés se insertaron en los vectores pET33b (Novagen Inc, Madison, WI, USA) y pRSET (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). La expresión fue realizada en células BL21.

Los antígenos secretados, a los cuales se les eliminó la secuencia señal, fueron clonados en pQE80 (Qiagen, Germantown, MD, USA), como se describe en Willemsen y col. [233].

Estos antígenos fueron gentilmente cedidos por Peter Willemsen y Douwe Bakker del Instituto Central Veterinario de Lelystad, Holanda.

** el protocolo de obtención y purificación de estas proteínas se especifica en la página 87.

1.3. Técnicas de Biología Molecular

1.3.1. Extracción de ADN de micobacterias

Para la extracción de ADN de micobacterias, se tomó un 1 mL de cultivo y se centrifugó 5 min a 10.000xg. Luego se agregó al *pellet* 400 μ L de *buffer* TE (tris(hidroximetil)aminometano-HCl pH 8 100 mM, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 10 mM) y se inactivó a 80°C 20 min. Una vez inactivado, se agregó 50 μ L de lisozima 10 mg/mL y se incubó a 37°C hasta el día siguiente. Luego se agregaron 100 μ L de una solución proteinasa K/ dodecilsulfato sódico (SDS del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% y se incubó 10 min a 65°C. Posteriormente se agregaron 100 μ L de NaCl 5M y 100 μ L de la solución Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB del inglés *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)/NaCl (4,1 gr/ 100 mL, CTAB 10 gr/mL) esta última precalentada a 65°C. Se mezcló por agitación la muestra hasta que se volviese de color blanco y se incubó 10 min a 65°C.

Luego se agregó un volumen de 750 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, se mezcló y se centrifugó 5 min a 12.000xg, la fase acuosa se colocó en otro tubo y a esta se le agregó 450 μ L de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos durante 30 min a -20°C.

Luego se centrifugó 15 min a 12.000xg, se realizó un lavado con etanol 70% y se dejó evaporar unos minutos, el pellet se resuspendió en 20 μ L de *buffer* TE.

1.3.2. Preparación de células competentes de *E. coli*

Se prepararon bacterias competentes químicas utilizando el siguiente protocolo:

A partir de una colonia se creció un cultivo de 5 mL ON 37°. Al día siguiente se incubaron 300 mL de cultivo LB con 3 mL del cultivo del día anterior en un erlenmeyer de 2 L a 37° con agitación hasta llegar a una DO ($\lambda=550$): 0,48. Luego se colocaron las células 5 minutos en hielo y se centrifugaron 5 min a 4.000 rpm a 4°C.

Se resuspendió el *pellet* en 40 mL de la solución TFBI fría (Acetato de Potasio 30 mM, Cloruro de Potasio 100 mM, Cloruro de Calcio 10mM, Cloruro de Manganeso 50mM, pH 5,8 con ácido acético 0.2N), se dejó en hielo 5 minutos y se centrifugó nuevamente durante 5 min a 4.000 rpm 4°C.

Luego se resuspendió el *pellet* en 10 mL de la solución TFBII fría (3- (N-morfolino) ácido propanosulfónico (MOPS) 10mM, Cloruro de Calcio 75 mM, Cloruro de Potasio 10 mM, Glicerol 10%, pH 6.5 con KOH).

Las células se alicuotaron en 250 μ L por tubo *ependorf* y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización.

1.3.3. Vectores de clonado y Expresión

Durante este trabajo se utilizaron distintos vectores. En particular se empleó el vector pGEM-T (Promega), TOPO-TA (Invitrogen) para clonar los fragmentos de PCR de los genes seleccionados.

Para la expresión proteica se seleccionó el vector pRSET (Invitrogen), el cual expresa la proteína de interés fusionada a 6 residuos de histidina, pudiendo purificar el producto expresado por medio de una cromatografía de afinidad a Niquel (Ni-NTA resin, Invitrogen).

1.3.4. Transformación de *E. coli*

Para los ensayos de transformación se agregaron 5 μ L de plásmido (10-50 ng) a 50 μ L de células competentes. Se incubó por 30 min en hielo, luego se aplicó un shock térmico a 42°C durante 90 seg. y nuevamente se colocaron en hielo. Luego se agregaron 200 μ L de medio LB y se incubó por una hora a 37°C con agitación constante de 150 rpm. Al terminar el período de recuperación, se sembraron 100 μ L de la reacción de transformación en placas

conteniendo LB agar, en presencia del antibiótico necesario para la selección de las transformantes y se creció durante toda la noche a 37° C.

1.3.5. Minipreparaciones plasmídicas

La obtención de plásmidos a partir de *E. coli* se realizó mediante el uso del sistema comercial (Illustra PlasmidPrep mini Spin kit, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3.6. Digestión con enzimas de restricción

Se tomaron 2 a 5 µL de plásmido, se agregó 1 µL de la enzima de restricción, 2 µL del *buffer* 10x (específico para cada enzima) y H₂O c.s.p. 20 µL; se incubó durante una hora a 37 °C en baño térmico. Las enzimas de restricción fueron de Promega, utilizando el *buffer* según las instrucciones de los fabricantes.

1.3.7. Reacciones de ligado

Se utilizó la enzima T4 ligasa (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación ADN inserto/ADN vector fue de 3:1 o 1:1 según el caso. La reacción de ligación se llevó a cabo por un período de 16 a 18 hs a 4°C.

1.3.8. Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización y la posterior purificación de fragmentos de ADN obtenidos de reacciones de PCR o de cortes con enzimas de restricción con rangos de tamaño de 3.000 a 500 pb, se utilizó una concentración de agarosa (Biodynamics) de 0,8 a 1 % con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE (tris 40 mM, ácido acético 20 mM, y EDTA 1 mM) a 100 Volts en cubas (Biorad). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb *ladder* (Promega). Las muestras fueron visualizadas en un sistema de documentación de geles (Gel Doc XR, BioRad).

1.3.9. Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN obtenidos por reacciones de PCR o tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones o a partir de gel de agarosa, se utilizó el sistema comercial *Illustra GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La cuantificación de ADN obtenido se realizó con el espectrofotómetro *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, (Thermo Scientific).

1.3.10. Electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas en una dimensión se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron las cubas y accesorios del sistema *miniprotean 3* (Bio Rad) para geles de 7x8 cm. Para el armado de un gel pequeño, se siguió la siguiente tabla:

<u>Gel separador</u>	<u>concentración final de acrilamida 15%</u>	<u>5 mL</u>
H ₂ O bidestilada.....	1,20 mL	
Tris-HCl 1,5M pH 8,8.....	1,30 mL	
Amonio persulfato (APS) 10%.....	50 µL	
SDS. 10%.....	50 µL	
Acrilamida-Bisacrilamida. (30-0,8%).....	2,5 mL	
Tetrametiletilendiamina (Temed).....	2µL	

<u>Gel Concentrador</u>	<u>concentración final de acrilamida 4 %</u>	<u>3 mL</u>
H ₂ O bidestilada.....	2,1 mL	
Tris-HCl 0.5M pH 6,8.....	0,380 mL	
APS 10%.....	30 µL	
SDS. 10%.....	30 µL	
Acrilamida-Bisacrilamida 30-0,8% (Biorad).....	500 µL	
Temed.....	3 µL	

Las muestras a analizar se colocaron en tubos *Eppendorf*, se completaron con un volumen de *cracking buffer 5X* (Tris-HCl pH 6,8 250 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, SDS. 10%, azul de bromofenol 0.2%, Glicerol 50%) y se calentaron a 100°C durante 5 min. Se sembraron las muestras en el gel y en cada corrida se utilizó una calle para sembrar 5 µL de un marcador de peso molecular preteñido (Fermentas).

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente con *buffer* Laemmli (tris 3,2 gr/L, glicina 14,4 gr/L). Las muestras fueron primero corridas a 25 mA, luego de un tiempo de corrida se pasó a 40 mA.

1.3.11. Tinción con Azul de Coomassie

Luego de la separación de las proteínas por SDS-PAGE 15%, se incubaron los geles con una solución de azul de *Coomassie* (*Coomassie brilliant blue* R250 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante una hora en agitación. Luego se realizaron lavados con una solución decolorante (metanol 50%, ácido acético 10%).

1.3.12. Western blot

Luego de realizada la separación electroforética de las proteínas, los geles de poliacrilamida fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, GE) e incubados con anticuerpos [255]. Las transferencias se realizaron en un aparato *Mini-Transblot* (Biorad) durante una hora a 100 mA con el buffer correspondiente (Tris 3,2 gr/L, glicina 14,4 gr/L, metanol 200 mL). Luego las proteínas transferidas fueron teñidas con rojo *Ponceau* (Rojo *Ponceau* 0,1%, Ácido Acético 5%). Posteriormente, se procedió al bloqueo de la membrana durante una hora a 37°C con la solución de bloqueo (TBS (Tris-HCl pH 8 15 mM, NaCl 15 mM)-leche 5 %). Luego se incubó durante una hora con el anticuerpo primario, anti-histidina producido en ratón (GE Healthcare), y se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma).

Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TBS.

Para el revelado se incubó por 5 min con el buffer de revelado para fosfatasa alcalina (BREFA) (Tris-HCl pH 9 0,1 mM, NaCl 0.1M, MgCl₂ 25 mM), luego se incubó con una solución de 10 mL de BREFA más el agregado nitroazul de tetrazolio (NBT del inglés *Nitroblue tetrazolium* y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fostato(BCIP)(Promega) 66 µL y 33 µL respectivamente, en oscuridad, hasta ver la presencia de las bandas correspondientes.

1.3.13. Dosaje de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método del ácido bicinónico empleando el sistema *Micro BCA protein assay* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.3.14. Medición de contenido de LPS

La medición de contenido de LPS de las proteínas producidas en este estudio se realizó con el kit *LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation kit* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.4. Animales

1.4.1. Primer grupo de bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* o vacunados con BCG

Estos animales fueron parte de un ensayo de vacunación realizado en boxes de bioseguridad BSL3 del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) [234].

Un grupo de cinco terneros machos castrados raza Holstein-Friesian (entre 3 y 4 meses de edad) fue inoculado por vía subcutánea en un costado del cuello con 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa *M. bovis* BCG Pasteur resuspendida en PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*, NaCl 8,5 gr/L, fosfato de sodio monobásico (anhidro) 0,32 gr/L, fosfato de sodio dibásico (anhidro) 1.1 gr/L). Otro grupo de 6 animales con las mismas características que el anterior fue infectado por instilación intratraqueal de 5×10^7 UFC de una cepa salvaje altamente virulenta, *M. bovis* 04-303 [235]. La misma es un aislamiento obtenido de un jabalí salvaje con lesiones tuberculosas. El procedimiento de la inoculación se realizó anestesiando primero a los terneros con xylazina HCl (Rompun, Bayer; 0,1 mg/kg) por vía endovenosa y luego insertando un tubo endotraqueal de 80 cm dentro de la tráquea, se insertó una cánula por el tubo endotraqueal y el inóculo de 1,5 cm conteniendo la cepa *M. bovis* 04-303 fue inyectado a través de la cánula y luego se purgó con solución salina estéril 1,5 veces el volumen del espacio muerto de la cánula.

Todos los animales utilizados en este estudio fueron negativos a la intradermoreacción (IDR) tanto a la PPD-A como a la PPD-B al comienzo de los experimentos.

Para confirmar la infección de los animales, a los 100 días post-infección, se eutanzaron los terneros para la realización de la necropsia y búsqueda de lesiones. Se realizaron cortes finos de pulmón, de linfonódulos de la cabeza y de la región pulmonar, los cuales fueron analizados para ver la presencia de formación de granulomas.

La vacunación e infección experimental con *M. bovis* fue realizada en boxes para animales de bioseguridad BSL3 del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires, Argentina, en cumplimiento con las regulaciones y protocolos del comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación de INTA (CICUAE) y el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

1.4.2. Segundo grupo de bovinos experimentalmente infectados

Estos animales fueron parte de un ensayo de vacunación contra TBB realizado en Nueva Zelanda (B. Buddle y col.) en el marco de una colaboración con nuestro grupo de trabajo.

Un grupo de 12 bovinos raza Holstein-Friesian (entre 11 y 12 meses) fue infectado intrabronquialmente con 6×10^3 UFC de la cepa *M. bovis* Wag202 [236], obtenida a partir de un marsupial (pósum) tuberculoso.

Todos los animales utilizados en este estudio fueron provenientes de un rodeo de una zona libre de TBB, siendo todos negativos a la intradermoreacción (IDR) tanto a la PPD-A como a la PPD-B al comienzo de los experimentos.

Para confirmar la infección de los animales, a las 11 semanas se realizó la necropsia de los mismos para la visualización de lesiones al igual que en la primera experiencia.

1.4.3. Bovinos naturalmente infectados

Para las distintas experiencias se utilizó sangre entera y sueros de diferentes rodeos:

Rodeo Delta: Es un rodeo de cría de raza Aberdeen-Angus con una alta prevalencia de TBB (30%). De los 48 animales utilizados, 27 eran positivos a la IDR con PPD-B (reacción mayor a 3 mm), 19 sospechosos (1-3 mm) y 12 negativos (<3 mm).

Rodeo Suardi: Es un rodeo lechero de raza Holando-Argentina con una alta prevalencia de TBB (100%).

Rodeo Tandil: Es un rodeo lechero de raza Holando-Argentina con una alta prevalencia de PTB (40%), confirmado por cultivo a partir de materia fecal.

Rodeo Chascomús: Es un rodeo lechero de raza Holando-Argentina con una alta prevalencia de PTB (30%), confirmado por cultivo a partir de materia fecal.

Rodeo INTA Castelar: Es un rodeo de raza Aberdeen-Angus libre de TBB y PTB por más de 5 años.

Todos los bovinos naturalmente infectados utilizados en este estudio fueron animales adultos, mayores a un año.

1.4.4. Cobayos

Para las experiencias de intradermoreacción en cobayos se utilizaron 3 grupos de animales, uno como control, no sensibilizado y otros 2 grupos sensibilizados, uno con *M. bovis* y *Mycobacterium avium* D4ER (MAV).

La sensibilización de los cobayos se realizó mediante la inoculación intramuscular de 0.5 mL de una suspensión estéril de la cepa *M. bovis* AN5 o una suspensión de la cepa MAV D4ER, ambas muertas por calor. Cuarenta días post-inyección se realizó la depilación de ambos flancos de cada animal mediante afeitadora y crema depilatoria, y una vez preparados los cobayos se procedió a la inoculación intradérmica tanto de las mezclas de antígenos recombinantes, como de la PPD-B. En cada animal se hicieron 6 inoculaciones, 3 en cada lado, en la línea media y a una distancia suficiente una de la otra para evitar que se superpusieran las reacciones. La lectura del diámetro de la induración se realizó a las 24 hs pi.



Figura 7. Inoculación intradérmica en cobayo.

En la imagen se muestra la inoculación intradérmica en uno de los costados del cobayo utilizando una jeringa tuberculina.

1.5. Métodos de Diagnóstico

1.5.1. Intradermoreacción-Test de Tuberculina

Para evaluar el estado sanitario de los distintos grupos de bovinos se les hizo la prueba de intradermoreacción, la cual consistió en la inoculación intradérmica de 0,1 mL de PPD-A o PPD-B, según el caso, en el pliegue ano-caudal, y el grosor de la reacción de hipersensibilidad se midió con un calibre antes y a las 72 hs post inoculación. Se consideró como reacción positiva cuando las diferencias entre pre y post inoculación fueron mayores a 3 mm y negativo cuando las diferencias fueron menores a 3 mm.

1.5.2. Ensayo de Interferón Gamma (IFN- γ)

Se tomó la muestra de sangre a partir de la vena yugular de los distintos bovinos con jeringas ya preparadas con heparina, y luego se dispensó la sangre en tubos. Alícuotas de 200 μ L de sangre entera se colocaron en una placa de 96 pocillos en presencia de 25 μ L de

los distintos antígenos o mezclas antigénicas por duplicado. Las mezclas antigénicas se prepararon a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una de las proteínas constituyentes y las diferentes fracciones proteicas de diferentes pesos moleculares obtenidas a partir de la PPD-B a una concentración de 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La PPD-A y PPD-B se utilizaron a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control negativo se utilizaron pocillos con PBS para cada animal, como control positivo se utilizó *pokeweed mitogen* (PWM) 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich). La sangre con los antígenos se incubó en una estufa húmeda a 37°C con 5% de CO_2 durante 16 hs. Se obtuvo el plasma estimulado por centrifugación para luego determinar la concentración de IFN- γ con el sistema comercial de ELISA (BOVIGAM, Prionics) según las instrucciones del fabricante.

Se midió la absorbancia a $\lambda = 450$ nm con un lector de placa. A partir de los distintos valores de densidad óptica (DO), se calcularon los índices de densidad óptica (IDOs) ($\text{IDO} = \text{DO de las muestras estimuladas con antígeno} / \text{DO de las muestras estimuladas con PBS}$). Se consideraron positivas aquellas muestras con un IDO igual o mayor a 2.

Se aceptaron como resultados válidos aquellos donde el coeficiente de variación entre duplicados fue menos del 5% y la DO de los controles negativos fue menor a 0,1.

1.5.3. Evaluación de la respuesta humoral por MAPIA (del inglés *multi antigen printed immunoassay*)

Se aplicaron 20 μL de cada uno de los antígenos a evaluar en una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una membrana de nitrocelulosa de un tamaño de 15x15 cm, pudiéndose evaluar hasta 15 antígenos. Se empleó un aerolizador semiautomático (Linomat, Camag Scientific Inc.). Luego se bloqueó la membrana con 50 mL de una solución (TBS-leche 5%) durante una hora. Luego se colocaron las membranas en un equipo "*mini blotter*" (Isogen BioSolutions). Este dispositivo permite un análisis simultáneo de hasta 45 sueros con los distintos antígenos. Los sueros se utilizaron a una dilución 1:100. Después de una hora de incubación, se aspiraron los sueros, se realizaron varios lavados con TBS en el mismo *mini blotter*. Luego se retiró la membrana del dispositivo y se incubó durante una hora con proteína G conjugada a peroxidasa (dilución 1:1.500). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 min con TBS, y luego se reveló por quimioluminiscencia.

Para el revelado se utilizó el sistema *Pierce ECL western blotting* (Thermo Scientific), se colocó 10 mL de la solución sustrato provista por el fabricante sobre la membrana de nitrocelulosa durante 1 min. Luego se colocó la membrana en un *cassette* para mantenerla en oscuridad y se expuso a un *film* fotográfico (GE Hyperfilm ECL) durante 1 min. Finalmente, se reveló siguiendo el procedimiento estándar utilizando las soluciones de revelado y fijador (kodak GBX).

Luego del escaneo de las membranas, se obtuvo la intensidad cuantitativa de los *spots*, mediante el programa *ImageQuant TL Array TL Array Version 7.0*, (GE Healthcare). Este programa permite la cuantificación de la intensidad óptica de cada uno de los *spots* y determina la intensidad promedio de los *pixels* dentro de un *spot* como del *background* alrededor del *spot*. Este *background* es sustraído obteniéndose un valor neto corregido. Luego se realizó una normalización de cada *spot* para la obtención de intensidades.

1.6. Métodos gráficos y estadísticos

Los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron con el *software GraphPad Prism 6*. En la mayoría de los casos se empleó el *test* no paramétrico de Kruskal-wallis y el *post-test* de Dunn ya que los datos no presentaron una distribución normal y en algunos casos la varianza no fue homogénea.

2. Identificación, caracterización y evaluación de antígenos de *M. bovis*

2.1. Obtención de una PPD-B a partir del sobrenadante de cultivo de *M. bovis* y su utilización para la identificación de nuevos antígenos

Para la preparación de la PPD-B se siguió el siguiente procedimiento. Primero se cultivó la cepa AN5 de *M. bovis* en medio *Dorset-Henley* modificado durante 8-10 semanas. Se inactivó el cultivo mediante autoclavado a 100°C durante 3 hs. Luego se filtró el cultivo con papel de filtro 3MM (Whatman), seguido de un filtro de 0,45 µm y por último con un filtro de 0,22 µm. Una vez filtrado el sobrenadante de cultivo se procedió a concentrar las proteínas del sobrenadante mediante filtración tangencial utilizando un filtro de 5 kDa *Pellicon XL device* (Millipore Corporation).

2.2. Separación de las fracciones proteicas a partir de la preparación de PPD-B

Para la separación de las proteínas de la PPD-B en fracciones de distinto peso molecular, se resuspendió 1 mL de la preparación de PPD-B en 250 µL de *cracking buffer 5X*, luego se calentó a 100°C durante 5 min y se sembró la muestra en un *SDS-PAGE* 12% (15x16 cm).

El gel se corrió a 4,15 mA a 4°C durante 16 hs aprox. Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó la electroelución. Para la electroelución se empleó el dispositivo *whole-gel elutor* (Bio-Rad Corporation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez armado el dispositivo se conectó el equipo a una fuente de poder y se corrió 20 min a 200 mA. Luego se colectaron las fracciones eluidas con una micropipeta a partir de los 30 orificios del equipo y de esta forma se obtuvieron 30 fracciones proteicas.

Luego las fracciones fueron dializadas contra PBS con una membrana de diálisis con MWCO 6-8 kDa (Spectrum laboratories Inc.) y se mantuvieron a -80°C.

Para estimar los pesos moleculares de las distintas fracciones se resolvieron las mismas mediante *SDS-PAGE* junto con un marcador de peso molecular preteñido (Fermentas).

2.3. Identificación de antígenos de la PPD bovina por espectrometría de masas

La identificación de proteínas por espectrometría de masas se realizó en el Instituto Pasteur-Montevideo, Uruguay, durante una pasantía de un mes realizada en el transcurso de la tesis. En primer lugar se realizó la digestión de las muestras seleccionadas con tripsina

(calidad de secuenciación, Promega), incubándose a 35°C durante toda la noche. Antes del análisis por espectrometría de masas, se desalaron las muestras digeridas, utilizando microcolumnas de fase reversa (Omix®Tips, Varian). Primero se equilibraron las columnas con 20 µL de una solución acuosa de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA). Luego de cargar las muestras, se realizaron lavados de las microcolumnas con TFA 0,1% y se eluyó con TFA 0,1% en acetonitrilo (ACN) 60%.

Se evaporaron los solventes de las muestras en un *Speed Vac* (Eppendorf) y luego se resuspendieron en 12 µL de ácido fórmico 0,05% para ser luego inyectadas en un equipo nanoLC (Proxeon easynLC, Thermo Scientific). La separación de los péptidos se realizó en una columna de fase reversa (columna easy C18, 3 µm; 75 µm ID×10 cm; Proxeon, Thermo Scientific) y la elución de los péptidos se realizó utilizando ácido fórmico en agua 0,1% (v/v) y ácido fórmico en gradiente de ACN 0,1% (v/v) (0-60% ACN en 60 min; flujo 400 nL/min). La detección por espectrometría de masas en línea fue llevada a cabo en un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific Corp., USA) con ionización *nanospray* (Figura 8). Las proteínas fueron identificadas mediante la búsqueda en la base de datos NCBIInr (Noviembre 2009) con los valores m/z de los péptidos, utilizando el motor de búsqueda MASCOT (version 2.3.02) en el modo de búsqueda ion MS/MS ion y los siguientes parámetros: taxonomía complejo *M. tuberculosis*; tolerancia de péptido 1,5 Da; tolerancia de masa de fragmento 0,8 Da; y oxidación de metionina como la modificación variable permitida. Como criterio para la identificación positiva de proteínas, se consideraron solamente aquellas proteínas con scores significativos ($p < 0,05$).



Figura 8. Nano HPLC. Este equipo permite la identificación de proteínas a partir de la digestión proteolítica de las fracciones seleccionadas separándose por un nano HPLC acoplado a MS/MS.

2.4. ****Protocolo de clonado de los antígenos Fixb y CFP2**

Las secuencias codificantes de FixB y CFP2 fueron amplificadas por PCR utilizando los siguientes *primers*: CFP2-*forward* 5'-cgcgatccatgaagatggtgaaatcga-3' (sitio BamHI) y CFP2-*reverse* 5'-ataagcttcagttccctgcgccctgc-3' (sitio HindIII); FixB-*forward* 5'-cgggatccatggctgaagtactgg-3' (sitio BamHI) y FixB-*reverse* 5'-taagcttctagcccttgccggcc-3' (sitio HindIII). Como templado para las amplificaciones se utilizó ADN de *M. bovis*. El programa de amplificación fue: un paso inicial de desnaturalización de 95°C por 10 min, 35 ciclos: 95°C 1 min, 58°C 1 min y 72° 1 min seguido por un paso final de elongación a 72°C 8 min. Los marcos de lectura completos de CFP2 (507 pb) y FixB (957 pb), fueron clonados primero en el vector de clonado pGEMT (Promega) y luego subclonados en el vector pRSET-A (Invitrogen). Las construcciones derivadas fueron transformadas en células competentes *Escherichia coli* BL21 (pLys). Un inóculo de 3 mL de *E. coli* BL21 conteniendo pRSET-A con los distintos insertos fue diluido 1/20 y crecido a fase media logarítmica (DO de 0,6) en medio LB con ampicilina como agente de selección durante 5 hs. a 37°C. Una vez llegado a la DO los cultivos, se agregó IPTG (Merck) en una concentración 1 mM para inducir la expresión de las proteínas recombinantes durante 3 hs. Una vez transcurrido el tiempo se cosecharon las células por centrifugación a 12000xg, durante 20 min. a 4°C y luego fueron congeladas a -20°C hasta su siguiente uso. El sedimento celular fue lisado con 1 mL de *buffer* de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 1M, Glicerol 20%, NP40 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*) como inhibidor de proteasas, 0,5 mM, imidazol 10 mM y DNAsa 5 UE (Invitrogen), utilizando un equipo *Fast Prep* FP120 (Bio101-Savant, Holbrook) y la matriz de vidrio de 150-212 micrones de diámetro (Sigma) durante 40 seg 5,5 m/s de velocidad. Luego se centrifugó 3 min a 18.000xg para obtener las proteínas solubles. La expresión de los antígenos solubles fue confirmada por *SDS-PAGE* y posterior tinción con azul de *Coomassie* y *Western blot*.

2.5. **Purificación de las proteínas recombinantes de *M. bovis***

El *pellet* bacteriano de un cultivo de 400 mL se resuspendió en 10 mL de *buffer* de extracción, luego del protocolo de lisis descrito anteriormente, las proteínas recombinantes se purificaron utilizando una resina Ni-NTA (Níquel-ácido nitrilotriacético) (Qiagen). Para este propósito, se incubó el sobrenadante conteniendo las proteínas recombinantes solubles

durante 90 min a 4°C con la resina y luego se colocó en una columna, previamente equilibrada. Luego se realizaron lavados con el *buffer* de lavado (Tri-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, glicerol 20%, NP40 1%, imidazol 5 mM) y se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol (250 mM, 500 mM y 1 M) (Sigma) en *buffer* (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol 20%, NP40 1%). La presencia y el grado de pureza de las proteínas fue evaluada mediante *SDS-PAGE*, con posterior tinción con azul de *Coomassie* y *Western blot* de los geles réplicas.

3. Identificación, caracterización y evaluación de antígenos a partir de PPD-A y MAP

3.1. Identificación de proteínas de la PPD-A por MALDI-TOF

La PPD-A se preparó a partir de la cepa de MAV D4ER como se especificó en puntos anteriores. Luego las proteínas de la PPD-A se separaron en geles de SDS-PAGE, y las bandas obtenidas fueron enviadas para su análisis al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF (CEQUIBIEM) de la FCEyN-UBA.

3.2. Análisis bioinformático

Las 51 proteínas de MAP, provenientes de un consorcio internacional entre diferentes laboratorios, las cuales fueron detalladas en la tabla de proteínas utilizadas en este estudio (Tabla 2), fueron analizadas para la predicción de su localización subcelular con el *software* PSORTb basado en diferentes factores como: dominios transmembrana alfa hélice, presencia de péptido señal, similitud con proteínas de localización subcelular conocida, etc. (<http://www.psорт.org/psортb/>).

La búsqueda de similitud por BLAST se realizó a partir de las secuencias codificantes por comparación con la base de datos de proteínas no redundantes de GenBank.

El servidor "SignalP prediction Server" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) fue utilizado para predecir la presencia de secuencia señal de secreción y el probable sitio de corte para la enzima peptidasa. Además se realizó un análisis bioinformático de localización celular (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Por otro lado, se buscó la presencia de posibles epítopes B en las proteínas seleccionadas, empleando el servidor Web (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) y (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>).

3.3. ELISA para diagnóstico de PTB

El ELISA estándar para el diagnóstico humoral de paratuberculosis utiliza un antígeno comercial, el antígeno protoplasmático PPA-3 (Allied Monitor, Inc), el cual es una mezcla de proteínas de la cepa 18 de MAV. En paralelo se evaluó una mezcla de proteínas recombinantes de MAP, las cuales fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos luego de enfrentar por MAPIA las 51 proteínas recombinantes de MAP con sueros de animales enfermos. Para el ELISA se procedió de la siguiente manera: en una placa *Maxisorp* de 96 pocillos fondo plano (NUNC) se agregó 100 μ L de una solución 40 μ g/mL de PPA-3 en *buffer* carbonato (bicarbonato de sodio 3 gr/L, carbonato de sodio 1,45 gr/L, pH 9,6) y se incubó durante toda la noche a 4°C. En el caso del ELISA con antígenos recombinantes, se utilizó una mezcla de 7 antígenos con 30 μ g de cada antígeno por 1 mL. A partir de esta mezcla se colocaron 100 μ L por pocillo de una solución 20 μ g/mL en *buffer* carbonato. Al día siguiente, se descartó el excedente de las placas y se saturó con 100 μ L de 0,5 % m/v de gelatina A porcina (Sigma) en PBS durante una hora a 37°C, luego se realizaron cinco lavados con PBS-*Tween* 20 al 0,1 % (PBS/T) y se incubó nuevamente por una hora a 37°C con 100 μ L de una dilución 1/100 de los sueros (PBS/T con 0,5% m/v de gelatina). Posteriormente, se hicieron 5 lavados con PBS/T y se incubó durante 30 min a 37°C con 100 μ L de una dilución 1/1.500 de proteína G conjugada a peroxidasa (Biorad). Por último, se realizaron 5 lavados con PBS/T y se agregó 50 μ L de la solución sustrato de la peroxidasa (*buffer* citrato pH 5: ácido cítrico 9,6 gr/L citrato de sodio 16,2 gr/L, Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) 0,2%, H₂O₂ 30%). Se evaluó la reacción colorimétrica a los 5 min mediante la medición de la DO a λ : 405 nm, empleando un espectrofotómetro de placas (Multiskan).

RESULTADOS

PARTE I

1) Identificación y caracterización de antígenos contenidos en el derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-B)

Los derivados proteicos purificados (PPD) han sido durante décadas los antígenos empleados para el diagnóstico de infecciones micobacterianas tanto en humanos como en animales. Si bien se ha ampliado el conocimiento respecto de su composición, los componentes responsables de la inducción de la respuesta inmune no están totalmente caracterizados.

1a) Obtención de las distintas fracciones proteicas de la PPD-B

Con el objetivo de identificar antígenos en la PPD-B que participen en la inducción de la respuesta celular, se preparó el antígeno partiendo de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5, el cual se autoclavó, se clarificó y luego se concentró por ultrafiltración tangencial. La PPD-B preparada de esta forma fue separada por electroelución en 30 fracciones proteicas de diferente peso molecular, obteniendo fracciones con pesos moleculares entre <10 y 100 kDa (Figura 9).

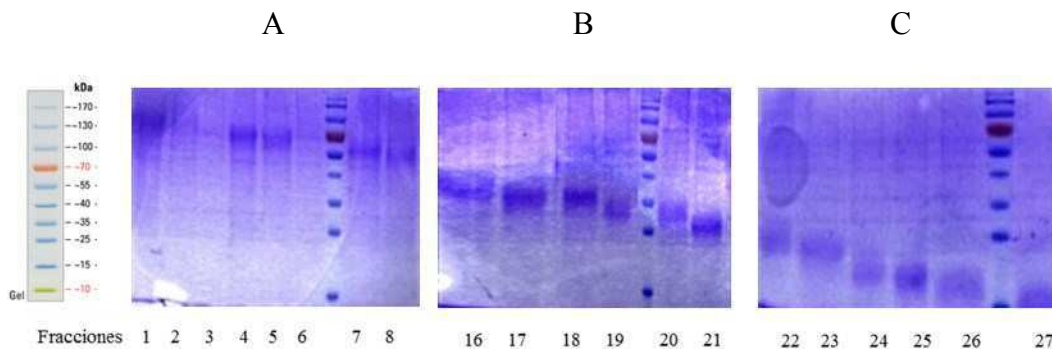


Figura 9. SDS-PAGE y tinción con *Coomassie blue* de las distintas fracciones de la PPD-B. Se muestran algunas de las 30 fracciones obtenidas por electroelución. Estas fracciones se resolvieron mediante SDS-PAGE 12%. A) Fracciones de 1 a la 8, entre 100 y 70 kDa. B) Fracciones de 16 a 21, entre 40 y 25 kDa. C) Fracciones de 22 a 27, entre 25 y 10 kDa.

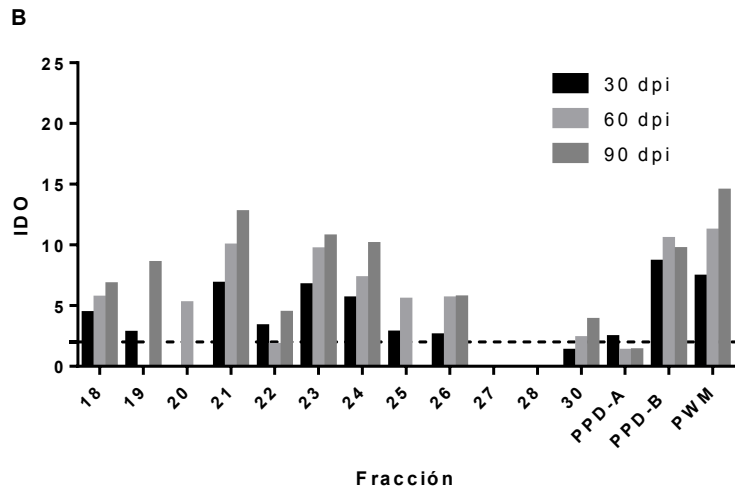
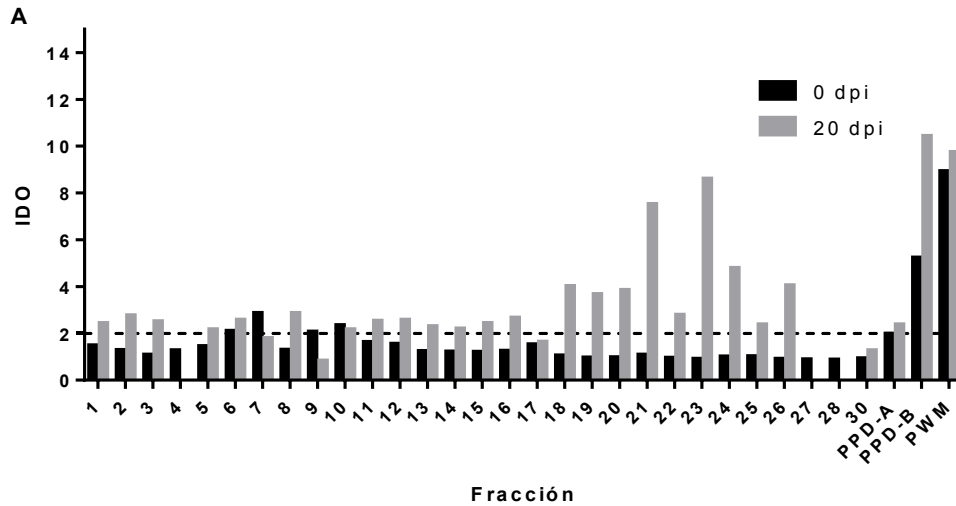
1b) Evaluación de la inmunogenicidad de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la PPD-B

Como es sabido, la respuesta inmune contra las infecciones generadas por micobacterias en los estadios tempranos es una respuesta de tipo celular. La prueba de liberación de IFN- γ resulta apropiada para evaluar esta respuesta celular, a través de la liberación de la citoquina por parte de los linfocitos CD4+ presentes en una muestra de sangre al estimular con un antígeno específico. El antígeno usualmente utilizado es PPD-B. Con el objetivo de identificar aquellas fracciones de la PPD-B que contienen a las proteínas responsables de estimular la respuesta inmune celular, se utilizaron las fracciones proteicas de diferente peso molecular para: 1bi) la evaluación *ex vivo* estimulando la sangre entera de animales experimentalmente infectados con *M. bovis* o vacunados con BCG, evaluando posteriormente la liberación de IFN- γ , 1bii) la evaluación *in vivo* midiendo la enduración producida luego de su inoculación intradérmica (IDR) en cobayos sensibilizados con *M. bovis* o *M. avium*.

1bi) Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* o vacunados con BCG

Para este ensayo se emplearon dos grupos, uno de bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y el segundo, de animales vacunados con BCG, con el fin de encontrar también fracciones que permitan la identificación de antígenos que proporcionen un diagnóstico diferencial entre animales vacunados e infectados (DIVA del inglés *differentiating infected from vaccinated*). Todas las fracciones proteicas fueron ensayadas con la sangre del grupo de animales infectados con *M. bovis* tomada a tiempo 0 y 20 días post infección (dpi) (Figura 10A). Se observó que las fracciones más antigénicas, dado que presentaron mayor liberación de IFN- γ , eran aquellas de menor peso molecular, desde la fracción 18 a la 30, que correspondían a un peso molecular entre 25 y < a 10 kDa. Luego, estas fracciones fueron seleccionadas para ser re-evaluadas en el grupo de animales infectados con *M. bovis*, con sangre obtenida a los 30, 60 y 90 dpi (Figura 10B). En este caso las fracciones 18, 21, 23 y 24 fueron las que presentaron los mayores valores de estimulación. Todas las fracciones fueron empleadas para estimular la sangre de los

animales vacunados con BCG, 30 y 60 días post vacunación (dpv). En este último caso, ninguna de las fracciones de la PPD-B mostraron valores de estimulación mayor a 2 (Figura 10C), incluidas las fracciones con peso molecular de 25 a < 17 kDa, las cuales presentaron los mayores valores de estimulación en animales infectados con *M. bovis*. Esto podría deberse a que estas fracciones contienen antígenos que no están presentes en BCG o se expresan en niveles muy bajos en la cepa vacunal.



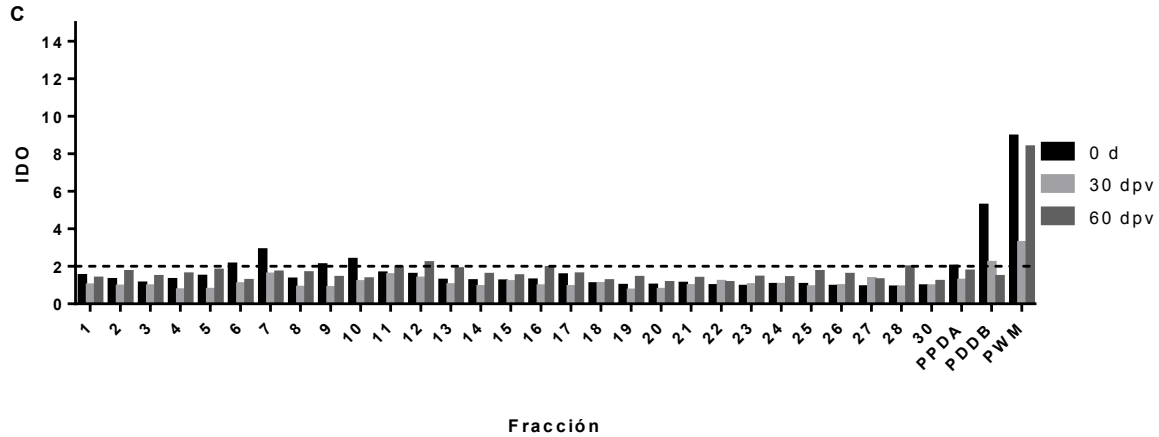


Figura 10. Respuesta de liberación de IFN- γ inducida por las fracciones de la PPD-B en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y vacunados con BCG. Las distintas fracciones de la PPD-B fueron evaluadas con la sangre de animales experimentalmente infectados (n=5), a tiempos 0 y 20 dpi (A), 30, 60 y 90 dpi (B) y en bovinos vacunados con BCG (n=5) a tiempos 0, 30, 60 dpv (B). Las muestras de sangre (200 μ L) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μ L de cada una de las fracciones con una concentración proteica de 36 μ g/mL. Se graficó la media de los IDO (índice de estimulación óptica obtenido estimulando con los antígenos/el obtenido incubando con PBS) para cada una de las fracciones a los distintos tiempos. Primero se evaluaron las 30 fracciones a los tiempos 0 y 20 dpi y a los 0, 30 y 60 dpv. Las fracciones que mostraron mayor respuesta inmunogénica fueron evaluadas nuevamente a los 30, 60 y 90 dpi. Las PPD-A y PPD-B utilizadas para estimular la liberación de IFN- γ se emplearon a una concentración de 50 μ g/mL, mientras que PWM (del inglés *Pokeweed mitogen*, Sigma) se utilizó a una concentración de 4,5 μ g/mL. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (IDO \geq 2).

1bii) Evaluación de las fracciones de PPD-B por Intradermoreacción (IDR) en cobayos sensibilizados con *M. bovis* o con *M. avium* (MAV)

Si bien el bovino es el modelo experimental más adecuado para evaluar antígenos para el diagnóstico de las infecciones causadas por *M. bovis*, ya que es el hospedador natural, las experiencias requieren de boxes de bioseguridad biológica, resultando en altos costos estas experiencias en relación a la utilización de otros modelos animales. Por este motivo decidimos utilizar el modelo de cobayo, el cual además de ser mucho más económico y accesible para manipular, es uno de los mejores modelos para utilizar en la infección con micobacterias, sobretodo del complejo *M. tuberculosis* [237]. Además, es el que se emplea de rutina para la prueba de potencia de las PPD comerciales, donde se las inocula intradérmicamente en animales sensibilizados con *M. bovis* o MAV, y luego se calcula la potencia por la induración producida. Por lo tanto, para evaluar la respuesta inmune celular *in vivo* de las distintas fracciones de la PPD-B utilizamos el modelo animal de cobayo. Para ello se emplearon 6 cobayos sensibilizados con *M. bovis* y 6 sensibilizados con MAV, a los cuales, luego de 40 días, se les inoculó intradérmicamente 100 μ L de cada fracción en 5

puntos de inoculación por animal a una concentración de 5 µg/mL y también en otro punto se inoculó la PPD-B como control, en una dilución 1/200, para alcanzar una concentración igual que la de las fracciones. A las 24 hs se realizó la lectura del diámetro de la reacción y se calcularon los siguientes porcentajes: de la induración obtenida en los cobayos sensibilizados con *M. bovis* y en cobayos sensibilizados con MAV en relación a PPD-B, así como la relación entre ambos porcentajes (Tabla 3).

Nro. Fracción	% de la induración producida en relación a PPD-B en cobayos sensibilizados con <i>M. bovis</i>	% de la induración producida en relación a PPD-B en cobayos sensibilizados con MAV	Relación de la induración producida en cobayos sensibilizados con <i>M. bovis</i> / cobayos sensibilizados con MAV
1	94,11	61,53	1,52
2	105,88	69,23	1,52
3	100	76,92	1,3
4	117,64	61,53	1,91
5	105,88	76,92	1,37
6	95	81,25	1,16
7	90	81,25	1,10
8	90	81,25	1,10
9	90	81,25	1,10
10	85	75	1,13
11	86,66	73,33	1,18
12	113,33	93,33	1,21
13	113,33	66,66	1,7
14	106,66	80	1,33
15	93,33	66,66	1,4
16	94,11	58,82	1,6
17	111,76	64,70	1,72
18	100	58,82	1,7
19	105,88	58,82	1,8
20	100	64,70	1,54
21	120	72,22	1,66
22	120	83,33	1,44
23	100	55,55	1,8
24	106,66	55,55	1,92
25	100	55,55	1,8
26	150	76,47	1,96
27	112,5	0	1,59
28	125	1,7	2,12
29	0	0	0
30	100	58,82	1,70

Tabla 3. Evaluación de las fracciones de la PPD-B por intradermoreacción (IDR) en cobayos sensibilizados con *M. bovis* y *M. avium* (MAV). Se muestran los porcentajes de induración relativos a la PPD-B de cada una de las fracciones, tanto en cobayos sensibilizados con *M. bovis* como en cobayos sensibilizados con MAV. En la tercera columna se muestra un índice calculado a partir de la relación del porcentaje de la induración obtenida en los cobayos sensibilizados con *M. bovis*/cobayos sensibilizados con MAV. En negrita se resaltan aquellas fracciones con mayor índice.

Se pudo observar que un total de 14 fracciones provocaron una induración mayor que la obtenida con la PPD-B en los cobayos sensibilizados con *M. bovis*. En los animales sensibilizados con MAV todas las fracciones produjeron una induración menor que la provocada por la PPD-B. En cuanto a la relación de la induración producida en los sensibilizados con *M. bovis* / sensibilizados con MAV, fue mayor o igual a 1,7 en 11 fracciones. La induración producida por las fracciones y por la PPD-B en animales sensibilizados con MAV indica la presencia de antígenos comunes entre las especies *M. bovis* y *M. avium*. Lo importante de los resultados aquí obtenidos es que algunas de las fracciones que presentan mayor reacción en cobayos sensibilizados con *M. bovis*, nuevamente son aquellas de menor peso molecular.

A partir de estos resultados y los obtenidos por el ensayo de IFN- γ en bovinos infectados con *M. bovis*, se seleccionaron las fracciones 18, 21, 23 y 24 para la identificación de los antígenos potenciales presentes en las mismas por espectrometría de masas. Estas fracciones, además de ser altamente inmunogénicas, contaron con una concentración proteica óptima para este análisis, no pudiéndose analizar otras fracciones como por ejemplo las fracciones 19, 22 y 26 por no contar con la concentración proteica mínima necesaria para realizar la identificación.

1c) Identificación proteica de las fracciones seleccionadas de la PPD-B por espectrometría de masas

Con el objetivo de identificar las proteínas individuales responsables de estimular la respuesta inmunogénica celular, se analizaron las fracciones de la PPD-B seleccionadas (18, 21, 23 y 24) por espectrometría de masas (HPLC acoplado a masa-masa) en el *Institute Pasteur* de Montevideo. La espectrometría de masas es una técnica eficiente para el análisis de mezclas complejas de proteínas, basada en la hidrólisis enzimática de las proteínas, la separación y análisis de la mezcla de péptidos resultante mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas en sucesión (LC-MS/MS). Los espectros generados para cada péptido (espectro MS/MS) son identificados mediante diferentes estrategias y algoritmos de identificación.

Para su identificación las muestras fueron llevadas a estado gaseoso e ionizadas mediante expulsión de electrones. Los iones formados, dirigidos al analizador, separados acorde con

su relación masa/carga (m/z) y finalmente detectados, registrándose el número de iones para cada valor de m/z.

La ventaja de este sistema es que además de tener una alta resolución requiere de muy baja concentración de proteínas en la muestra y es mucho más sencilla, ya que no requiere de la realización de SDS-PAGE en dos dimensiones, y posterior análisis de los *spot* generados. De este modo se evitan muchos pasos utilizando espectrometría de masas de trampa de iones lineal (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific Corp.) con ionización *nanospray*. A continuación se muestran los resultados para las distintas fracciones del análisis utilizando el motor de búsqueda *Mascot* en el modo *MS/MS ion search* y con los siguientes parámetros: taxonomía complejo *M. tuberculosis*, tolerancia de péptido 1,5 Da, tolerancia de masa de fragmento 0,8 Da y oxidación de metionina como la modificación variable permitida (Tabla 4).

Fracción	Número de acceso	Rv	Mb	Proteínas	Score	Longitud (aa)
23	gi15611010	Rv3874	Mb3904	Antígeno 10 kDa EsxB o CFP-10	182	100
23	gi149926	Rv2875	Mb2900	MPB70	135	193
23	gi2149409	Rv0379	Mb0386	Proteína con identidad parcial RV0379	113	116
23	gi15609513	Rv2376c	Mb2397c	Antígeno de bajo peso molecular CFP2	102	168
23	gi15610165	Rv3028c	Mb3054c	Subunidad alfa de Flavoproteína FixB transportadora de electrones	85	318
23	gi15607267	Rv0125	Mb0130	Serina proteasa PepA	70	355
23	gi248681	Rv3763	Mb3789	MMP=19 kDa proteína de membrana [<i>M. tuberculosis</i> Erdman strain 107] HspX	73	143
23	gi6469702	Rv2873	Mb2898	MPB83 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	63	220

Tabla 4. Proteínas identificadas por espectrometría de masas. Se muestran las proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de las fracciones analizadas de la PPD-B, indicando el número de acceso, el nombre del gen tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis*, el nombre de la proteína, su función y la cantidad de aminoácidos. También se indica el score obtenido en la identificación mediante el programa MASCOT.

La fracción número 23 permitió la identificación con un score significativo de siete proteínas: CFP-10, CFP2, MPB70, FixB, HspX, PepA, MPB83 y una secuencia parcial con una identidad de 60% con SecE2 (Tabla 4).

Algunos de los antígenos identificados ya fueron descritos anteriormente como CFP-10, MPB70, MPTB83, PepA y HspX. CFP-10 es un antígeno de 10 kDa secretado por *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*, forma un complejo 1:1 heterodimérico con ESAT-

6, ambos genes se expresan de la región RD1 del genoma bacteriano y juegan un papel clave en la virulencia de la infección. Esto último se comprobó porque ambos antígenos están ausentes en la vacuna *M. bovis* BCG [188]. También se ha comprobado que CFP-10 podría jugar un rol en el desarrollo de una respuesta inmune protectora [228]. MPB70 y MPB83 son proteínas de secreción involucradas en la unión a las células huésped y son sumamente específicas de *M. bovis* [146, 187]. HspX, es una proteína de secreción caracterizada previamente como inmunogénica [227]. En cuanto a PepA es una de las proteínas contenidas en la primera poliproteína a subunidad designada como candidato a vacuna contra la TB, esta vacuna consiste en la fusión de la proteína PepA (Rv0125) con la proteína PPE18 (Rv1196). PepA, es una putativa serina proteasa, aparentemente secretada y se ha visto su efecto de producir liberación de IFN- γ en individuos PPD-B positivos [238]. Las proteínas identificadas en la PPD-B que no fueron aún evaluadas como antígenos son: a) CFP2, que pertenece a la familia de proteínas CFP y b) FixB, que es una flavoproteína transportadora de electrones que funciona como aceptor de electrones y finalmente, una secuencia parcial, que presentó alineamientos significativos con una posible proteína de transporte SecE2 (*M. tuberculosis* Rv0379), con una identidad de secuencia de 60% (70/116 aa).

No fue posible identificar péptidos con un score significativo a partir de las fracciones, 18, 21 y 24, (Anexo).

2) Evaluación de las proteínas identificadas a partir de la PPD-B

El empleo de antígenos recombinantes individuales para diagnóstico de infecciones por *M. bovis* o *M. tuberculosis* ha sido cuestionado ya que es difícil que los individuos infectados reconozcan un solo antígeno y además entre individuos existe una gran heterogeneidad en el reconocimiento antigénico. Por este motivo, se busca combinar racionalmente antígenos que puedan reemplazar de forma eficiente a la PPD-B.

2a) Evaluación de las proteínas de la PPD-B caracterizadas previamente como inmunogénicas

En una primera instancia evaluamos algunas de las proteínas identificadas en la PPD-B, las cuales habían sido previamente caracterizadas en la literatura como antígenos, CFP-10, HspX, MPB83 y MPB70. A las 4 proteínas identificadas a partir de la fracción 23 de la PPD-B, sumamos los antígenos ESAT-6 y TB10.3, que habían sido evaluados previamente en nuestro laboratorio y en la literatura [228, 239]. En todos los casos se emplearon las proteínas recombinantes purificadas por cromatografía de afinidad. Las mismas fueron evaluadas en dos combinaciones distintas (mezclas M1 y M2, Tabla 5).

Mezcla	Proteína	ORF	Función	Identidad	Peso (kDa)
M1	ESAT-6	Rv3875 Mb3905	Antígeno de secreción temprana esxA	Ausente en BCG y MAP	6
	CFP-10	Rv3874 Mb3904	Antígeno de secreción esxB	Ausente en BCG y MAP	10
	MPB83	Rv2873 Mb2898	Lipoproteína de superficie celular mpb83	100% entre <i>M. bovis</i> y BCG. Ausente en MAP	22
M2	MPB70	Rv2875 Mb2900	Proteína mayoritaria inmunogénica de secreción MPB70	100% entre <i>M. bovis</i> y BCG. Ausente en MAP	16
	HspX	Rv2031c Mb2057c	Proteína de choque térmico HspX	100% entre <i>M. bovis</i> y BCG. Ausente en MAP	16
	TB10.3	Rv3019c Mb3045c	Proteína de la familia esat-6 esxR	100% entre <i>M. bovis</i> y BCG y 80% con MAP	10

Tabla 5. Composición de las mezclas antigénicas M1 y M2. En la tabla se enumeran los antígenos que componen tanto la mezcla 1 (M1) (ESAT-6, CFP10, MPB83), como la mezcla 2 (M2) (ESAT-6, CFP10, MPB83, MPB70, HspX, TB10.3), indicándose el nombre del gen tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis*, el nombre de las proteínas y el porcentaje de identidad de secuencia proteica de *M. bovis*, con *M. bovis* BCG y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). También se indica el peso molecular de los antígenos en kDa.

2ai) Evaluación de M1 y M2 por el ensayo de liberación de IFN-γ en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* o vacunados con BCG

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad celular *ex vivo* de las mezclas de antígenos M1 y M2, se midió la liberación de IFN-γ estimulando la sangre de bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*, con dichas mezclas y PPD-A y PPD-B como controles. Se tomaron muestras al comienzo de la experiencia para la evaluación del estado

pre-inmune, y a los 20, 30, 60, y 90 dpi y a los 30 y 60 dpv. Tanto M1 como M2 fueron capaces de estimular la liberación de IFN- γ en los animales infectados y no se encontraron diferencias significativas a los 30, 60 y 90 dpi entre M1, M2 y PPD-B (Figura 13A). Sin embargo, a los 20 dpi, la liberación de IFN- γ fue significativamente mayor con M1 y PPD-B que cuando se estimuló con M2 (Figura 11A).

En los animales vacunados con BCG (t=30 y 60 dpv), ninguna de las mezclas antigénicas M1 ni M2 fueron capaces de estimular la liberación de IFN- γ (Figura 11B). Sin embargo, la estimulación con PPD-B produjo valores de IDO mayores a 2 a los 30 dpv (Figura 11B). En el tiempo 0 (t=0), los niveles de IFN- γ fueron mayores a 2 cuando la sangre se estimuló con PPD-B, tanto en los animales infectados como en los vacunados (Figura 11A y B). Esto indicaría que la PPD-B puede generar reacciones inespecíficas positivas en algunos animales, posiblemente por sensibilización con micobacterias ambientales no patógenas. Este fenómeno ha sido reportado en la literatura [109]. Estos resultados indican que tanto M1 como M2, a diferencia de PPD-B, podrían ser utilizados en el diagnóstico para diferenciar animales vacunados de infectados DIVA.

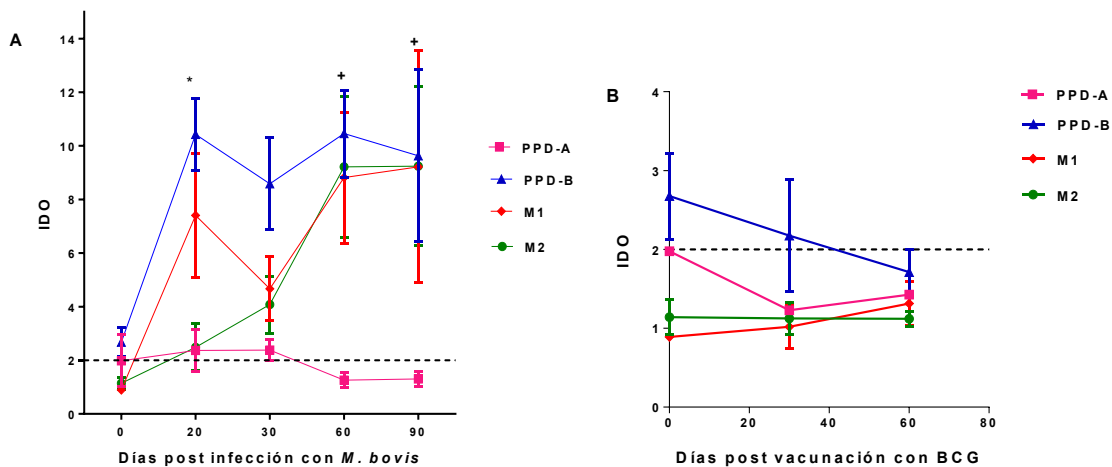


Figura 11. Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y vacunados con BCG. Se midió la liberación de IFN- γ inducida por PPD-A, PPD-B, M1 y M2 en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* (n=6) (A) y en bovinos vacunados con BCG (n=5) (B) a distintos tiempos. Las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 μ g/mL para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B se emplearon en una concentración de 50 μ g/mL. Las muestras de sangre (200 μ L) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μ L de cada antígeno. Los resultados están expresados como la media de los IDO con los desvíos estándar. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO \geq 2). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas se determinaron utilizando el *test* de Mann Whitney. *, difieren (P < 0,05) PPD-A y M2 de PPD-B y M1 a los 20dpi. +, difieren (P<0,05) los valores de PPD-A de PPD-B, M1 y M2, a 60 y 90 dpi. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos en el grupo de animales vacunados.

2a) Evaluación de M1 y M2 por el ensayo de liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con *M. bovis* y en un rodeo infectado con MAP

Con el fin de evaluar las mezclas antigénicas M1 y M2 a campo, se emplearon muestras de sangre de bovinos de un rodeo con una alta prevalencia de TBB (Rodeo Delta 30% de prevalencia de TBB) (n=10). La sangre de 6/10 animales respondieron positivamente a la estimulación tanto con M1 como con M2 en la liberación de IFN- γ , mientras que 5/10 respondieron al estímulo con PPD-B (Figura 12A). Para evaluar la especificidad de las mezclas, se utilizaron muestras de sangre de vacas de un rodeo naturalmente infectado con MAP (Rodeo Chascomús 30% de prevalencia) (n=17). Con respecto a la liberación de IFN- γ inducida por M1, M2 y PPD-B, 6/17 y 3/17 animales respondieron positivamente a PPD-B y M2 respectivamente, mientras que solamente 1/17 respondió frente al estímulo con M1 (Figura 12B). Estos resultados demuestran que la mezcla M1 es más específica que M2 y PPD-B para el diagnóstico de TBB ya que solo uno de los animales con paratuberculosis dio reacción cruzada con el reactivo M1.

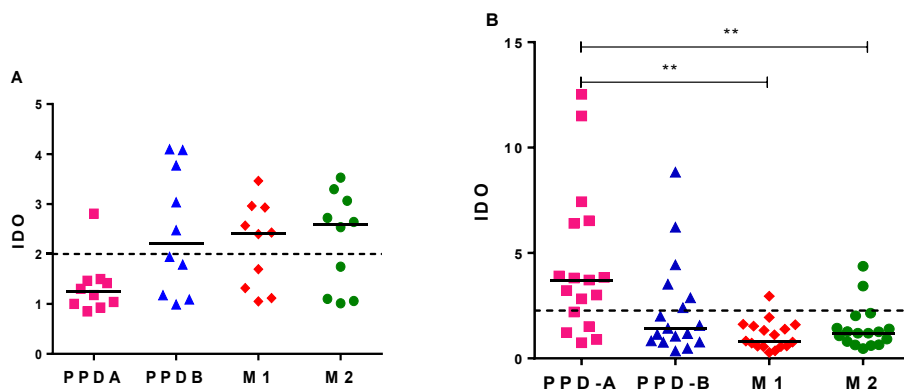


Figura 12. Ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis* y en un rodeo infectado con MAP. Se midió la liberación de IFN- γ inducida por PPD-A, PPD-B, M1 y M2 en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis* (A) (n=10) y en bovinos naturalmente infectados con MAP (B) (n=17). Las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO \geq 2). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fueron determinadas por el método estadístico de Kruskal-Wallis y post *test* de Dunn (**, $P < 0,01$).

2a) Evaluación de la potencia biológica de M1 y M2 por IDR en cobayos sensibilizados con *M. bovis* y con *M. avium*

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad celular *in vivo* de los antígenos identificados a partir de la PPD-B, se aplicaron las mezclas de antígenos en cobayos sensibilizados con *M. bovis* o MAV. Cuando se inoculó intradérmicamente M1 o M2, las reacciones producidas en los cobayos sensibilizados con *M. bovis* fueron similares a las producidas por PPD-B (Figura 13A). Sin embargo, en los cobayos sensibilizados con MAV, la PPD-B produjo valores de induración significativamente mayores que M1 y M2 (Figura 13B). Además, comparando las dos mezclas, M1 fue la que produjo los menores valores en los animales sensibilizados con MAV, resultando la mezcla con mejor potencial para el diagnóstico específico de las infecciones causadas por *M. bovis* (Figura 13B). Como controles se inocularon con PBS los cobayos sensibilizados y también las mezclas en cobayos no sensibilizados. Este último grupo no generó reacción de induración.

Los cobayos sensibilizados con MAV, inoculados con M1 y M2, arrojaron valores de induración que no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos luego de inocular PBS, que fue tomado como valor negativo (Figura 13B). Estos resultados demuestran que tanto M1 como M2 generan una respuesta específica, a diferencia de lo que ocurre con la PPD-B, siendo de mayor especificidad la inoculación con la mezcla M1. Por otro lado, la respuesta inducida con M1 en cobayos sensibilizados con *M. bovis* resultó ser similar a la producida por M2, a pesar de contar en su composición con un menor número de antígenos, por lo que los antígenos agregados a la M2 podrían considerarse redundantes (Figura 13A). Por otra parte, evaluando los 3 componentes de M1, quisimos determinar si la adición de MPB83 a ESAT-6/CFP-10 compromete la especificidad de M1. Para esto se comparó la induración producida en los cobayos sensibilizados con MAV, luego de la inoculación con una mezcla que contenía ESAT-6/CFP-10 vs M1. La respuesta fue negativa con ambas mezclas, siendo los valores similares a los obtenidos inoculando PBS. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre M1, ESAT-6/CFP-10 y PBS en los cobayos sensibilizados con MAV, por lo tanto se puede inferir que la adición de MPB83 no comprometería el diagnóstico diferencial (Figura 13B). Por el contrario, con el agregado de MPB83 a la mezcla ESAT-6/CFP-10 aumenta la sensibilidad ya que responden en promedio más animales sensibilizados con *M. bovis* que cuando se emplea la mezcla que

solo contiene ESAT-6/CFP-10 (Figura 13A), indicando que el reactivo con la mezcla con tres antígenos tendría potencialmente mayor valor diagnóstico.



Reacciones de hipersensibilidad retardada en cobayo sensibilizado con *M. bovis* 24 hs. post inoculación con las distintas mezclas



Cobayo no sensibilizado 24 hs. post inoculación con las diferentes mezclas

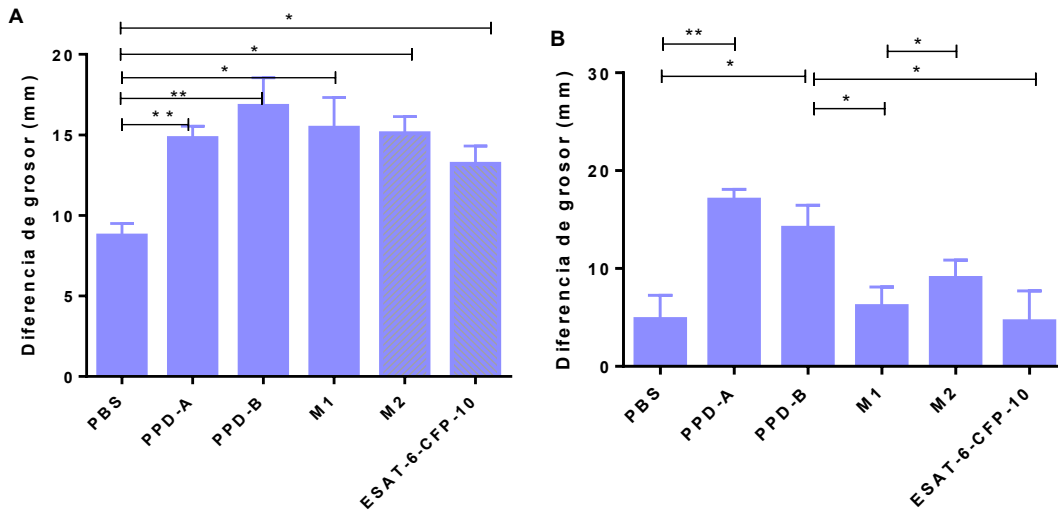


Figura 13. Respuesta de hipersensibilidad retardada en cobayos. Las mezclas antigénicas PPD-A, PPD-B, M1, M2, ESAT-6/CFP-10 y el PBS fueron inoculadas intradérmicamente en cobayos previamente sensibilizados con *M. bovis* (A) o MAV (B). Estas mezclas se prepararon en *buffer* fosfato salino (PBS) a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada antígeno o de las PPDs. Los animales recibieron inyecciones intradérmicas con 0,2 mL de cada mezcla, y de PPD-A, PPD-B. Las respuestas fueron medidas a las 24 hs. Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fueron determinadas por el *test* de Kruskal-Wallis y el post *test* de Dunn (**, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$).

2aiv) Evaluación de M1 y M2 por intradermoreacción (IDR) en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*

Dado que la IDR es la prueba más empleada para el diagnóstico TBB y oficialmente aprobada por el servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA) en nuestro país, una vez evaluadas las mezclas M1 y M2 tanto en IDR en cobayos como por el ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos, se procedió a evaluar estas mezclas en los bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* por IDR a los 90 dpi. Los resultados obtenidos se compararon con la induración producida por la PPD-B. Los valores en el área de induración fueron significativamente menores cuando se inyectó M1 y M2 respecto de la PPD-B. Sin embargo, si se consideran como positivos valores mayores a 3 mm en la diferencia de grosor de la piel adquirido luego de aplicar el reactivo, valor que se utiliza cuando se inoculan rodeos positivos, todos los animales infectados y reactivos a la PPD-B, reaccionaron también frente a M1 y M2 (Figura 14).

Vale la pena mencionar que M1 y M2 fueron inoculados intradérmicamente en una concentración de 10 μ g de cada antígeno por 0,1 mL de PBS, mientras que PPD-B fue inyectado a 100 μ g/0,1 mL. Los valores utilizados para la inoculación de los antígenos recombinantes, son los que se utilizaron en la literatura cuando se evaluaron antígenos para la detección de animales con tuberculosis por IDR [240, 241]. En cuanto a la concentración de la PPD-B de 100 μ g/0,1 mL, es la que se utiliza en la prueba oficial de IDR o test tuberculínico. Esta mayor concentración podría ser responsable de las diferencias observadas en los valores de las reacciones producidas por las mezclas con respecto a PPD-B. No se probaron concentraciones mayores de los antígenos recombinantes porque en la literatura se demostró que mayores concentraciones no lograron mejorar la respuesta [240].

Todos los animales del grupo experimentalmente infectado con *M. bovis* excepto uno presentaron lesiones macroscópicas en pulmón y/o ganglios respiratorios cuando se realizó la necropsia. Además, todos los animales fueron positivos tanto por el aislamiento de bacterias como por la PCR IS6110 partir de tejido de pulmón y nódulos linfáticos incluso el animal que no había presentado lesiones macroscópicas (Tabla 6) [234].

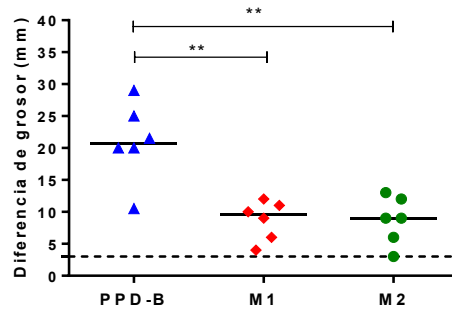


Figura 14. Respuesta de hipersensibilidad retardada en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*. Se determinó la IDR inducida por PPD-B, M1 y M2 en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* a los 90 dpi (n=6). Las mezclas fueron preparadas con 10 µg de cada antígeno en 0,1 mL de PBS y la PPD-B fue inoculada en una concentración de 100 µg por 0,1 mL. Los animales fueron inoculados intradérmicamente con 0,1 mL de M1, M2 siendo la concentración de cada antígeno 100 µg/mL y de la PPD-B de 1 mg/mL. La inoculación fue realizada en la tabla del cuello realizándose la medición del diámetro de la reacción con un calibre, antes y a las 72 hs. post inoculación. Se muestran los valores de diferencia de grosor de la piel por cada animal, la línea horizontal representa la mediana. La línea punteada representa el valor de diámetro utilizado para determinar positividad de infección (≥3mm). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fue determinada con el *test* no paramétrico de Kruskal-Wallis y el post *test* de Dunn (**, P < 0,01).

Animal	IFN-γ PPD-B	IFN-γ M1	IFN-γ M2	IDR PPD-B	IDR M1	IDR M2	Lesiones	Cultivo y PCR
1	+	+	+	+	+	+	Con lesiones	+
2	+	+	+	+	+	+	Con lesiones	+
3	+	+	+	+	+	+	Con lesiones	+
4	+	+	+	+	+	+	Sin lesión	+
5	+	+	+	+	+	+	Con lesiones	+
6	+	+	+	+	+	+	Con lesiones	+

Tabla 6. Resultados de los bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*. Se muestran los resultados obtenidos en el grupo experimentalmente infectados con *M. bovis* tanto por IDR como por el ensayo de liberación de IFN-γ, para las diferentes mezclas de antígenos, PPD-A, PPD-B y M1 y M2. También se indica si los animales presentaron lesiones en pulmón y/o ganglios respiratorios al momento de la necropsia y si resultaron positivos al aislamiento de la bacteria a partir de estos mismos tejidos y posterior PCR.

2b) Evaluación de las proteínas de la PPD-B aún no caracterizadas en bibliografía, CFP2 y FixB

Una vez evaluadas las Mezclas 1 y 2, las cuales contenían antígenos ya estudiados en trabajos previos, y con el fin de mejorar la sensibilidad de nuestra mezcla antigénica para emplear en el diagnóstico de TBB, procedimos a evaluar las 2 proteínas contenidas en la PPD-B identificadas en este trabajo, que no habían sido objeto de estudio hasta el momento como posibles antígenos: CFP2 y FixB.

Mediante un análisis bioinformático utilizando el software BLAST, evaluamos la similitud de cada una de las proteínas con aquellas homólogas presentes en otras micobacterias diferentes de *M. bovis*. Para esto comparamos la secuencia primaria de *M. bovis* cepa AF2122/97 con *M. tuberculosis*, *M. avium subsp. paratuberculosis* K10 y *M. avium subsp. hominissuis* A5. El análisis de similitud de secuencias demostró que CFP2 y FixB están presentes en el genoma de otras micobacterias tanto del complejo *M. tuberculosis* como las del complejo *M. avium*, con similitudes que van del 65% al 91% (Tabla 7).

Proteína	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	<i>M. avium subsp. hominissuis</i>
FixB	99%	91%	91%
CFP2	100%	66%	65%

Tabla 7. Análisis de similitud de los nuevos antígenos identificados de *M. bovis* con respecto a otras micobacterias. Se muestran los porcentajes de identidad de secuencia de los antígenos de *M. bovis* cepa AF2122/97 con respecto a *M. tuberculosis*, la cepa K10 de *M. avium subsp. paratuberculosis* y la cepa A5 de *M. avium subsp. hominissuis*.

2bi) Clonado, expresión y purificación de las proteínas recombinantes FixB y CFP2

Los marcos de lectura completos de CFP2 (507pb) y FixB (957pb) fueron amplificados por PCR a partir de ADN de la cepa AN5 de *M. bovis*, clonados en el vector de clonado pGEMT (Promega) y luego subclonadas en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen). La expresión fue realizada en células BL21 P-Lys, induciendo con IPTG 1 mM durante 4 hs a 37°C. La purificación de las proteínas se realizó en condiciones nativas. Las proteínas se purificaron al 95% y se obtuvo un rendimiento de 700 µg/mL para FixB y de 400 µg/mL para CFP2.

Se midió la cantidad de LPS de las proteínas recombinantes con un sistema comercial (Pierce), ya que es muy común la presencia de LPS en proteínas recombinantes pudiendo generar reacciones inespecíficas. La cantidad de LPS fue menor a 1,20 UE/mL para todas las proteínas producidas.

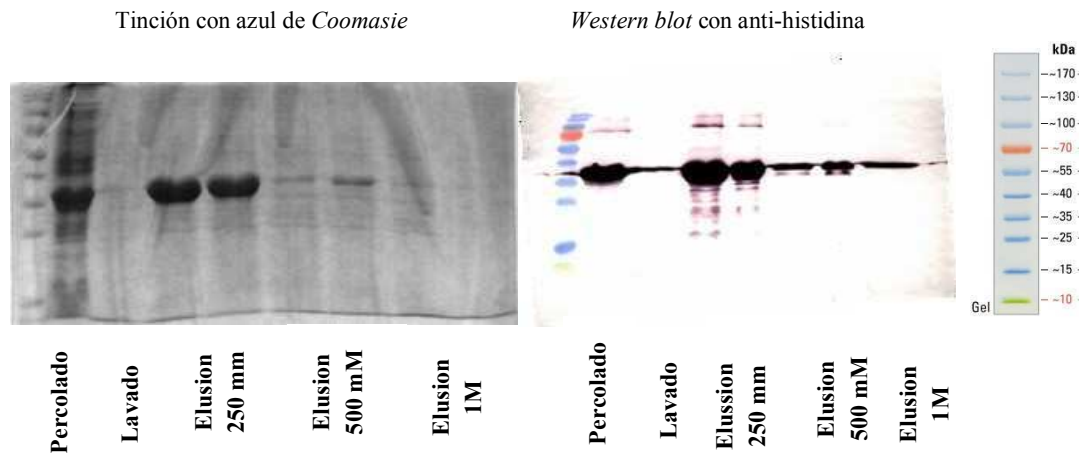


Figura 15. Tinción con azul de *Coomassie* y *Western blot* de un SDS-PAGE 15% de la purificación de la proteína FixB. PM: 31,56 kDa.

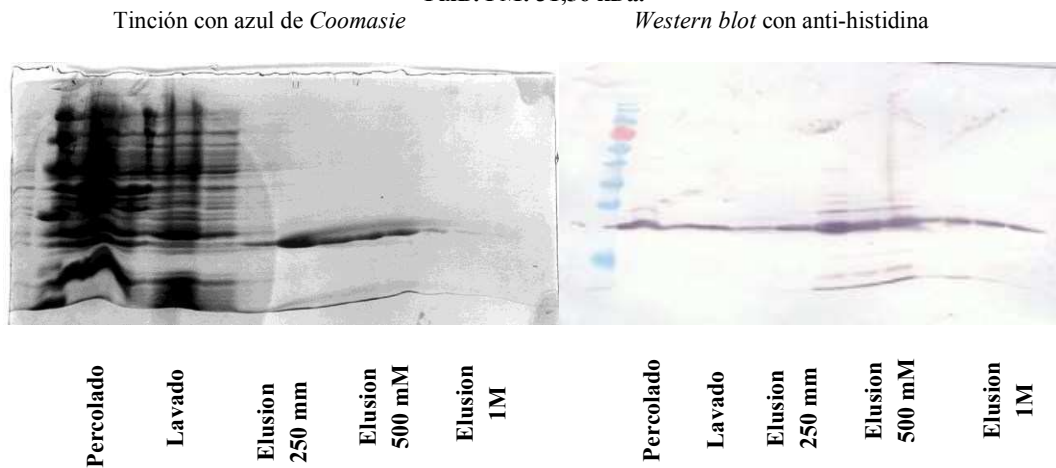


Figura 16. Tinción con azul de *Coomassie* y *Western blot* de un SDS-PAGE 15% de la purificación de la proteína CFP2. PM: 16,50 kDa.

2bii) Evaluación de la inmunogenicidad celular de las proteínas CFP2 y FixB *ex vivo* mediante el ensayo de liberación de IFN- γ

Con el fin de evaluar el valor de estas proteínas en el diagnóstico, primeramente se evaluaron individualmente mediante el ensayo de liberación de IFN- γ para estudiar su inmunogenicidad utilizando sangre de animales naturalmente infectados con *M. bovis* y con MAP. Se muestreó un grupo de animales (n=10) de un rodeo con alta prevalencia de TBB

(Rodeo Delta) y un grupo de animales (n=10) pertenecientes a un rodeo con PTB (Rodeo Tandil).

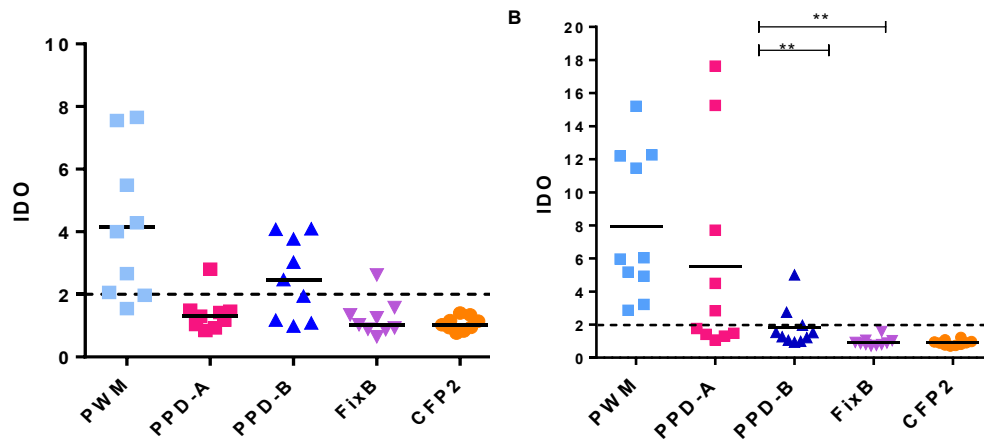


Figura 17. Evaluación de los antígenos FixB y CFP2 en la prueba de liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB y en un rodeo naturalmente infectado con MAP. Se midieron las respuestas inducidas por PPD-A, PPD-B, FixB y CFP2 en bovinos de un rodeo del Delta infectado con TBB(A) (n=9) y en un rodeo de Tandil infectado con MAP (B) (n=10). Las proteínas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO \geq 2). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fueron determinadas por el *test* de Kruskal-Wallis y post *test* de Dunn (**, P < 0,01), (***, P < 0,001), (****, P < 0,0001).

Cinco de 10 animales del rodeo con TBB respondieron positivamente a PPD-B y uno frente a FixB, mientras que ninguno de los animales presentó una respuesta positiva para CFP2 (Figura 17A). La presencia de estas proteínas en el genoma de otras micobacterias tanto del complejo *M. tuberculosis* como las del complejo *M. avium*, podría resultar en una baja especificidad de estas proteínas para su uso en el diagnóstico. Para evaluar esto último, se utilizó sangre de animales de un rodeo con PTB. Cinco de 10 animales respondieron a la estimulación con PPD-A, y 2 respondieron a la estimulación con PPD-B, mientras que CFP2 y FixB no estimularon la liberación de IFN- γ (Figura 17B). Si bien el número de animales empleado en este ensayo es bajo, estos resultados indicarían que las proteínas CFP2 y FixB son específicas, aunque individualmente mostraron baja sensibilidad.

2biii) Evaluación de los nuevos antígenos adicionados a M1 y M2 mediante liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB

Como dijimos anteriormente hay gran heterogeneidad en la respuesta a diferentes antígenos en los animales infectados con *M. bovis*, por esto encontrar nuevos antígenos para incluir en las mezclas previamente caracterizadas podría tener importante valor en el diagnóstico de TBB. Como se mostró en los apartados anteriores, M1 y M2 mostraron un buen desempeño como antígenos para ser utilizado en el diagnóstico de TBB mediante el ensayo de liberación de IFN- γ , mostrando mejor especificidad que PPD-B. Sin embargo, sería deseable aumentar los niveles de sensibilidad de estas mezclas antigénicas. Es por ello que nos planteamos evaluar la capacidad antigénica de CFP2 y FixB adicionadas a las mezclas ya caracterizadas. Para ello se realizó un muestreo en un rodeo de cría de alta prevalencia de TBB de la Provincia de Buenos Aires (Rodeo Delta).

Las nuevas mezclas antigénicas, denominadas M1-FixB (Mezcla 1 adicionada con FixB), M1-CFP2 (Mezcla 1 adicionada con CFP2), M2-FixB (Mezcla 2 adicionada con FixB) y M2-CFP2 (Mezcla 2 adicionada con CFP2), fueron utilizadas para estimular la sangre de 10 animales. De acuerdo al valor promedio de la respuesta de liberación de IFN- γ , la estimulación frente a M1-FixB y M2-FixB fue mayor a la respuesta obtenida en la estimulación con PPD-B y M1 o M2 por si solas (IDO promedio PPD-B=2,47, IDO promedio M1= 2,19, IDO promedio M2= 2,27, IDO promedio M1-FixB=2,88, IDO promedio M2-FixB=2, 60) (Figura 18A). En cuanto a los resultados con M1-CFP2 y M2-CFP2, no solo no se observó un aumento en la respuesta, sino que se obtuvo una disminución tanto al agregar la proteína a M1 como a M2 (Figura 18B). Por otra parte las diferencias entre M1 y M2 no fueron significativas, como se observó anteriormente. A pesar que en este rodeo con TBB no se observó diferencias significativas en la sensibilidad de detección de animales con TBB con M1 y M2, los resultados presentados en el apartado 2aii demostraron que la mezcla M1 es más específica que M2 y PPD-B para el diagnóstico de TBB. Por lo tanto, continuamos la evaluación, con un mayor número de animales con TBB del rodeo Delta (n=38) utilizando solamente la mezcla 1, adicionada con FixB o CFP2. Los resultados mostraron que 25/48 (45%) de los animales sospechados de estar infectados con *M. bovis* reaccionaron positivamente cuando se estimuló con PPD-B,

mientras que 17/48 (35,41%) de los animales respondieron frente a M1. La adición de FixB a M1 mejoró los resultados, respondiendo 21/48 (43,75%) animales. Por el contrario, la adición de CFP2 a M1 no mejoró la sensibilidad, reaccionando 16/48 (33,33%) animales (Figura 18B, Tabla 8). Cabe destacar que de estos 48 animales, 27 resultaron positivos a la IDR con PPD-B (reacción mayor a 3 mm), 19 sospechosos (1-3 mm) y 12 negativos (<3 mm).

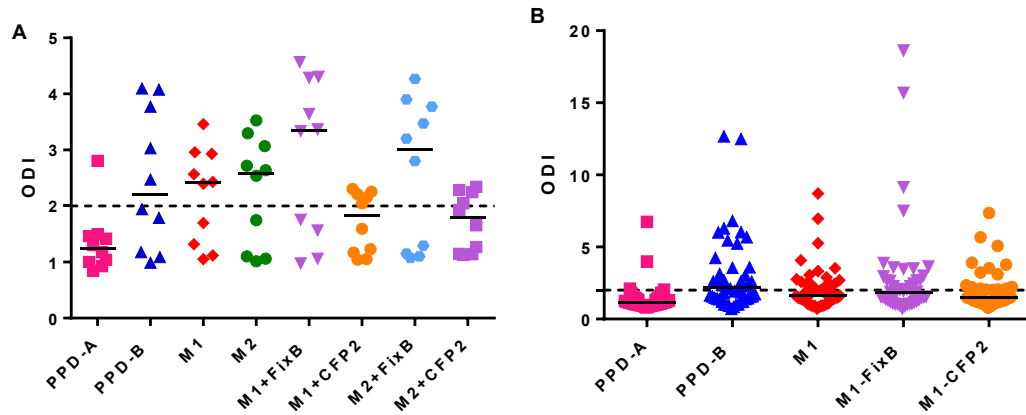


Figura 18. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos por IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con TBB. Se midieron las respuestas inducidas por PPD-A, PPD-B, M1, M2, M1-FixB, M1-CFP2, M2-FixB, M2-CFP2 en bovinos de un rodeo de cría infectado con TBB, en un primer muestreo (n=10) y en un segundo muestreo (n=38). Las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g/mL}$ para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO \geq 2). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas se determinaron con el *test* de Kruskal-Wallis y post *test* de Dunn. (**P < 0,01), (***, P < 0,001), (****, P < 0,0001).

Antígeno	Liberación de IFN- γ (IDO)									
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10
PPD-B	2,473	3,033	4,079	1,176	3,772	1,09	4,097	0,988	1,943	1,788
M1	2,398	2,567	3,461	1,118	2,96	1,051	2,43	2,93	1,318	1,697
M2	2,538	3,067	3,527	1,059	3,297	1,013	2,72	2,64	1,102	1,747
M1+FixB	3,645	3,367	4,291	1,059	4,307	1,564	4,57	3,337	0,977	1,758
M1+CFP2	2,151	2,05	2,255	1,044	2,307	1,051	2,215	1,593	1,17	1,232
M2+FixB	3,473	3,2	3,903	1,074	4,267	1,103	3,774	2,802	1,295	1,152
M2+CFP2	1,925	2,05	2,248	1,147	2,287	1,141	2,344	1,267	1,125	1,657
PPD-A	0,849	1,417	1,497	0,926	1,178	1,038	1,301	1,465	2,807	1

Tabla 8. Valores de IDO obtenidos frente a las diferentes mezclas de antígenos en el ensayo de liberación de IFN- γ en un primer muestreo en un rodeo naturalmente infectado con *M. bovis*. Los valores de la tabla representan el valor de IDO para cada antígeno por animal. Se consideró como positivo un valor de IDO mayor a 2, los mismos se encuentran resaltados en negrita.

RESULTADOS

Liberación de IFN- γ (IDO)						
Antígeno						
Animal	PPD-B	PPD-A	M1	M1-FixB	M1-CFP2	IDR
1	2,276	1,121	1,759	2,069	2,224	positivo
2	6,018	1,818	4,073	3,891	3,782	positivo
3	2,597	1,030	1,612	2,269	3,522	positivo
4	1,196	0,982	1,911	1,196	1,321	positivo
5	1,213	0,934	1,508	1,639	1,443	positivo
6	2,194	1,306	2,435	2,048	1,661	positivo
7	12,667	2,111	8,708	9,139	5,069	positivo
8	5,458	2,034	2,695	2,678	2,102	positivo
9	2,632	1,825	1,491	1,509	3,228	positivo
10	3,034	1,172	2,448	2,690	2,345	positivo
11	3,119	1,507	2,433	3,000	1,149	positivo
12	2,373	1,119	1,881	1,864	1,593	positivo
13	6,298	1,351	3,526	3,579	3,105	positivo
14	6,000	1,143	6,952	7,508	5,683	positivo
15	2,698	1,254	1,984	2,079	2,032	positivo
16	5,677	1,452	3,065	2,677	2,048	positivo
17	2,397	1,365	1,095	1,508	1,524	positivo
18	2,111	1,143	1,381	3,476	1,206	positivo
19	1,388	0,812	0,906	1,153	1,200	positivo
20	2,550	1,813	2,263	3,638	2,213	positivo
21	1,207	1,017	1,017	1,034	1,310	positivo
22	4,238	1,063	2,429	2,270	1,857	Sospechoso
23	3,594	1,328	2,891	2,953	2,063	Sospechoso
24	1,569	1,042	1,056	1,222	1,056	Sospechoso
25	2,209	1,209	1,731	1,746	1,701	Sospechoso
26	1,431	0,972	1,486	1,944	1,278	Sospechoso
27	1,725	0,942	1,449	1,536	1,464	Sospechoso
28	1,926	1,118	1,691	1,735	1,441	Sospechoso
29	1,851	1,000	1,676	1,878	1,486	Sospechoso
30	1,015	0,970	0,896	0,925	1,045	Sospechoso
31	5,234	1,297	2,578	2,641	1,531	Sospechoso
32	0,985	0,938	0,969	1,062	1,015	Sospechoso
33	6,803	3,986	2,761	15,690	3,901	Sospechoso
34	3,565	1,217	3,333	1,043	1,464	Sospechoso
35	1,791	1,254	1,075	1,030	1,179	Sospechoso
36	1,548	1,194	1,629	2,452	1,871	Sospechoso
37	1,586	1,569	1,362	1,897	2,103	Sospechoso
38	2,613	1,452	2,097	3,516	1,839	Negativo
39	1,028	0,861	0,903	1,347	1,069	Negativo
40	0,918	0,849	0,836	1,562	1,288	Negativo
41	0,711	0,967	0,722	0,733	0,789	Negativo
42	1,475	0,934	1,426	1,098	1,197	Negativo
43	1,032	0,984	1,306	1,000	1,129	Negativo
44	1,373	1,068	1,237	1,475	1,644	Negativo
45	0,841	1,058	0,928	0,899	0,870	Negativo
46	1,440	1,580	1,340	1,300	1,260	Negativo
47	12,494	6,747	5,253	18,621	7,356	Negativo
48	1,636	0,909	0,939	1,379	0,939	Negativo
Total de animales positivos	25	4	17	21	16	

Tabla 9. Valores de IDO obtenidos frente a las diferentes mezclas de antígenos en el ensayo de liberación de IFN- γ en un segundo muestreo en un rodeo naturalmente infectado con *M. bovis*. Los valores de la tabla representan el valor de IDO para cada antígeno por animal (n=48). Se consideró como positivo un valor de IDO mayor a 2, los mismos se encuentran resaltados en negrita.

A pesar de que el número de animales identificados como positivos fue mayor estimulando la sangre con PPD-B, en algunos animales se obtuvieron valores mayores de IDO con la mezcla M1-FixB que con PPD-B, indicando un alto efecto estimulador de esta mezcla en la liberación de IFN- γ por la sangre de animales con TBB (Tabla 9). A continuación, nos interesó evaluar la especificidad de las mezclas luego del agregado de los nuevos antígenos.

2biv) Evaluación de las nuevas mezclas mediante liberación de IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con PTB y en un rodeo libre de TBB y PTB

Para evaluar la especificidad de las nuevas mezclas M1-FixB y M1-CFP2, se ensayaron como antígenos para estimular la liberación de IFN- γ en sangre entera de animales de un rodeo con PTB (n=10) (Rodeo Tandil) (Figura 19A) y en otro rodeo libre (n=10) (Rodeo INTA), este último sin historial de poseer infecciones de PTB o TBB (Figura 19B). Ninguno de los 20 animales reaccionó a M1 ni a M1-FixB o M1-CFP2. Por lo tanto, la inclusión de FixB o CFP2 no compromete la especificidad de la mezcla. En esta experiencia también se puede observar que 3/10 animales de un rodeo con PTB, dieron positivos a la estimulación con PPD-B, por lo que ambas mezclas resultaron ser más específicas que PPD-B. Esta última situación, la evaluación de animales solo con PPD-B, tal como establece el plan de control y erradicación de TBB, puede inducir a resultados erróneos en la evaluación de rodeos con PTB confundiendo el diagnóstico con TBB o en rodeos con ambas enfermedades o como vimos en la experiencia anterior en rodeos libres de TBB utilizados en la primera infección experimental con *M. bovis*, la PPD-B dio resultados positivos de liberación de IFN- γ con la sangre extraída a t=0 antes de la infección (Figura 11). Estos resultados, junto con los anteriores indican que M1-FixB aumentó el reconocimiento de animales infectados con *M. bovis* sin comprometer la especificidad. Por otra parte, si bien M1-CFP2 es específica, es detectada por los mismos animales que M1-FixB en el rodeo naturalmente infectado con TBB, detectando con esta última más animales, por lo tanto no adicionamos a M1 los dos nuevos antígenos y

seleccionamos la mezcla M1-FixB para ser evaluada en los siguientes ensayos, ya que resultó la mezcla con mayor potencial diagnóstico de TBB.

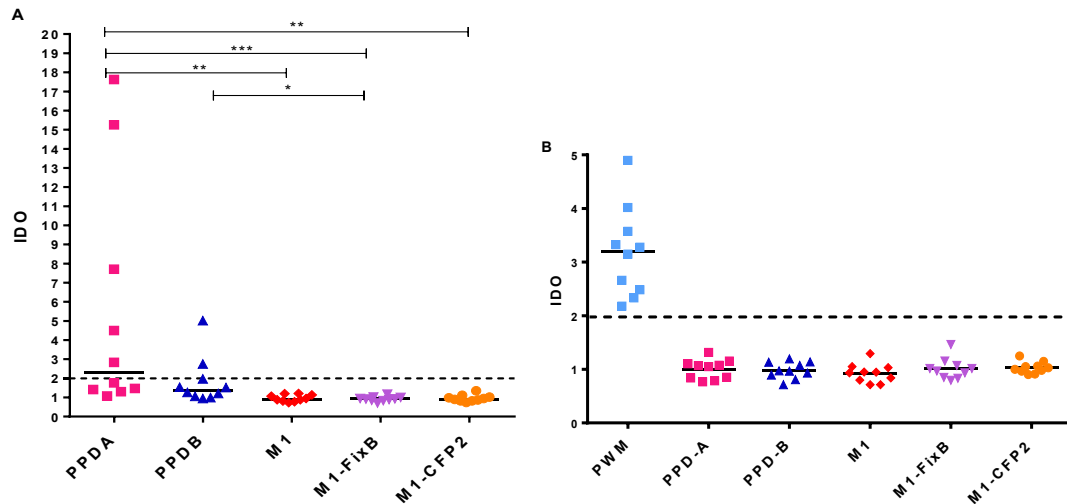


Figura 19. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos por IFN- γ en un rodeo naturalmente infectado con MAP y en rodeo libre de TBB y PTB. Se midieron las respuestas inducidas por PPD-A, PPD-B, M1, M1-FixB y M1-CFP2 en bovinos de un tambo infectado con MAP (n=10)(A) y en un rodeo libre (n=10)(B). Las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno. La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección ($\text{IDO} \geq 2$). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas se determinaron con el *test* de Kruskal-Wallis y post *test* de Dunn. (*, $P < 0,05$), (**, $P < 0,01$), (***, $P < 0,001$).

2bv) Evaluación de M1-FixB por el ensayo de liberación de IFN- γ e IDR en animales infectados con *M. bovis*

Dado que la mezcla M1-FixB resulto ser más sensible que M1 y M1-CFP-2, se procedió a evaluarla en una segunda infección experimental con *M. bovis*, así como en un rodeo con alta prevalencia de TBB de la Provincia de Santa Fe (Rodeo Suardi). Considerando que la prueba de IDR es la prueba oficial implementada a campo en nuestro país, se utilizó esta técnica para evaluar nuestra mezcla en bovinos además del ensayo de liberación de IFN- γ . Aunque ambas pruebas miden respuesta celular, pueden resultar complementarias como se demostró en varios trabajos científicos y por ello ambas están aceptadas en varios países, tal como Nueva Zelanda, para el control de la TBB.

En una experiencia realizada en colaboración con el grupo del Dr. B. Buddle llevada a cabo en Nueva Zelanda, en el que se evaluaron vacunas contra la TBB, se incluyó M1-FixB para ser evaluada como antígeno tanto por la prueba de liberación de IFN- γ como por IDR.

En el caso del ensayo de liberación de IFN- γ , 11 de los 12 animales experimentalmente infectados respondieron a M1-FixB al igual que cuando se estimuló con PPD-B y con ESAT-6/CFP-10 a los 42 dpi. Esta última mezcla se utilizó porque son los antígenos clásicos que se utilizan como diagnóstico DIVA, cuando los animales son vacunados con BCG, ya que estos dos antígenos no se encuentran en la BCG (Figura 20A).

Los animales experimentalmente infectados con *M. bovis* fueron evaluados a los 90 dpi por IDR. Once de 12 animales presentaron reacción positiva frente a la PPD-B, mientras que 8/12 animales resultaron positivos con M1-FixB (Figura 20B).

Al momento de realizarse la necropsia se observó que el animal que no reaccionó tanto a la prueba de liberación de IFN- γ ni a la IDR no presentaba lesiones macroscópicas ni microscópicas. Esto explicaría los resultados obtenidos, concluyendo que ese animal no se infectó durante la inoculación de *M. bovis* (Tabla 10).

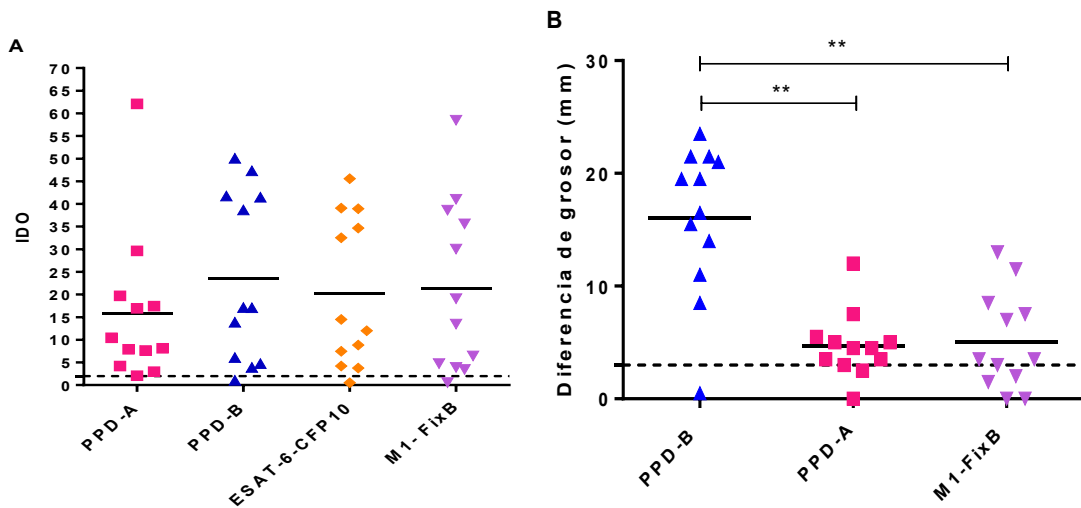


Figura 20. Evaluación de M1-FixB por ensayo de liberación de IFN- γ e IDR en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*. Para el ensayo de IFN- γ las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a los 42 dpi (A). Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno (B). La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO ≥ 2).

En el caso del IDR a los 70 dpi (B) (n=12) se inoculó intradérmicamente en el cuello 100 μL PPD-A, PPD-B y M1-FixB. La mezcla fue preparada con 10 μg de cada antígeno por 0,1 mL en PBS y PPD-B y PPD-A con 100 μg por 0,1 mL. Se realizó la medición del diámetro de la reacción con un calibre antes y a las 72 hs. post inoculación. Se muestran los valores de diferencia de grosor de la piel por cada animal, la línea horizontal representa la mediana (A). La línea punteada representa el valor de diámetro utilizado para determinar positividad de infección (diámetro ≥ 3 mm). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fueron determinadas con el *test* no paramétrico de Kruskal-Wallis y el post *test* de Dunn.

ANIMAL	PPD-B IDR	M1-FixB IDR	PPD-B IFN	ESAT-6-CFP-10 IFN	M1-FixB IFN	Lesiones
1	11	0	4,721	4,206	3,899	Con lesiones
2	23,5	11,5	13,883	12,000	19,072	Con lesiones
3	15,5	3	17,102	14,480	13,480	Con lesiones
4	8,5	3,5	47,327	45,561	35,607	Con lesiones
5	21	13	38,672	32,508	30,049	Con lesiones
6	14	8,5	6,092	8,860	4,733	Sin lesiones
7	16,5	3,5	50,082	38,959	58,474	Con lesiones
8	21,5	7	41,475	34,655	41,036	Con lesiones
9	0,5	0	1,058	0,506	0,556	Sin lesiones
10	19,5	2	17,055	7,480	6,457	Con lesiones
11	19,5	1,5	41,740	39,068	38,610	Con lesiones
12	21,5	7,5	3,892	3,777	3,458	Con lesiones

Tabla 10. Resultados de la segunda experiencia en bovinos experimentalmente infectados. Se muestran los resultados obtenidos tanto por IDR como por el ensayo de liberación de IFN- γ , para las diferentes mezclas de antígenos: PPD-A, PPD-B, M1-FixB, ESAT-6/CFP-10. También se indica si presentaron lesiones los animales al momento de la necropsia.

Por otra parte, se evaluaron 10 animales de un rodeo naturalmente infectado con *M. bovis* de la Provincia de Santa Fe. En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos por el ensayo de liberación de IFN- γ y en paralelo los resultados obtenidos en los mismos animales por IDR.

Cuando se evaluó la liberación de IFN- γ estimulando la sangre de estos animales con M1 y M1-FixB, se observó que 4 de ellos respondieron tanto al estímulo con PPD-B, como con M1 y M1-FixB (Figura 21A). En cuanto a la evaluación por IDR, tomando como punto de corte una diferencia de grosor 3 mm para determinar positividad (que es lo se utiliza en rodeos positivos), el total de los animales reaccionaron a la PPD-B, mientras que 7/10 animales reaccionaron a M1-FixB (Figura 21B). A pesar de que los valores obtenidos con PPD-B fueron mayores que los obtenidos con M1-FixB, no se obtuvieron diferencias significativas (Figura 21B). Acá quisimos evaluar, a diferencia de la experiencia anterior con animales experimentalmente infectados con *M. bovis*, PPD-B y los antígenos recombinantes a una misma concentración. Como se explicó antes, la bibliografía indica que la concentración que utilizamos de antígenos recombinantes es la menor con el cual se alcanza los mayores valores de induración, por esta razón dicha concentración no fue cambiada y lo que se realizó es una dilución de la PPD-B, que se utiliza habitualmente para el diagnóstico de TBB por IDR. A pesar de esto seguimos obteniendo valores con PPD-B

mayores que los obtenidos con M1-FixB, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos antígenos. De acuerdo a estos resultados, la utilización de antígenos recombinantes en base a los resultados obtenidos con la PPD-B para el diagnóstico de TBB, implicaría establecer diferentes puntos de cortes. Pero es importante remarcar que de acuerdo a los resultados mostrados, los antígenos recombinantes podrían complementar a la PPD-B, aportando la especificidad que ellos demostraron en el diagnóstico de TBB.

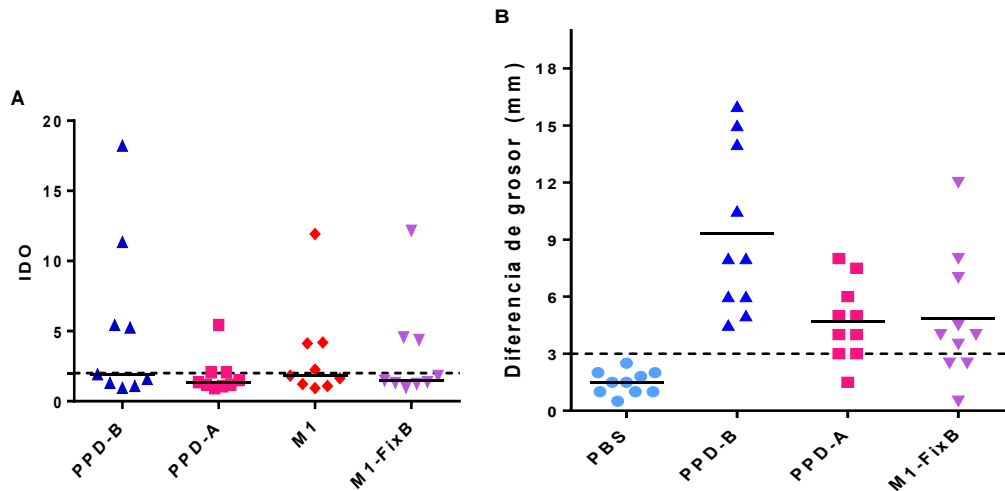


Figura 21. Evaluación M1-FixB por ensayo de liberación de IFN- γ e IDR en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*. Se evaluó M1-FixB en un rodeo con alta prevalencia de TBB (n=10). Para el ensayo de IFN- γ las mezclas fueron evaluadas a una concentración de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada proteína constituyente, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Se muestran los IDO por cada animal, la línea horizontal indica la mediana de los IDO para cada antígeno (A). La línea punteada representa el valor de punto de corte de IDO utilizado para determinar positividad de infección (IDO \geq 2).

En el caso de IDR, se inoculó intradérmicamente en la tabla del cuello 100 μL de PBS, PPD-A y PPD-B y M1-FixB. La mezcla fue preparada con 10 μg de cada antígeno por 0,1 mL en PBS y PPD-B y PPDA 10 μg por 0,1 mL. Se realizó la medición del diámetro de la reacción con un calibre pre y a las 72 hs. post-inoculación (B). Se muestran los valores de diferencia de grosor de la piel por cada animal, la línea horizontal representa la mediana (B). La línea punteada representa el valor de diámetro utilizado para determinar positividad de infección (diámetro \geq 3mm). Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas fueron determinadas con el *test* de Kruskal-Wallis y post *test* de Dunn

2c) Evaluación serológica de los antígenos de *M. bovis*

Si bien la respuesta inmune frente a la infección con *M. bovis* es principalmente celular, en algunos casos, en estadios avanzados de la enfermedad o casos de anergia, donde este tipo de respuesta no predomina o se anula por completo, podría ser útil un diagnóstico complementario, para medir la respuesta inmune de tipo humoral.

2ci) Evaluación de las mezclas de antígenos de *M. bovis* por la técnica de MAPIA

Con el fin de determinar si los antígenos de *M. bovis* caracterizados en este trabajo son útiles para su uso en el diagnóstico serológico, se realizó una evaluación de los mismos por la técnica de MAPIA (del inglés *multi antigen print immunoassay*). Esta es una técnica basada en la aplicación directa de los antígenos a una membrana mediante un aerolizador automático, que permite que sean evaluados con un gran número de sueros en simultáneo. Su simplicidad y rapidez, la convierten en una buena alternativa para realizar un primer análisis de los antígenos frente a un amplio número de sueros en simultáneo. En este caso empleamos sueros de animales de rodeos positivos a TBB y PTB y de animales de un rodeo negativo a ambas enfermedades como control.

Mediante este ensayo se observó una alta sensibilidad de las mezclas ya que 8/10 de los sueros de los animales infectados con *M. bovis* reaccionaron tanto con M1, como con M1-FixB y M1-CFP2. Por otra parte, estas mezclas resultaron específicas ya que ninguna de ellas presentó reacción, o muy débil en algunos casos, con los sueros de animales negativos o con PTB (Figura 22). Con lo cual las mezclas de antígenos resultaron buenos candidatos para utilizar en una prueba diagnóstica de TBB, de tipo serológica, como por ejemplo en un formato de ELISA.

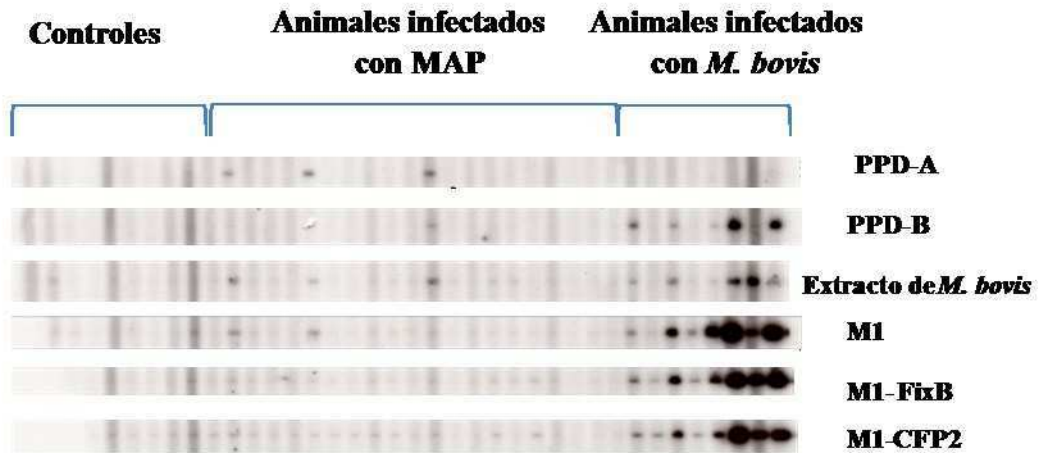


Figura 22. Evaluación serológica de las mezclas con los antígenos de *M. bovis* por la técnica de MAPIA. M1, M1-FixB, M1-CFP2 fueron evaluados por la técnica de MAPIA con una dilución 1/100 de sueros de animales sanos (n=10), animales naturalmente infectados con MAP (n=20) y animales infectados con *M. bovis* (n=10). Se utilizaron 20 µL de cada antígeno de una concentración 100 µg/mL, para la mezcla lo mismo, se utilizó 20 µL de una solución con los distintos antígenos en una concentración cada uno de 100 µg/mL. En paralelo se colocó PBS, PPD-A, PPD-B y Extracto de *M. bovis* como controles también en una concentración de 100 µg/mL. El revelado se realizó por quimioluminiscencia usando como anticuerpo secundario proteína G conjugada a peroxidasa dilución 1/1.500 en TBS-leche 5%. (a) Animales del Rodeo INTA Castelar libre de PTB y TBB con cultivo negativo a MAP a partir de material fecal e IDR negativos (animales control negativos) (n=10). (b) Animales naturalmente infectados con MAP de un Rodeo de Tandil con una prevalencia de PTB de 40%, confirmados por cultivo a partir de material fecal o ELISA (n=18). (c) Animales experimentalmente infectados con *M. bovis* con lesiones (n=5) y naturalmente infectados de un rodeo con una 40 % de prevalencia de TBB (n=6).

Intensidad promedio de los spots obtenida por las mezclas expuestas a los sueros					
	M1	M1-FixB	M1-CFP2	PPD-A	PPD-B
Control	33.707	22.310	2.440	19.031	17.082
PTB	29.087	27.568	32.063	26.414	20.694
TBB	75.916	83.202	83.611	3.135	64.474

Tabla 11. Intensidad de los spots obtenidas por la técnica de MAPIA para las mezclas de antígenos de *M. bovis*. Las intensidades fueron obtenidas utilizando el software *ImageQuant TL Array Version 7.0*, (GE Healthcare, Pittsburgh, PA). PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA).

Por otra parte se evaluaron las distintas mezclas, M1, M1-FixB y M1-CFP2, con los sueros de los animales experimentalmente infectados con *M. bovis* a los distintos tiempos, 0, 40, 60 y 90 dpi y con los sueros de los animales vacunados con BCG, a tiempo 0 y a los 40 dpv. Lo que se observó es que ninguno de los sueros reconocía los antígenos a tiempo 0, ni tampoco los sueros de los animales vacunados, mientras que algunos de los sueros a los 40 dpi ya reconocían las 3 mezclas de antígenos, aumentando el número de animales que reconocían a las mezclas, así como la intensidad de la banda cuando avanzamos en el

tiempo luego de la infección (90dpi). Por otra parte, PPD-B fue reconocido recién a los 60 dpi solamente por un animal, y a los 90 dpi por 2 animales con una menor intensidad. Con lo cual las mezclas de antígenos, M1, M1-FixB y M1-CFP2, además de ser útiles para el diagnóstico de tipo celular, fueron eficaces en el diagnóstico serológico. Las 3 mezclas resultaron específicas tanto con animales sanos como también fueron útiles para discriminar entre animales vacunados de infectados con *M. bovis*.

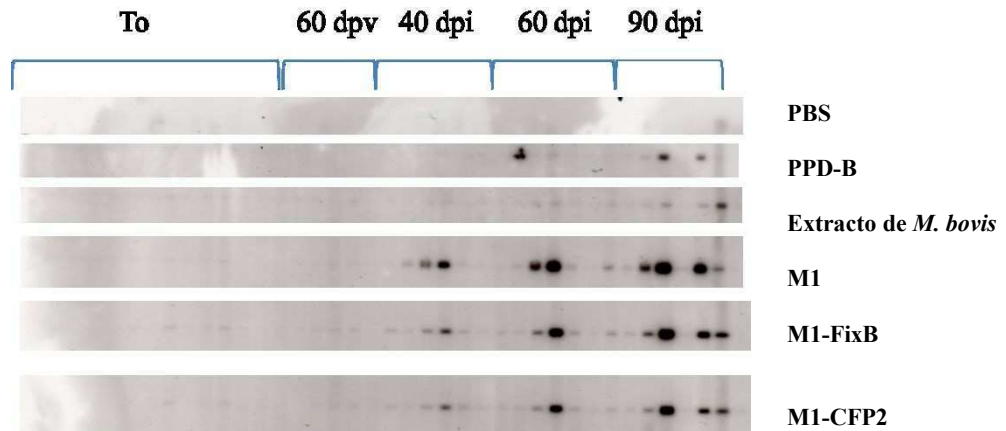


Figura 25. Evaluación serológica de las mezclas con los antígenos de *M. bovis* por la técnica de MAPIA a los distintos tiempos post infección. M1, M1-FixB, M1-CFP2 fueron evaluados por la técnica de MAPIA con una dilución 1/100 del suero de los animales. Se utilizó suero de los animales: a t=0, de animales vacunados con BCG a 60 dpv (n=5) y animales experimentalmente infectados con *M. bovis* a los 40, 60 y 90 dpi (n=6). Se utilizaron 20 μ L de cada antígeno de una concentración 100 μ g/mL, para la mezcla lo mismo, se utilizó 20 μ L de una solución con los distintos antígenos en una concentración cada uno de 100 μ g/mL. En paralelo se colocó PBS, PPD-B y Extracto de *M. bovis* como controles también en una concentración de 100 μ g/mL. El revelado se realizó por quimioluminiscencia usando como anticuerpo secundario proteína G conjugada a peroxidasa dilución 1/1.500 en TBS-leche 5%.

2cii) Evaluación de M1-FixB por ELISA

Una vez evaluadas las distintas mezclas de antígenos de *M. bovis* por la técnica de MAPIA, procedimos a evaluar M1-FixB por la técnica de ELISA. Se evaluó solamente esta mezcla, ya que no hubo diferencias entre las distintas mezclas en el reconocimiento de los diferentes sueros en la experiencia anterior, y como M1-FixB resultó ser la más eficiente para el diagnóstico celular, resultaría más sencillo y económico producir una sola mezcla para ambos ensayos.

En este caso, se observó al igual que en la experiencia anterior, que tanto el número de animales como la intensidad, en este caso la absorbancia, aumenta a los 90 dpi.

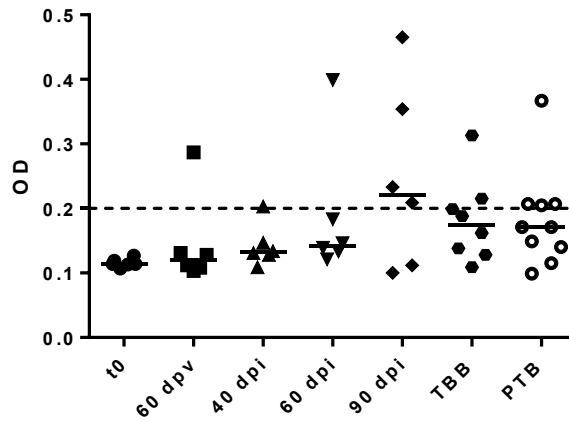


Figura 26. Evaluación serológica de M1-FixB por la técnica de ELISA. Se realizó una mezcla madre utilizando 30 μg de cada antígeno en un volumen de 1 mL de PBS. A partir de esta mezcla se colocaron 100 μL por pocillo de una solución 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *buffer* carbonato. La dilución utilizada de los sueros fue 1/100. Se utilizó un panel de sueros de 6 animales experimentalmente infectados con *M. bovis* a los distintos tiempos ($t=0$, 40 dpi, 60 dpi, y 90 dpi), 6 sueros de animales vacunados con BCG ($t=60$ dpv), 8 sueros de un rodeo con alta prevalencia de TBB (Rodeo Suardi) ($n=8$) y 10 sueros de animales de un rodeo con PTB. Se graficó la mediana para cada uno de los tiempos. Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas se determinaron con el *test* de Kruskal-Wallis y *test* de Dunn. (* $P < 0,05$).

PARTE II

1) Evaluación de antígenos de MAP y antígenos contenidos en el derivado proteico purificado de *M. avium* (PPD-A)

Tanto para disminuir la prevalencia de TBB y PTB así como para la utilización de vacunas contra ambas enfermedades, es de suma importancia mejorar el diagnóstico de las mismas. Por eso en esta parte del estudio nos propusimos también la búsqueda de antígenos específicos de MAP para mejorar el diagnóstico de PTB.

A diferencia de TBB la respuesta inmune humoral en los animales con PTB es posible detectarla desde los estadios subclínicos de la enfermedad (incluso cuando el animal aún no elimina la bacteria). Por lo tanto, pruebas que detecten anticuerpos específicos de MAP, son relevantes en el diagnóstico de PTB. Las pruebas descritas y desarrolladas para evaluar la respuesta humoral inducida por la infección con MAP son: ELISA, fijación de complemento (FC) e inmunodifusión en gel de agar (AGID). FC y AGID presentan una sensibilidad baja con lo cual deben ser optimizadas. Es necesario destacar que estas técnicas generalmente emplean antígenos totales de MAV, debido a que es de crecimiento más rápido que MAP. Es un objetivo de muchos laboratorios de investigación encontrar antígenos de MAP para utilizarlos en forma recombinante para el diagnóstico serológico de PTB y de esta forma independizarse del crecimiento lento de MAP y además tener un diagnóstico específico al evitar antígenos contenidos en MAP que son iguales o similares a los presentes en micobacterias ambientales u otros microorganismos patógenos y no patógenos.

Otra alternativa para evaluar la presencia de anticuerpos específicos es a través de un ensayo de *immunoblot* que puede incorporar el análisis de distintos antígenos al mismo tiempo, este ensayo se denomina MAPIA (del inglés *multi antigen printed immunoassay*). Esta prueba es un ensayo de fácil implementación ya que se requieren los antígenos recombinantes y el suero del animal enfermo, de fácil obtención en una única visita al rodeo.

1a) Caracterización de antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Teniendo en cuenta esto, con el fin de incrementar el conocimiento de los antígenos de MAP, se evaluó un panel de 51 antígenos potenciales de MAP por la técnica de MAPIA (Tabla 12). Estos antígenos fueron seleccionados por un consorcio de investigadores dentro de un proyecto europeo en el que participó nuestro grupo de trabajo. En este proyecto, denominado *PTBTool*, los investigadores participantes proporcionaron los potenciales antígenos de MAP y estos fueron evaluados en Argentina.

Caracterización de antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

Tabla 12. Caracterización bioinformática del panel de 51 antígenos potenciales de MAP evaluados en el presente estudio. Se empleó el programa PSORTb (sitio web) para estimar el peso molecular, predicción de localización y homología con proteínas de otras micobacterias. Las 7 proteínas indicadas en negrita son las seleccionadas para el diagnóstico de PTB

Antígeno (ORF no.)	Localización	PM teórico	Homología con otras micobacterias
MAP 0011	Citoplasmática	19,19 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A regulada por hierro en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 0034	Citoplasmática- Membrana	44 kDa	Proteína P44 en <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAP 0038	Desconocida	48,70 kDa	Proteína hipotética Mb0027 en <i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97
MAP 0047c	Extracelular	41,10 kDa	Proteína de la familia Lpp-LpqN conservada en <i>Mycobacteriaceae</i>
MAP 0187=SodA	Extracelular	23 kDa	Superoxido dismutasa en <i>M. bovis</i>
MAP 0209c=CSP	Extracelular	56,5 kDa	Proteína potencialmente involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano en <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
MAP 0210c	Citoplasmática- Membrana	30,7 kDa	Antígeno secretado P36/P34 en <i>M. bovis</i>, con una identidad del 60% con la de MAP
MAP 0211	Citoplasmática	46 kDa	UDP-galactopiranososa mutasa glf en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 0297	Citoplasmática	55,23 kDa	Proteína hipotética Mb1161 en <i>M. bovis</i> AF2122/97
MAP 0334	Desconocida	34,38 kDa	Oxidoreductasa en <i>M. bovis</i> AF2122/97]
MAP 0693	Citoplasmática	31,63 kDa	putativa hidrolasa o aciltransferasa de la superfamilia alfa/beta
MAP 0900	Citoplasmática -Membrana	29,6-34 kDa	Antígeno 34 kDa en <i>M. tuberculosis</i> CDC1551
MAP 0946c	Citoplasmática -Membrana	33,50 kDa	Factor sigma en <i>M. avium</i> 104
MAP 1012c	Citoplasmática	37,37 kDa	Proteína hipotética TMAG_01006 en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 1050c	Citoplasmática	33 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, ciclofilina conservada en <i>Mycobacterium</i>
MAP 1272	Extracelular	33,40 kDa	Proteína de la familia NLP/P60 en <i>M. tuberculosis</i> CDC1551
MAP 1293	Desconocida	49,24 kDa	Histidinol deshidrogenasa hisD en <i>M. tuberculosis</i>

RESULTADOS

Antígeno (ORF no.)	Localización	PM teórico	Homología con otras micobacterias
MAP 1308	Desconocida	46 kDa	Prolipoproteína diacilgliceril transferasa lgt en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 1564c	Desconocida	23,01 kDa	Deshidrogenasa in <i>M. bovis</i>
MAP 1589c=AhpC	Citoplasmática	21,60 kDa	Alquil hidroxiperoxidasa reductasa (subunidad C) en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 1653=Tpx	Desconocida	16,7-20 kDa	Tiol peroxidasa tpx en <i>M. tuberculosis</i> T17
MAP 1693c	Desconocida	18,30 kDa	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa. proteína conservada en <i>Mycobacterium</i>
MAP 1754c	Citoplasmática -Membrana	30,84 kDa	Proteína hipotética Rv2005c en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 1889c	Citoplasmática	28 kDa	Proteína Wag31 en <i>M. avium</i> 104
MAP 2020	Desconocida	26,9 kDa	Cutinasa en <i>M. bovis</i> AF2122/97
MAP 2167	Extracelular	17 kDa	Proteína antigénica de bajo peso molecular CFP2 en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 2182	Citoplasmática -Membrana	16 kDa	Nitroreductasa dependiente de Deazaflavina de la familia de <i>Mycobacterium</i>
MAP 2513	Citoplasmática	36,5 kDa	Alkanal monooxigenasa cadena alfa en <i>M. avium</i> 104
MAP 2593c	Citoplasmática	58,82 kDa	1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa
MAP 2609	Citoplasmática -Membrana	11,4 kDa	Antígeno celular T de bajo peso molecular TB8.4 en <i>M. tuberculosis</i> .
MAP 2676c	Citoplasmática	13,89 kDa	Proteína hipotética MAV_1246 en <i>M. avium</i> 104
MAP 2685	Desconocida	21,20 kDa	Proteína BCG_1169c en <i>M. bovis</i> BCG str. Pasteur 1173P2
MAP 2878c	Citoplasmática	25,43 kDa	Dihidrodipicolinato reductasa en <i>M. bovis</i> BCG cepa Pasteur 1173P2
MAP 2942c	Extracelular	18,30 kDa	Antígeno secretado soluble MPT53 en <i>M. tuberculosis</i>
MAP 2956	Citoplasmática	30,02 kDa	Proteína ribosomal 30S S2 en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 3175c	Citoplasmática	41,38 kDa	Factor 2 de liberación de cadena peptídica en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv

RESULTADOS

Antígeno (ORF no.)	Localización	PM teórico	Homología con otras micobacterias
Mb 3341c	Desconocida	10,63 kDa	Equivalente a Rv3312A de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 3402	Citoplasmática	33,28 kDa	Tiosulfato sulfurotransferasa en <i>M. bovis</i> AF2122/97
MAP 3457	Citoplasmática	47,61 kDa	O-acetilhomoserina sulfilhidralasa metC en <i>M. tuberculosis</i> T92
MAP 3491	Citoplasmática	28,16 kDa	Hidrolasa en <i>M. tuberculosis</i> SUMu003
MAP 3527	Desconocida	35,70 kDa	Serina proteasa PepA en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 3627	Citoplasmática	37,37 kDa	O-metiltransferasa en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 3651	Citoplasmática	44 kDa	Acil-CoA deshidrogenasa fadE3 en <i>M. bovis</i> BCG
MAP 3692c	Citoplasmática	47 kDa	fabG 3-quetoacil-ACP reductasa en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 3840	Citoplasmática	67 kDa	Proteína de choque térmico 70, chaperona DnaK en <i>Mycobacterium</i>
MAP 3841	Desconocida	23,58 kDa	Proteína de choque térmico GrpE en <i>M. bovis</i> AF2122/97
MAP 3857	Citoplasmática	18,74 kDa	Orotato fosforibosiltransferasa en <i>M. tuberculosis</i> CDC1551
MAP 3936	Citoplasmática	57 kDa	Proteína de choque térmico 65 kDa, GroEL en <i>Mycobacterium</i> sp
MAP 4000c	Desconocida	12 kDa	Proteína de la familia Esat-6 esxF en <i>Mycobacterium</i> y proteína hipotética Mb3935c en <i>M. bovis</i>
MAP 4147	Citoplasmática	42,09 kDa	Ferredoxina reductasa en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
MAP 4227c	Citoplasmática	30,15 kDa	Proteína hipotética Rv3463 en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv

.1b) Evaluación del panel de antígenos de MAP para el diagnóstico serológico de paratuberculosis

Con el fin de evaluar el potencial de estas 51 proteínas recombinantes de MAP para diagnóstico humoral, se seleccionó la técnica de MAPIA que permite explorar diferentes proteínas en simultáneo para su capacidad antigénica. Como se mencionó anteriormente, esta técnica consiste en la aplicación directa de las proteínas sobre la membrana para su posterior evaluación mediante *immunoblot* con 45 sueros en simultáneo. Para este ensayo se emplearon 25 sueros de animales infectados con MAP (Rodeo Tandil), 8 sueros de animales experimentalmente infectados con *M. bovis* y 10 sueros de animales sanos como control (Rodeo INTA Castelar). Estos dos últimos grupos para explorar la especificidad de los antígenos.

Los valores promedio de las intensidades para las distintas proteínas correspondientes a la reacción colorimétrica en cada cuadrado se midieron con el programa *ImageQuant* (Tabla 13). Las muestras con valores de densidad óptica mayor que la media obtenida con el control negativo (PBS) se consideraron positivos. La cantidad de animales que reaccionaron con cada proteína se muestran en la Tabla 14. A partir de este análisis se seleccionaron aquellas proteínas que no reaccionaban con los sueros de animales con TBB y que mostraron una alta intensidad, mayor que con los sueros de animales infectados con MAP que con los sueros de animales no infectados y los sueros de animales con TBB. Estos antígenos fueron MAP 0038, MAP 0210c, MAP 1272, MAP 1693c, MAP 0209. También se seleccionaron algunas proteínas que fueron detectadas por un mayor número de sueros de animales con PTB que animales con TBB o sanos, a pesar de no tener una elevada reactividad. Estos antígenos fueron MAP 2020 y MAP 2513 (resaltados en negrita en las Tablas 13 y 14).

La evaluación *in silico* de los antígenos seleccionados indicó que: MAP 0038 se encuentra también en *M. bovis*. MAP 1272 codifica para una proteína que posee un dominio NLP/P60 de función desconocida que está presente en varias lipoproteínas. MAP 0210c codifica para una proteína similar a la proteína P36/Erp de *M. bovis*, una proteína inmunogénica, ampliamente estudiada en nuestro laboratorio y por Willemsen [233, 263]. MAP 0209c codifica para una proteína potencialmente involucrada en la biosíntesis de peptidoglicano.

RESULTADOS

MAP 1693c es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa, proteína conservada en *Mycobacterium*. MAP 2020 es una proteína con un 80% de identidad con una cutinasa de *M. bovis*. MAP 2513 codifica para una proteína Alkanal monooxigenasa cadena alfa. El análisis con el programa PSORTB predijo que MAP 2513 se localiza en el citoplasma, MAP 0210c en la membrana y citoplasma, mientras que MAP 1272 y MAP 0209c serían secretadas, para el resto de las proteínas se desconoce su localización (Tabla 12). De las siete proteínas seleccionadas únicamente ha sido evaluada previamente o reportada en la literatura como antígeno de MAP, MAP 0210c, la cual ha sido estudiada por Willemsen y colaboradores [233]. A partir de estos resultados se constituyó una mezcla con los 7 antígenos para ser evaluada por MAPIA con un mayor número de sueros.

Antígeno	Intensidad promedio de las proteínas expuestas a los sueros			Antígeno	Intensidad promedio de las proteínas expuestas a los sueros		
	Control (n=10)	Infectados con PTB (n=25)	Infectados con TBB (n=8)		Control (n=10)	Infectados con PTB (n=25)	Infectados con TBB (n=8)
MAP 0011	112	135	0	MAP 2513	41	164	291
MAP 0034	240	247	0	MAP 2593c	105	0	100
MAP 0038	141	860	0	MAP 2609	137	308	0
MAP 0047	344	309	0	MAP 2676	201	138	0
MAP 0187c	184	0	0	MAP 2685	317	323	0
MAP 0209c	367	499	0	MAP 2878	307	323	0
MAP 0210c	0	398	0	MAP 2942	136	251	0
MAP 0211	0	572	0	MAP 2956	345	119	424
MAP 0297	117	225	130	MAP 3175	343	130	0
MAP 0334	108	167	1	Mb 3341	159	171	178
MAP 0693	100	142	120	MAP 3402	205	178	250
MAP 0900	0	749	0	MAP 3457	447	365	325
MAP 0946	218	900	295	MAP 3491	286	454	177
MAP 1012	280	0	0	MAP 3527	528	414	635
MAP 1050	268	275	0	MAP 3627	207	265	0
MAP 1272	223	733	0	MAP 3651	1000	906	958
MAP 1293	585	481	396	MAP 3692c	305	212	0
MAP 1308	163	894	0	MAP 3840	0	198	712
MAP 1564	259	344	0	MAP 3841	707	678	457
MAP 1589c	323	682	466	MAP 3857	373	267	265
MAP 1653	398	844	461	MAP 3936	381	544	691
MAP 1693	226	967	209	MAP 4000c	134	242	0
MAP 1754	0	142	27	MAP 4147	1000	556	0
MAP 1889c	280	180	494	MAP 4227c	138	101	0
MAP 2020	0	150	228	PPD-A	208	105	256
MAP 2167	315	0	0	PPD-B	346	531	1468
MAP 2182c	223	117	192	PPA-3	131	609	108

Tabla 13. Intensidad de los *spots* obtenidas por la técnica de MAPIA para el panel de antígenos de MAP. Las intensidades fueron obtenidas utilizando el *software ImageQuant TL Array Version 7.0*, (GE Healthcare). Los antígenos

RESULTADOS

seleccionados para la mezcla se muestran en negrita. PPA-3: antígeno protoplasmático (Allied Monitor); PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA).

Antígeno	Nro. de sueros con reacción positiva			Antígeno	Nro. de sueros con reacción positiva		
	Control (n=10)	Infectados con PTB (n=25)	Infectados con TBB (n=8)		Control (n=10)	Infectados con PTB (n=25)	Infectados con TBB (n=8)
MAP 0011	0	5	4	MAP 2513	1	6	2
MAP 0034	5	5	0	MAP 2593c	1	1	2
MAP 0038	3	8	0	MAP 2609	2	4	0
MAP 0047	3	4	0	MAP 2676	1	4	0
MAP 0187c	1	1	0	MAP 2685	10	2	0
MAP 0209c	4	9	0	MAP 2878	10	2	0
MAP 0210c	0	8	0	MAP 2942	2	7	0
MAP 0211	0	6	0	MAP 2956	1	1	1
MAP 0297	2	4	1	MAP 3175	4	4	4
MAP 0334	2	15	1	Mb 3341	4	6	3
MAP 0693	1	1	1	MAP 3402	2	20	1
MAP 0900	0	3	0	MAP 3457	10	8	4
MAP 0946	1	8	0	MAP 3491	7	7	1
MAP 1012	2	0	0	MAP 3527	6	25	8
MAP 1050	4	9	0	MAP 3627	3	4	0
MAP 1272	2	8	0	MAP 3651	10	14	8
MAP 1293	10	13	1	MAP 3692c	5	8	0
MAP 1308	2	2	0	MAP 3840	0	3	3
MAP 1564	5	1	0	MAP 3841	10	14	1
MAP 1589c	2	9	2	MAP 3857	10	4	4
MAP 1653	10	20	8	MAP 3936	5	8	4
MAP 1693	3	12	2	MAP 4000c	3	5	0
MAP 1754	0	5	4	MAP 4147	1	3	0
MAP 1889c	7	7	3	MAP 4227	1	1	1
MAP 2020	0	9	2	PPD-A	6	1	4
MAP 2167	3	0	0	PPD-B	4	16	3
MAP 2182c	5	1	2	PPA-3	1	18	2

Tabla 14. Reactividad de sueros bovinos frente a un panel de antígenos seleccionados de MAP. Los sueros con valores de intensidades mayores a la media obtenida con PBS fueron consideradas positivas. Se muestran en negrita los antígenos seleccionados para ser evaluados en una mezcla antigénica. PPA-3: antígeno protoplasmático de Paratuberculosis (Allied Monitor); PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA).

1bi) Evaluación de los siete antígenos de MAP seleccionados por la técnica de MAPIA

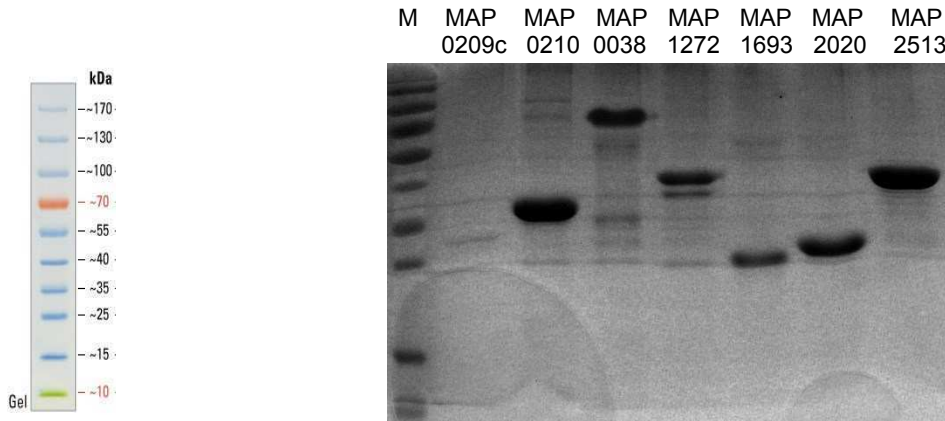


Figura 25. SDS-PAGE de las proteínas recombinantes seleccionadas de MAP. Para evaluar la purificación de las 7 proteínas recombinantes seleccionadas de MAP se realizó un SDS-PAGE al 15% con la posterior tinción de azul de Coomassie.

Una vez seleccionados a partir del primer análisis los 7 antígenos, aquellos más inmunogénicos a nivel humoral, se los evaluó empleando nuevamente la técnica de MAPIA como una mezcla antigénica (M1-PTB), con los mismos sueros del ensayo anterior (Figura 26). Cuando se comparó la mezcla de antígenos con el antígeno comercial PPA-3 (antígeno protoplasmático de MAP, Allied monitor), 14/25 sueros de animales con PTB reaccionaron positivamente con la mezcla M1-PTB de antígenos de MAP, no siendo reconocida por los sueros de animales experimentalmente infectados con *M. bovis* ni por los sueros de animales sanos (Figura 26), mientras que PPA-3 es reconocido por animales con TBB, resultando así más específica la mezcla de antígenos M1-PTB que el antígeno PPA-3, (Tabla 15 y 16).

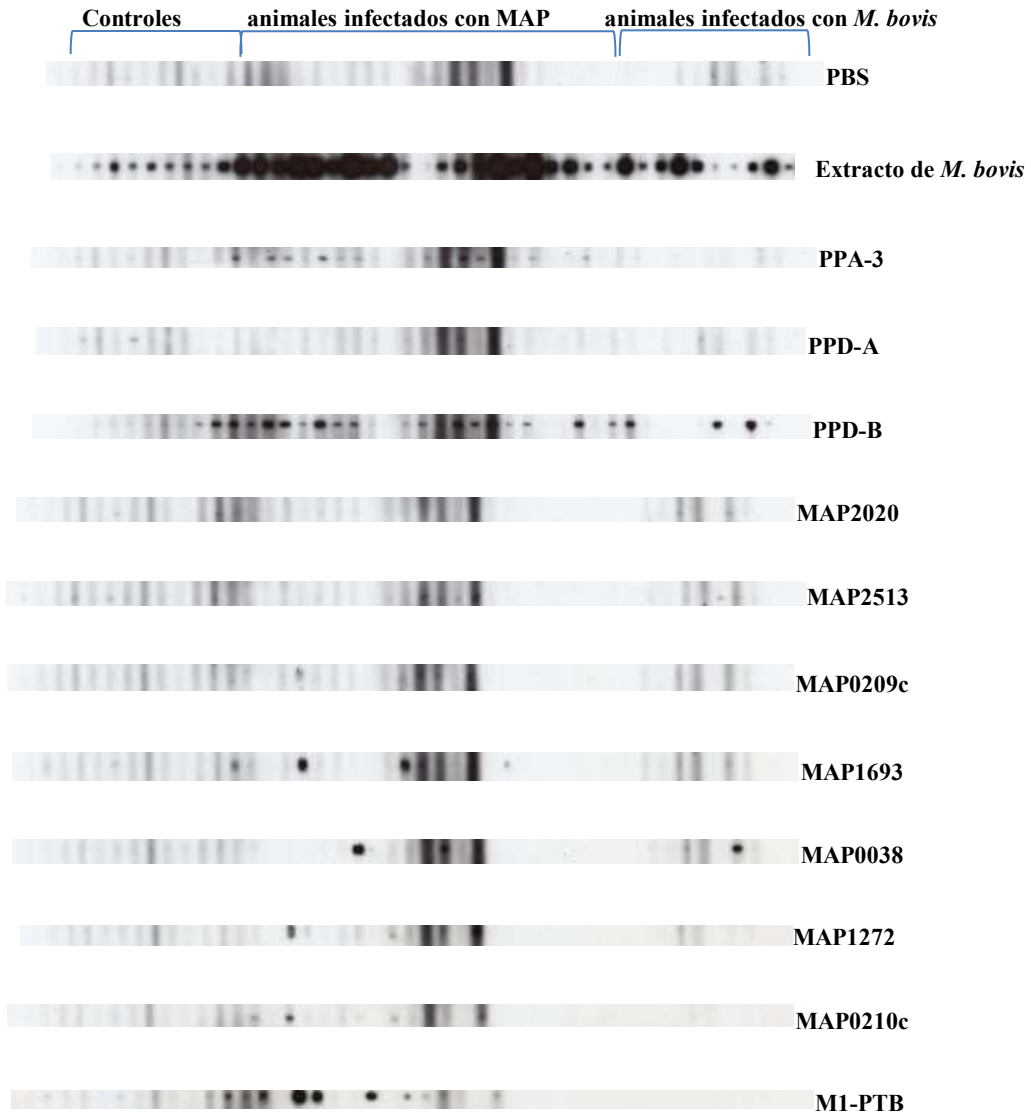


Figura 26. MAPIA con los 7 antígenos de MAP (MAP 0038, MAP 0210c, MAP 1272, MAP 1693, MAP 2020, MAP 0209c y MAP 2513) aplicados de forma individual y su combinación en una mezcla por la técnica de MAPIA. Se emplearon los sueros dilución (1/100) de animales sanos (n=10), animales naturalmente infectados con MAP (n=25) y animales infectados con *M. bovis* (n=10). Se utilizaron 20 μ L de cada antígeno de una concentración 100 μ g/mL. Para la mezcla antigénica (M1-PTB) se utilizaron 20 μ L de una solución con los 7 antígenos en una concentración de 100 μ g/mL de cada uno.

Antígeno evaluado	Intensidad promedio de las proteínas expuestas a los sueros		
	control (n=10)	Infectados con MAP (n=25)	Infectados con TBB (n=8)
PPDA	208	105	256
PPDB	346	531	1468
PPA-3	131	609	108
MI-PTB	140	1460	0

Tabla 15. Intensidad de los *spots* obtenidas por la técnica de MAPIA para la mezcla de antígenos de MAP. Las intensidades fueron obtenidas utilizando el *software ImageQuant TL Array Version 7.0*, (GE Healthcare). PPA-3: antígeno protoplasmático (Allied Monitor); PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA); Mezcla, la mezcla de los 7 antígenos de MAP seleccionados anteriormente.

Antígeno evaluado	Nro. de sueros con reacción positiva		
	control (n=10)	Infectados con MAP (n=25)	Infectados con TBB (n=8)
PPDA	6	1	4
PPDB	4	16	3
PPA-3	1	18	2
MI-PTB	2	14	0

Tabla 16. Reactividad de sueros bovinos frente a la mezcla de antígenos seleccionados de MAP. Los sueros con valores de intensidades mayores a la media obtenida con PBS fueron consideradas positivas. PPA-3: antígeno protoplasmático de Paratuberculosis (Allied Monitor); PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA); Mezcla, la mezcla de los 7 antígenos de MAP seleccionados anteriormente.

1c) Caracterización y evaluación de antígenos contenidos en la PPD-A

La PPD-A, es un derivado proteico purificado que se obtiene a partir de una cepa de *M. avium*. A pesar de que la PPD-A es obtenida a partir de una cepa de *M. avium*, esta es utilizada en IDR tanto para el diagnóstico de PTB como en la prueba doble comparativa que consiste en la inoculación de PPD-B y PPD-A por separado para definir si el rodeo está infectado con *M. bovis* o MAP, según la IDR sea mayor con PPD-B o PPD-A respectivamente. La misma si bien no es de uso muy frecuente, por las reacciones inespecíficas que produce, es un indicador más tanto de PTB como marcador de reacciones inespecíficas debido a sensibilización de los animales con micobacterias ambientales no patógenas.

Dado que como se mencionó anteriormente, ya en los estadios tempranos de la infección con MAP la respuesta inmunológica además de celular también puede ser humoral, a diferencia de lo que ocurre en TBB, donde la respuesta inmune temprana es de tipo celular. Además, debido a que en PTB el diagnóstico serológico es ampliamente utilizado, nos propusimos identificar aquellas proteínas contenidas en la PPD-A responsables de la respuesta inmunogénica humoral. Para ello se procedió a resolver las proteínas de la PPD-

A, las cuales fueron concentradas a partir del sobrenadante de un cultivo autoclavado de la cepa *M. avium* D4ER, mediante ultrafiltración tangencial. Para ello se realizó con dichas proteínas SDS-PAGE por duplicado. Uno de los geles se transfirió para ser procesado por *Western blot* empleando un *pool* de sueros positivos de animales con PTB, el segundo gel réplica se coloreó con azul de *Coomassie* para proceder a partir de este a cortar las bandas identificadas mediante el *western blot* para su posterior identificación por MALDI-TOF (Figura 27).

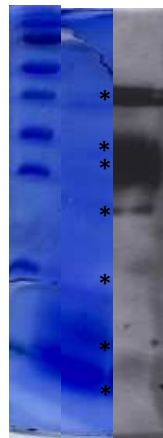


Figura 27. Análisis de las proteínas de la PPD-A. Tinción con azul de *Coomassie* y *Western blot*. Se realizó SDS-PAGE al 12% por duplicado, uno para *Coomassie* y otro para *western blot*. Para el *western-blot* se utilizó un pool de sueros positivos a PTB por ELISA. Como anticuerpo secundario se utilizó proteína-G peroxidasa, el revelado se realizó por quimioluminiscencia. Como marcador de peso molecular se utilizó uno preteñido (fermentas). Se indican con “*” las bandas escindidas del gel para su identificación por MALDI-TOF.

Nro. de banda	ORF	Proteína	Long(aa)
1-4	MAP1569	ModD	368
5	MAP3527	PepA	361
6	MAP1889c	Wag31	260
7	MAP3290c	MPT64	198

Tabla 17. Proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de la PPD-A. Se indican las proteínas identificadas a partir de cada banda con su respectivo nombre y cantidad de aminoácidos.

De un total de 7 bandas del gel que se enviaron a analizar, se pudieron identificar 4 proteínas (Tabla 17). Algunas de estas habían sido previamente caracterizadas como inmunogénicas en MAP por nuestro grupo, MAP1569/ModD [243], y otras identificadas por otros laboratorios como MAP3527/PepA [225]. Esta última proteína también fue identificada durante el desarrollo de esta tesis en la PPD-B. En cuanto a las proteínas Wag31 y Mpt64 fueron descriptas en el complejo *M. tuberculosis* [244, 245]. Dos de estas 4 ya estaban incluidas en el panel de 51 antígenos de MAP (MAP3527 y MAP2889); sin embargo, no habían sido seleccionadas por la técnica de MAPIA para constituir M1-PTB

por no resultar específicas. Debido a que PepA no resulta una proteína para diagnóstico específico tampoco fue seleccionada en las mezclas para el diagnóstico de TBB, a pesar de ser una de las proteínas identificadas en la PPD-B.

1ci) Evaluación serológica de la mezcla de antígenos identificados a partir de la PPD-A por la técnica de MAPIA

A pesar de que algunos de estos antígenos ya habían sido evaluados anteriormente en forma individual y no fueron seleccionados por su inespecificidad, estas proteínas identificadas en la PPD-A, Wag31, PepA y ModD, se evaluaron nuevamente tanto de manera individual, como en combinación en una mezcla (M2-PTB), enfrentándolos con un panel de distintos sueros: de animales controles sanos (Rodeo INTA) (n=10), sueros de animales de un rodeo positivo a PTB (Rodeo Tandil) (n=17), y de animales experimentalmente y naturalmente infectados con *M. bovis* (n= 10) (Figura 28).

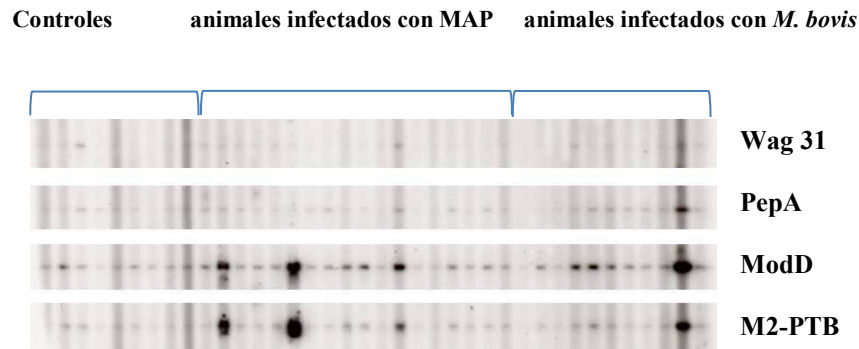


Figura 28. Evaluación de los antígenos identificados a partir de PPD-A por la técnica de MAPIA. Wag 31, PepA y ModD fueron evaluados por la técnica de MAPIA tanto de manera individual como en combinación en una mezcla (M2-PTB) con sueros dilución 1/100 de animales sanos (n=10), animales naturalmente infectados con MAP (n=25) y animales infectados con *M. bovis* (n=10). Se utilizaron 20 µL de cada antígeno de una concentración 100 µg/mL, para la mezcla se utilizó 20 µL de una solución con los 7 antígenos en una concentración de 100 µg/mL cada uno.

Intensidad promedio de las proteínas expuestas a los sueros			
Antígeno evaluado	control (n=10)	Infectados con MAP(n=17)	Infectados con TBB (n=10)
Wag 31	48,11	29,26	21,75
PepA	59,16	37,17	33,15
ModD	37,23	39,33	27,67
M2-PTB	97,35	223,80	193,63

Tabla 18. Intensidad de los spots obtenidas por la técnica de MAPIA para la mezcla de antígenos identificados a partir de PPD-A. Las intensidades fueron obtenidas utilizando el *software ImageQuant TL Array Version 7.0*, (GE Healthcare). PPA-3: antígeno protoplasmático (Allied Monitor); PPD-A y PPD-B, derivados proteicos purificados aviar y bovino, respectivamente (SENASA); Mezcla, la mezcla de los 7 antígenos de MAP seleccionados anteriormente.

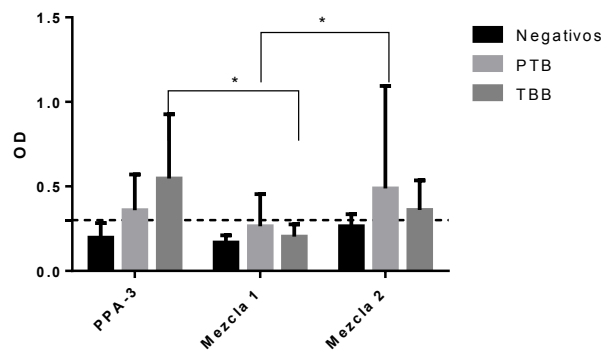
Si bien tanto el antígeno ModD como M2-PTB fueron reconocidos por diferentes sueros de animales con PTB, también fueron altamente reconocidos por sueros de animales con TBB, con lo cual no resultaron ser específicos. A pesar de la falta de especificidad de ModD y de la mezcla antigénica M2-PTB, estas podrían ser de utilidad para aumentar la sensibilidad en la detección de animales con PTB en un rodeo que se conoce libre de TBB, porque son proteínas que demostraron ser altamente antigénicas.

1ciii) Evaluación de las mezclas de antígenos de MAP por la técnica de ELISA

Una vez evaluadas las mezclas de antígenos (M1-PTB y M2-PTB) por la técnica de MAPIA, se procedió a evaluarlas mediante la técnica de ELISA en paralelo con el tradicional ELISA-PPA-3, en el cual se utiliza un antígeno comercial. Se decidió evaluar las mezclas en este formato, ya que si bien la técnica de MAPIA es muy útil para una primera evaluación de un gran número de antígenos, en muy pocos laboratorios se encuentra con el equipamiento adecuado para realizarla. Este ensayo se realizó con los sueros de 68 animales: 25 animales con MAP confirmadas por cultivo o ELISA, 26 vacas de un rodeo negativo sin sospecha de casos de PTB y negativas a los ensayos disponibles (cultivo a partir de materia fecal, serología e IFN- γ), y 17 animales experimentalmente infectados con *M. bovis* con lesiones al momento de la necropsia. La prueba de ELISA utilizando el antígeno PPA-3 reconoció 15 de 27 (56%) animales con PTB pero también 5 de 10 (50%) animales infectados con *M. bovis*. Así mismo, el ELISA con M1-PTB, conformada por antígenos de MAP seleccionados previamente en este trabajo detectó 9 de 27 (33%) animales con PTB, pero a diferencia del ELISA PPA-3, solo reconoció 1 de 10 (10%) animales infectados con *M. bovis* (Figura 29). Sin embargo, el ELISA empleando

M2-PTB, detectó 12 de 27 (44%) animales con PTB y 6 de 10 (60%) animales infectados con *M. bovis*. Ninguna de las 3 mezclas fue detectada por los sueros controles de animales sanos (Figura 29).

Esto indicaría que el empleo de M1-PTB podría impactar en una mejora de la especificidad de la técnica en comparación al antígeno PPA-3, aunque con menor sensibilidad. Contrariamente a M2-PTB que resultó ser una mezcla antigénica con mayor sensibilidad pero menor especificidad para el diagnóstico de PTB. En comparación con el antígeno PPA-3, M1 es más específico que la mezcla comercial.



	PTB	TBB
PPA-3	15/27	5/10
M1-PTB	9/27	1/10
M2-PTB	12/27	6/10

Figura 29. Evaluación de las nuevas mezclas de antígenos para el diagnóstico de PTB por la técnica de ELISA. Se realizó un ELISA con las nuevas mezclas de antígenos. Se empleó el mismo protocolo que con el antígeno PPA-3, utilizando una solución madre de 30 µg de cada antígeno en 1 mL de PBS. A partir de esta mezcla se colocaron 100 µL por pocillo de una solución 20 µg/mL en *buffer* carbonato. La dilución utilizada de los sueros fue 1/100. Se utilizó un panel de sueros de 27 animales positivos a PTB, 10 animales de rodeo negativo y 10 de animales experimentalmente y naturalmente infectados con *M. bovis*. Se graficó la media ± DE. El punto de corte se calculó en base al promedio de los sueros controles (DO=0,3) indicándose con una línea punteada. Las significancias estadísticas de las diferencias entre las distintas respuestas se determinaron con el *test* de Kruskal-Wallis y *test* de Dunn. (*P < 0,05).

1d) Evaluación del panel de 51 antígenos de MAP en el diagnóstico inmunológico celular in vitro (ensayo de IFN-γ) en un rodeo con PTB

Para el diagnóstico de PTB también es de valor encontrar antígenos que detecten la respuesta celular, la cual al igual que lo que sucede en TBB, es una respuesta temprana luego de la infección. Muchos antígenos presentan ambos epítopes B y T, por esta razón se evaluó la capacidad de las 51 proteínas recombinantes de MAP de inducir respuesta celular

RESULTADOS

en animales infectados con PTB. Para esto, se estimuló la sangre entera de 7 animales del Rodeo Tandil con una alta prevalencia de PTB con las 51 proteínas por separado.

En esta experiencia se observó que de las 51 proteínas 9 fueron reconocidas al menos por la sangre de 2 animales (Tabla 19). Algunos de estos antígenos recombinantes produjeron una mayor estimulación de IFN- γ que la que produce el antígeno PPD-A. Por lo tanto, resulta interesante seguir evaluando estos antígenos como candidatos potenciales para aumentar la reactividad de la PPD-A en animales con PTB.

Antígeno	Liberación de IFN- γ (IDO)						
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7
MAP 0011	1,138	1,653	0,630	1,002	1,063	1,049	1,484
MAP 0034	1,015	0,889	0,649	0,505	0,889	1,273	0,797
MAP 0038	1,241	0,419	0,751	1,116	0,898	1,427	1,807
MAP 0047c	1,415	1,279	0,754	0,845	1,033	2,246	1,093
MAP 0187c	1,390	0,286	1,374	0,403	0,919	1,011	0,897
MAP 0209c	1,621	0,318	0,669	1,117	0,763	1,248	1,366
MAP 0210c	1,149	0,889	0,938	0,635	0,989	1,248	2,123
MAP 0211	1,174	0,690	0,600	0,578	0,813	0,973	0,972
MAP 0297	1,077	1,084	0,561	0,906	0,943	1,289	1,173
MAP 0334	1,200	1,263	0,862	1,078	0,994	1,271	1,040
MAP 0693	1,431	0,510	0,607	0,567	0,891	1,219	2,228
MAP 0900	1,605	0,552	0,715	0,579	0,961	1,269	1,612
MAP 0946c	1,108	0,741	0,623	1,495	0,823	1,331	1,180
MAP 1012c	1,241	1,184	0,931	1,619	0,967	1,110	1,093
MAP 1050c	1,138	0,985	1,902	0,576	1,264	0,864	0,779
MAP 1272	1,159	1,389	0,820	1,386	1,072	1,307	1,554
MAP 1293	1,359	0,400	0,679	1,325	0,872	0,329	1,589
MAP 1308	1,015	0,995	0,708	0,666	0,939	1,156	1,236
MAP 1564c	1,282	0,869	0,761	1,121	1,508	1,242	1,100
MAP 1589c	1,923	0,193	1,948	0,468	1,144	1,421	5,647
MAP 1653	1,610	0,627	1,200	0,623	1,412	1,275	4,371
MAP 1693	1,662	0,516	1,020	0,702	0,909	1,325	1,231
MAP 1754	0,882	1,000	1,049	0,973	1,050	1,134	1,083
MAP 1889c	1,205	1,105	1,672	1,292	1,320	0,946	1,108
MAP 2020	1,256	0,611	1,134	0,917	1,281	0,980	1,028
MAP 2167	1,067	1,421	0,679	1,374	0,802	1,080	1,331
MAP 2182c	1,292	0,797	0,643	1,209	0,900	1,181	1,118
MAP 2513	1,959	0,516	0,741	0,552	0,835	0,797	0,820
MAP 2593c	1,000	2,202	0,911	0,917	1,538	0,967	1,835
MAP 2609	1,226	1,027	0,830	0,643	1,030	0,879	1,043
MAP 2676c	0,990	1,740	0,541	1,298	0,876	0,873	1,228
MAP 2685	1,246	0,785	0,525	1,278	0,774	0,976	0,987
MAP 2878	1,328	0,905	0,925	1,440	0,915	1,396	1,098
MAP 2942	1,585	0,760	0,934	0,486	0,972	1,071	1,005

MAP 2956	0,831	1,271	0,675	0,910	1,017	0,939	0,995
MAP 3175	1,754	1,057	0,790	1,448	1,229	1,156	1,065
MAP 3402	1,523	1,656	0,649	0,924	1,085	1,127	1,787
MAP 3457	1,015	0,948	1,243	1,406	0,932	1,486	0,920
MAP 3491	0,938	0,877	0,784	1,065	2,451	0,143	0,955
MAP 3527	1,513	0,942	1,003	0,590	0,856	0,882	1,103
MAP 3627	1,041	0,841	0,843	1,327	7,362	1,108	0,930
MAP 3651	1,682	0,839	0,898	0,449	1,111	1,385	0,835
MAP 3692c	0,810	1,546	1,636	1,013	0,898	1,213	1,088
MAP 3840	1,123	0,885	0,770	0,720	1,231	0,991	1,211
MAP 3841	1,646	1,356	0,610	1,117	0,898	1,459	2,188
MAP 3857	0,908	0,934	0,800	1,301	0,900	1,843	0,980
MAP 3936	1,672	0,917	1,105	0,403	1,192	1,197	1,739
MAP 4000c	0,979	0,561	0,908	1,047	0,922	1,664	1,211
MAP 4147	1,226	1,130	0,721	1,767	0,878	1,722	2,078
MAP 4227	0,959	1,870	0,767	0,912	1,031	1,127	1,471
Mb 3341	1,067	1,160	0,846	0,832	0,880	1,490	1,591
PWM	5,821	2,523	2,951	5,442	4,969	4,868	7,827
PPD-A	1,287	0,855	0,495	1,810	1,457	1,716	3,619
PPD-B	1,313	1,321	1,685	1,303	1,379	1,278	1,444

Tabla 19. Evaluación de los antígenos de MAP por el ensayo de IFN- γ en animales naturalmente infectados con MAP. Se midió la liberación de IFN- γ inducida por 51 antígenos de MAP, PPD-A y PPD-B, en bovinos naturalmente infectados con MAP (n=7). Los antígenos fueron evaluados a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que PWM a una concentración de 4,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Los valores de la tabla representan el valor de IDO para cada antígeno por animal. Se consideró como positivo un valor de IDO mayor a 1,5., los mismos se encuentran resaltados en negrita.

1dii) Evaluación de antígenos de MAP por el ensayo de IFN- γ en animales experimentalmente infectados con *M. bovis*

Una vez probados los 51 antígenos de MAP por IFN- γ con sangre de animales con PTB, se evaluaron los 9 antígenos que dieron mayor respuesta celular en animales con PTB, para analizar su especificidad, con la sangre de animales experimentalmente infectados con *M. bovis* (Tabla 20).

En este caso, se observó que algunos de los animales con TBB reaccionaron positivamente mediante la liberación de IFN- γ frente a 6 de los antígenos seleccionados anteriormente. Solo tres de los antígenos no fueron capaces de inducir la respuesta de liberación de IFN- γ en animales con TBB. Esto demuestra que la mayoría de los antígenos evaluados no son específicos de MAP. Esto se debe a que muchos de los antígenos se encuentran conservados en el género de las micobacterias.

Antígeno	Liberación de IFN- γ (IDO)			
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4
MAP 0900	0,935	1,225	1,377	2,815
MAP 1589c	1,270	2,928	3,338	7,166
MAP 1653	1,026	1,105	3,075	5,818
MAP 2593c	0,678	0,902	1,575	1,235
MAP 3402	0,865	0,670	1,303	0,881
MAP 3692c	0,935	0,808	1,018	1,139
MAP 3841	0,896	1,011	1,061	3,437
MAP 3936	0,935	1,293	1,259	5,235
MAP 4147	1,070	1,504	1,482	5,179
PPD-A	2,409	2,435	4,132	4,076
PPD-B	2,400	8,420	8,456	9,318

Tabla 20. Evaluación de los antígenos de MAP por el ensayo de IFN- γ en animales experimentalmente infectados con *M. bovis*. Se midió la liberación de IFN- γ inducida por los antígenos de MAP, PPD-A, PPD-B, PWM en bovinos experimentalmente infectados con TBB (n=7). Los antígenos fueron evaluados a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, PPD-A y PPD-B en una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ mientras que PWM se utilizó a una concentración de 4,5 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras de sangre (200 μL) fueron incubadas por 16 hs en presencia de 25 μL de cada antígeno. Los valores de la tabla representan el valor de IDO para cada antígeno por animal. Se consideró como positivo un valor de IDO $\geq 1,5$. Se encuentran resaltados en rojo y negrita.

DISCUSIÓN

Identificación, caracterización y evaluación de antígenos contenidos en el derivado proteico purificado bovino (PPD-B)

El control y erradicación de TBB en nuestro país se basa en el diagnóstico de la enfermedad, por intradermoreacción (IDR) con PPD-B y la eliminación de los animales que resultan positivos. Esta técnica consiste en la aplicación intradérmica de PPD-B, un derivado proteico purificado a partir del cultivo de *M. bovis*, y la posterior lectura de la reacción de hipersensibilidad retardada. Sin embargo, esta estrategia no ha sido completamente exitosa. En el año 2012 mediante la resolución N° 128, SENASA aprobó un nuevo Plan Nacional de Control y Erradicación de TBB, pasando de un sistema de control voluntario a uno obligatorio para la totalidad de los tambos y cabañas de leche de bovinos, caprinos y ovinos y las cabañas de carne bovinas y caprinas, que el sistema voluntario anterior no contemplaba. La IDR presenta una sensibilidad menor del 80%, además de una baja especificidad, ya que se obtienen falsos positivos debido a la presencia de componentes conservados en la PPD-B, presentes también en micobacterias ambientales. Si bien existen otras técnicas de diagnóstico de TBB, como el aislamiento de la bacteria, la cual es la prueba confirmatoria, el ensayo de liberación de IFN- γ , y distintos sistemas comerciales de ELISA y PCR a partir de tejido o leche, algunas de ellas no son capaces de detectar tempranamente la enfermedad o no tienen una buena sensibilidad como para ser empleadas por sí solas. Otras son costosas o necesitan de un laboratorio con cierto equipamiento y de una cierta logística que a veces resulta complejo.

Con el fin de mejorar el diagnóstico de TBB, se han identificado diferentes proteínas inmunodominantes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* mediante genómica comparativa [246], transcriptómica, [247], o por sus perfiles de expresión génica asociados a infección latente por micobacterias [248, 249]. Entre ellas, se han detectado miembros de la familia PE/PPE [250], y miembros de la familia Esx, como ESAT-6, CFP-10 y TB10.3 (Rv3019c) [228, 251, 252] que son proteínas secretadas. CFP-10, ESAT-6 y TB10.3, son miembros de una gran familia de proteínas de micobacterias, que típicamente consisten en alrededor de 100 aminoácidos y además son caracterizadas por su organización de a pares dentro del genoma [253]. Varios miembros de esta familia han sido identificados como potentes antígenos celulares T, lo cual es interesante como diagnóstico ya que TBB se caracteriza por presentar una respuesta inmune celular en los estadios tempranos de la enfermedad [191,

252]. Una de las ventajas más importante de ESAT-6 y CFP-10, es que están ausentes en BCG [250, 256]. Previamente nuestro grupo ha participado en un estudio conformado por diferentes laboratorios, donde se evaluó la sensibilidad y especificidad del ensayo de IFN- γ utilizando varios antígenos en ganado naturalmente infectado con *M. bovis* en regiones con prevalencia baja, media, y alta de TBB del Norte de Irlanda, México, y Argentina, respectivamente. En las tres regiones, ESAT-6 y CFP-10 resultaron los antígenos con mayor capacidad diagnóstica [257]. Otros estudios previos han demostrado que los antígenos de *M. bovis*, MPB70 y MPB83, también inducen una fuerte liberación de IFN- γ *in vitro*, estimulando la sangre de animales con TBB, mientras que los animales vacunados con BCG o sensibilizados con *M. avium* no responden a estos antígenos ya que hay una expresión diferencial [258]. Por lo tanto estos resultados confirman que MPB83 y MPB70, a pesar de ser antígenos principalmente B, también podrían ser adecuados para el diagnóstico celular de TBB y diferenciar entre animales con TBB de animales con PTB o animales vacunados con BCG, como así también animales vacunados con MAP. MPT83 (Rv2873) es una lipo-glicoproteína de la pared de *M. tuberculosis*, que jugaría un rol en la adhesión y diseminación de la bacteria. En base al análisis de su secuencia, tiene alta homología con MPB70 (RV2875), este último también un antígeno serodominante en ganado bovino infectado con *M. bovis* [125]. En *M. bovis*, MPB70 es una proteína secretada al medio de cultivo mientras MPB83 está presente en dos formas, una lipoproteína de 26 kDa que permanece asociada a la pared micobacteriana y otra forma secretada [244]. Ambos antígenos MPB70 y MPB83 son similares a los de *M. tuberculosis* (Rv2873 y Rv2875) y homólogos entre sí [259]. MPB70 y MPB83 son diferencialmente producidas en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, *in vitro* la expresión es baja en *M. tuberculosis* y alta en *M. bovis* [132]. Los estudios inmunológicos confirmaron que ambas proteínas inducen respuesta humoral y celular en infecciones experimentales en bovinos [258, 169]. Además se han encontrado diferencias funcionales vía mutaciones en sigK que producen deficiencia en la producción de MPB70 y MPB83 por la vacuna BCG [260]. La importancia de estos antígenos puede ser de utilidad para el diagnóstico DIVA de TBB.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, once proteínas fueron identificadas a partir de fracciones del filtrado y extractos celulares de *M. bovis*, por su capacidad de suscitar una respuesta de IFN- γ en animales con TBB. Entre ellas, se destacan, EsxI y

HspX, ya que desencadenaron una alta respuesta inmune celular T en el ensayo de liberación de IFN- γ [227]. Además de los estudios de los antígenos contenidos en *M. tuberculosis* y *M. bovis* también hay varios trabajos que han abordado el estudio de la composición de las PPD utilizadas en humanos, obteniendo una gran variabilidad de proteínas identificadas y con diferencias según la cepa que se utiliza para su producción, lo cual demuestra lo compleja que es la composición de las PPD, que se producen a partir de cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* [261].

Al comienzo de esta tesis, con el fin de mejorar el diagnóstico de TBB, e identificar aquellos antígenos específicos de *M. bovis* que no fueran detectados por animales con PTB ni animales vacunados con BCG, se evaluaron fracciones proteicas obtenidas a partir de la PPD-B. Para ello, se evaluaron en su capacidad de inducir una respuesta celular, por el ensayo de liberación de IFN- γ , estimulando sangre de bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* o vacunados con BCG como por IDR en cobayos sensibilizados con *M. bovis* y *M. avium*. En estos ensayos se observó que las fracciones que inducían mayor respuesta en los animales infectados fueron las de menor peso molecular, entre 25 y < a 10 kDa. En el caso de los animales vacunados con BCG, ninguna de las fracciones estimuló la liberación de IFN- γ . Esto podría deberse a que estas fracciones contienen antígenos que no están presentes en BCG o se expresan en niveles muy bajos en la cepa vacunal.

La infección experimental de los terneros se realizó inoculando los terneros por la vía intratraqueal con 5×10^7 UFC de una cepa virulenta de *M. bovis*, evidenciándose estimulación con PPD-B y con algunas de las fracciones de la PPD-B cuando se estimuló la sangre de este grupo de animales a los diferentes tiempos luego de la infección. También se detectó a $t=0$ que los valores de liberación de IFN- γ eran mayores a 2 en algunos animales, tanto en el grupo seleccionado para la infección con *M. bovis* como en el grupo a vacunar con BCG. Este efecto en animales antes del tratamiento podría ser un efecto semejante al que han descripto varios autores luego de la sensibilización de bovinos con micobacterias ambientales no patógenas del complejo *M. avium* [262]. En nuestra experiencia a campo los animales sanos, según la región de donde provengan, presentan reacciones de liberación de IFN- γ al estimular la sangre con PPD-B, efecto que se debe a las condiciones ambientales a

las que están sometidos y como consecuencia se obtienen reacciones inespecíficas producidas al emplear la PPD-B para el diagnóstico de TBB, tanto por IDR como por el ensayo de la liberación de IFN- γ . En esta experiencia se observó que los animales vacunados con BCG perdieron esta respuesta inespecífica a la PPD-B en los boxes de seguridad. Esto puede deberse a que pierden la sensibilización inespecífica a la que estaban sometidos en el campo y que a su vez la cantidad de BCG que se utilizó para vacunar, 1×10^6 UFC por vía subcutánea en la tabla del cuello no genera respuesta. Es posible que los animales vacunados no reaccionen a fracciones que contienen unas pocas proteínas de la PPD-B, ni a la PPD-B, ya que la inoculación de la vacuna es subcutánea y de una cepa atenuada como es la BCG, mientras que se ve un importante efecto sobre la liberación de IFN- γ cuando se inocula intratraquealmente una cepa de alta virulencia como la que se empleó para la infección experimental con *M. bovis*.

El modelo de cobayo es el que se utiliza para evaluar la prueba de potencia de las PPD-B por IDR, por eso se seleccionó este modelo para evaluar las fracciones proteicas. En este caso se observó que también las fracciones de bajo peso molecular estimulaban la respuesta de hipersensibilidad retardada en los cobayos sensibilizados con *M. bovis*.

La estrategia de fraccionar las proteínas contenidas en la PPD-B, nos permitió seleccionar las fracciones más inmunogénicas utilizando dos modelos experimentales, uno con bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y otro con cobayos sensibilizados con *M. bovis*, para luego proceder a la identificación de la composición de las proteínas de las fracciones más reactivas por espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica eficiente para el análisis de mezclas complejas de proteínas, basada en la hidrólisis enzimática de las proteínas, la separación y análisis de la mezcla de péptidos resultante mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas en sucesión (LC-MS/MS). Los espectros generados para cada péptido (espectro MS/MS) son identificados mediante diferentes estrategias y algoritmos de identificación. La ventaja de este sistema es que además de tener una mayor resolución requiere de muy baja concentración de proteínas en la muestra, siendo mucho más sencilla ya que no es necesaria una separación previa de las proteínas en SDS-PAGE en dos dimensiones, y posterior análisis de los *spots* generados. De este modo se evitan muchos pasos utilizando espectrometría de masas de trampa de iones lineal (LTQ Velos, Thermo Fisher Scientific

Corp.) con ionización *nanospray*. Además, en varios trabajos, en los cuales se ha intentado estudiar la composición por SDS-PAGE 1D o 2D, se ha observado que hay una alta degradación de proteínas al realizar estudios de proteómica a partir de la PPD, mientras que esta técnica de LC-MS/MS es muy eficiente en detectar péptidos pequeños en concentraciones bajas [261]. En este estudio, mediante esta técnica, se identificaron proteínas ampliamente estudiadas anteriormente, como CFP-10, MPB83, MPB70, PepA, HspX y otras proteínas que hasta el momento no habían sido estudiadas como antígenos: CFP2 y FixB.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en trabajos previos, se formularon dos mezclas antigénicas compuestas por las proteínas de *M. bovis* expresadas de manera recombinante y purificadas a partir de *E. coli* [258, 263]. La mezcla 1 (M1) conteniendo las proteínas ESAT-6, CFP-10 y MPB83 y la mezcla 2 (M2) conteniendo ESAT-6, CFP-10, MPB83, HspX, TB10.3 y MPB70.

Para evaluar el potencial de M1 para el diagnóstico de TBB, empleamos la mezcla antigénica en el ensayo de liberación de IFN- γ en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y en un grupo de animales vacunados con BCG. En este caso M1 resultó altamente específica y sensible, no suscitando respuesta en animales vacunados con BCG e induciendo valores altos de liberación de IFN- γ a todos los tiempos luego de la infección experimental con *M. bovis*. Por el contrario, M2 tuvo una baja capacidad de inducción de IFN- γ en animales experimentalmente infectados con *M. bovis* a los 20 dpi. A pesar de la inmunogenicidad de los antígenos MPB70, HspX y TB10.3, su inclusión en M2 no aumentó la respuesta de IFN- γ en comparación al uso de solamente ESAT-6, CFP-10 y MPB83 (M1) a los distintos tiempos *post*-infección. Esto podría deberse a que algunos de estos antígenos como ESAT-6, CFP-10, son miembros de la misma familia que TB10.3; y por otro lado, MPB70 y MPB83, están cercanamente relacionados compartiendo un 73% de identidad de su secuencia proteica. Por lo tanto, es probable que su combinación pudiera resultar en una redundancia y que el agregado de más antígenos produjera una disminución en la respuesta a los antígenos dominantes [264]. A pesar de que M1 está formulado principalmente con antígenos celulares T dominantes como ESAT-6 and CFP-10, también contiene el antígeno B MPB83. La razón por la que incluimos este antígeno es que MPB83 podría tener un rol

en promover la iniciación de la reacción de la respuesta de IDR, pudiendo ayudar así a obtener una respuesta mejor a antígenos efectores dominantes [265].

Una vez evaluadas las mezclas en animales experimentalmente infectados, se procedió a determinar su capacidad diagnóstica a campo mediante el ensayo de liberación de IFN- γ , en un rodeo con alta prevalencia de TBB (Rodeo Delta). 6/10 animales respondieron positivamente tanto a M1 como a M2, mientras que 5/10 respondieron a la PPD-B. Para determinar su especificidad, también se evaluaron en un rodeo con alta prevalencia de PTB (Rodeo Chascomús). Es destacable señalar que, 6/17 y 3/17 animales respondieron positivamente a PPD-B y M2 respectivamente, mientras que solamente 1/17 respondió a M1. Estos resultados demuestran que la mezcla M1 resultó más específica que PPD-B y M2, y a su vez detectando más animales con TBB.

Una vez evaluadas las mezclas por IFN- γ , en bovinos experimentalmente infectados, se procedió a evaluar las mezclas por IDR en cobayos sensibilizados con *M. bovis*. Cuando se inoculó intradérmicamente M1 o M2, las reacciones producidas en los cobayos sensibilizados con *M. bovis* fueron similares a las producidas por PPD-B. Además, con el objeto de evaluar su especificidad, la potencia de estas mezclas fue evaluada por IDR en cobayos sensibilizados con *M. avium*. M1 produjo una induración significativamente menor que la que ocasionó la PPD-B. También se produjo con M1 una induración menor que la que ocasionó M2, aunque en este caso los resultados no fueron estadísticamente significativos.

De acuerdo a los resultados previos presentados, M1 presentó mayor capacidad de detectar animales con TBB, pero dado que M1 contiene 3 antígenos, dos de ellos, CFP-10 y ESAT-6, ampliamente evaluados como específicos para el diagnóstico de TBB, quisimos demostrar que la inclusión de un tercer antígeno, MPB83, no comprometía la especificidad de la mezcla. La inoculación de M1 en cobayos sensibilizados con *M. avium* no mostró diferencias significativas en comparación con la respuesta de CFP-10/ESAT-6, por lo tanto la inclusión de MPB83 a M1 no comprometió la especificidad en el diagnóstico diferencial. Además, en este grupo las reacciones con la mezcla que incluía los antígenos ESAT-6 y CFP-10, así como las reacciones producidas por M1, no tuvieron diferencias significativas

con las reacciones producidas al inocularlos intradérmicamente con PBS, el cual se utilizó como control negativo de reacción.

Cuando las mezclas fueron evaluadas por IDR en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis*, 5 de 6 animales reactivos a la PPD-B, fueron también positivos a reacciones de IDR cuando se utilizó M1 y M2 como inmunógenos. Sin embargo, las respuestas de IDR fueron significativamente mayores cuando se inyectó PPD-B que cuando se utilizó M1 o M2. Esta diferencia podría deberse además de a la presencia de una mayor cantidad de antígenos en la PPD-B, a una menor concentración de cada proteína en M1 y M2, 10 µg comparado con 100 µg en PPD-B [264]. Decidimos utilizar estas cantidades de antígenos recombinantes en las mezclas ya que en estudios previos, esta concentración mejoró las respuestas de piel sin comprometer la especificidad [240, 265], sin embargo los resultados de este estudio sugieren que las dosis de proteínas recombinantes en las mezclas para la intradermoreacción podrían ser optimizadas. En cuanto a la cantidad inoculada de PPD-B, esta es la que se utiliza de rutina en la prueba tuberculínica.

Con el fin de aumentar la sensibilidad de las mezclas para el diagnóstico de TBB, se evaluó la inmunogenicidad de nuevas proteínas identificadas a partir de la PPD-B, FixB y CFP2. Individualmente no resultaron altamente inmunogénicas, ya que sólo un animal de un rodeo con TBB reaccionó frente al estímulo con FixB en el test de IFN- γ . Sin embargo, la adición de estos antígenos podría generar un efecto sinérgico de la respuesta inducida por las mezclas antigénicas. Pero también debíamos evaluar la especificidad de las mezclas luego de la inclusión de estas proteínas, por la presencia de estas proteínas en el genoma de otras micobacterias tanto del complejo *M. tuberculosis* como las del complejo *M. avium*. Sin embargo, no fueron reconocidas cuando se utilizó sangre de animales de un rodeo con MAP. Por lo tanto, procedimos a evaluar la adición tanto de FixB como de CFP-2 a las mezclas M1 y M2. Cuando se evaluaron las nuevas mezclas por la prueba de liberación de IFN- γ , observamos que la adición de FixB a M1 y M2 aumentó la sensibilidad de la mezcla, siendo reconocida por más animales de un rodeo con TBB, sin comprometer su especificidad, ya que al ser evaluada tanto en un rodeo con PTB como en un rodeo libre de ambas enfermedades, no fue reconocida por ninguno de los animales. Contrariamente, CFP2 no solo no aumentó la sensibilidad de las mezclas, sino hubo una disminución en la

respuesta. Cabe destacar que M1-FixB y M2-FixB no presentaron diferencias significativas entre sí en esta experiencia, con lo cual, nos quedamos con la primer mezcla para seguir evaluando ya que contiene menor número de antígenos y por los resultados previos, ya que M1 es la mezcla que es reconocida por la mayor cantidad de animales con TBB y con mayor especificidad que M2. Una vez evaluada la mezcla M1-FixB por el ensayo de IFN- γ , procedimos a valorar su potencial diagnóstico por el ensayo de liberación de IFN- γ y por IDR y, en una experiencia de infección experimental con *M. bovis* llevada a cabo en Nueva Zelanda, en colaboración con el grupo del Dr. Buddle. En el caso del ensayo de liberación de IFN- γ , 11 de los 12 animales experimentalmente infectados respondieron tanto a la estimulación con M1-FixB como con PPD-B y ESAT-6/CFP10, resultando en una sensibilidad igual a cualquiera de estas mezclas. Uno de los animales no reaccionó a ninguno de los antígenos en las pruebas diagnósticas utilizadas, comprobándose luego, que el animal no reaccionante no presentó lesiones macroscópicas ni microscópicas al momento de la necropsia, con lo cual se consideró que no estaba infectado. En la prueba de IDR, M1-FixB fue capaz de producir una respuesta positiva en 8/12 animales, mientras que PPD-B en 11/12 animales. Por otra parte, también se evaluó la mezcla M1-FixB en un rodeo naturalmente infectado con *M. bovis* con alta prevalencia en nuestro país tanto por el ensayo de liberación de IFN- γ como por IDR. En el ensayo de liberación con IFN- γ la misma cantidad de animales respondieron positivamente tanto al estímulo con PPD-B como con M1-FixB mientras que en el caso de IDR, de los 10 animales positivos al inocular con PPD-B, 7 fueron positivos al estímulo con M1-FixB. Estos resultados indican que la mezcla M1-FixB resultó exitosa al detectar los animales experimentalmente infectados por IFN- γ pero detectó menos animales en rodeos naturalmente infectados tanto por IFN- γ como por IDR. A pesar de que los valores de IDO obtenidos con PPD-B fueron mayores que los obtenidos con M1-FixB, no se obtuvieron diferencias significativas. Los resultados previos mostraron que en un rodeo con PTB o sanos, los animales no detectan M1-FixB, a diferencia de lo que ocurre con PPD-B. De acuerdo a estos hallazgos la mezcla M1-FixB puede complementar a la tuberculina que se utiliza de rutina para el diagnóstico de TBB, aportando especificidad, además de poder utilizarla en rodeos en donde se aplican vacunas tanto contra TBB como contra PTB, donde la PPD-B da en algunos animales resultados falsos positivos.

Como se mencionó anteriormente, es muy común que los animales en estadios avanzados de la enfermedad o en condiciones de estrés, como la gestación o lactancia, se encuentren en estado de anergia. En estos casos, las pruebas de diagnóstico que miden respuesta celular no son útiles, ya que los animales pueden no ser detectados por la prueba oficial de detección de TBB que es la IDR con PPD-B y como consecuencia los animales permanecen en el rodeo diseminando la enfermedad. [266]. Hay varios trabajos donde se destaca la utilidad de un ensayo serológico como prueba complementaria a IDR o al ensayo de liberación de IFN- γ [131, 267, 268]. En uno de estos trabajos se evaluó el ELISA comercial IDEXX, el cual emplea como antígenos MPB70 y MPB83, en animales experimentalmente infectados con micobacterias ambientales, resultando altamente específico, a pesar de que los antígenos se encuentran conservados en el género. Además fue posible detectar animales que eran negativos tanto a la IDR como al ensayo de liberación de IFN- γ [268]. Es por ello que en este trabajo se quiso evaluar la capacidad diagnóstica serológica de las mezclas antigénicas M1, M1-FixB y M1-CFP2 por la técnica de MAPIA. Como resultado se observó que los sueros de los animales experimentalmente infectados reaccionaron fuertemente frente a estas mezclas, mientras que tanto los sueros de los animales controles de un rodeo libre, como los sueros de animales con PTB no reaccionaron. Con lo cual las mezclas de antígenos, M1, M1-FixB y M1-CFP2, además de ser útiles para detectar una respuesta celular fueron de utilidad para el diagnóstico serológico. Las 3 mezclas mostraron especificidad al no ser detectadas por animales sanos, así como también fueron capaces de discriminar entre animales vacunados con BCG de infectados con *M. bovis*. Pruebas complementarias a la IDR con PPD-B, como las desarrolladas en la presente tesis, serían de gran utilidad para el control y erradicación de TBB. La sensibilidad de IDR con PPD-B es menor al 80%, lo cual la hace poco útil como única herramienta de diagnóstico para una eficiente erradicación de la TBB [269]. Otras herramientas diagnósticas que detectan respuestas celulares, a pesar del alto costo y complejidad, como el ensayo de liberación de IFN- γ , puede ser utilizado como una prueba complementaria a la IDR, para confirmar o descartar los primeros resultados. La utilización de M1 en el test de liberación de IFN- γ demostró claros beneficios para aumentar la especificidad de la prueba, ya que se obtuvieron respuestas menores en comparación a la PPD-B, tanto en bovinos vacunados con BCG como en infectados con MAP. Además, los resultados confirmaron que la

especificidad de la prueba se ve comprometida cuando se utiliza PPD-B como inmunógeno en animales sensibilizados o infectados con otras micobacterias. Cuando evaluamos M1 en dos rodeos con PTB, sólo un animal reaccionó como positivo, lo que podría ser atribuido a las diferentes exposiciones ambientales [264].

Cuando se evaluaron 58 bovinos, en dos muestreos de un rodeo con TBB, y se estimuló la sangre con M1-FixB, un menor número de animales fueron reconocidos en comparación con PPD-B, dando una menor sensibilidad. Sin embargo, la nueva mezcla resultó más específica que la PPD-B cuando se evaluó en rodeos sanos o con PTB. Lo más importante, es que la inclusión de FixB en M1 mejoró el reconocimiento de estos animales naturalmente infectados con *M. bovis* sin comprometer la especificidad del ensayo de IFN- γ , demostrando que M1-FixB podría ser un candidato adecuado para el desarrollo de un reactivo para diagnóstico tanto para diferenciar animales infectados con *M. bovis* de animales infectados con MAP o vacunados con BCG. La única vacuna disponible contra TBB es la BCG, una cepa atenuada de *M. bovis*, la cual presenta una protección variable en bovinos, al igual que en humanos, frente al desafío con una cepa virulenta. Sin embargo, su uso comprometería el diagnóstico mediante IDR u otras técnicas que utilicen la PPD-B como antígeno, sobre todo en países en los que las pruebas diagnósticas se basan en estos *tests*. Es por ello, que la identificación de antígenos DIVA y el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en antígenos que permitan diferenciar animales vacunados de infectados, es necesario para poder implementar un programa de vacunación con BCG.

En cuanto al logro de conseguir una mezcla que permita diferenciar animales con TBB de aquellos infectados con MAP, nos permitirá avanzar en otro de los desarrollos en los cuales estamos trabajando en el laboratorio, que son las vacunas contra PTB. Estas vacunas son cepas atenuadas de MAP, que si no se aplican con un diagnóstico diferencial pueden comprometer la campaña de control y erradicación de la TBB.

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) Y ANTÍGENOS CONTENIDOS EN EL DERIVADO PROTEICO PURIFICADO AVIAR (PPD-A)

Durante la infección con MAP, la bacteria persiste intracelularmente dentro del macrófago. La respuesta inmune que se presenta en estadios tempranos es de tipo celular y es la clave para limitar la infección. Varios autores consideran que utilizar antígenos en los ensayos de detección de anticuerpos es de poca ayuda en el diagnóstico de las micobacterias patógenas, mientras que los antígenos que inducen una respuesta celular permiten el diagnóstico temprano de la infección. Una vez que los macrófagos infectados son activados, predomina una respuesta Th1 [270]. Estas células T liberan citoquinas como IL-2 e IFN- γ [271, 272]. IFN- γ inhibe la proliferación de las células Th2, inhibiendo la respuesta humoral. Durante el progreso de la infección, la disminución de la respuesta inmune celular y el aumento concomitante de la respuesta humoral refleja un cambio de respuesta de tipo Th1 a Th2 [270, 273]. Aunque la respuesta Th2 suele asociarse a los estadios tardíos de la infección con MAP, algunos investigadores han encontrado anticuerpos específicos en ganado con menos de 1 año de edad, a 134 [159] y 170 [274] días post inoculación. Las citoquinas relacionadas a las respuestas Th1 y Th2 también determinan la clase de inmunoglobulina G (IgG) o subclase sintetizada por las células plasmáticas. En el ganado, tanto IFN- γ como IL-2, relacionadas a la respuesta Th1, favorecen la producción de IgG2 e IgM, mientras que IL-4, relacionada a la respuesta Th2, induce un cambio de IgM a IgG1 e IgE [275, 276]. Dado la predominancia de la respuesta inmune Th1 en los estadios tempranos de la infección con MAP, Schillinger *y col.* comprobaron que los terneros infectados con MAP, en dicho estadio producen más IgG2 que IgG 1 [277]. En el mismo sentido otros investigadores mostraron que los títulos de IgG2, y no los de IgG1, fueron significativamente mayores en eliminadores asintomáticos (estadio temprano) que en animales control sin infectar [278]. Notablemente, este efecto se hizo evidente cuando se realizó un ensayo que discrimina isotipos de IgG, utilizando en el *test* un complejo de antígenos celulares de la bacteria, la PPD-j (derivado proteico purificado a partir de una cepa de MAP), pero no cuando se utilizaron componentes bacterianos purificados como proteínas de choque térmico o lipoarabinomano (LAM) [278].

Por lo tanto, como la respuesta humoral es importante desde estadios tempranos de la infección, es necesario caracterizar antígenos de MAP para aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas como el ELISA, para el diagnóstico de PTB. En la era pre-genómica, la principal técnica para el descubrimiento y la caracterización de nuevos antígenos candidatos fue la inmunoproteómica. También se utilizaron bibliotecas de expresión en paralelo, pero en menor grado. Con la secuenciación del genoma de MAP se abrió un amplio espectro de estrategias proteómicas y genómicas. En estas nuevas estrategias se utiliza también el enfoque inmunoproteómico basado en la selección de candidatos antigénicos por la combinación de su antigenicidad y su perfil de expresión [279]. Para la identificación de las proteínas inmunoreactivas estas son resueltas por electroforesis en dos dimensiones y los spots interesantes son identificados por espectrometría de masa seguida por el clonado, la expresión recombinante de las proteínas de interés y por último su evaluación por ensayos de serología o de respuesta celular [280]. La comparación del genoma de MAP con el de otras micobacterias, permitió la identificación de secuencias codificantes presentes solamente en MAP [281]. Si bien MAP presenta 966 genes únicos (Tabla 1), estudios comparativos revelaron que solo menos de 40 secuencias codificantes están presentes solamente en MAP [281, 282]. Esto refleja la alta similitud genética entre las micobacterias, sobre todo entre las que pertenecen al mismo complejo, ya sean del complejo *M. tuberculosis* o *M. avium* [283]. Por otro lado, para que una proteína sea fuertemente reconocida en un test de diagnóstico en cualquier momento de la infección, esta debe ser altamente expresada. Dos trabajos recientes demostraron que la expresión del proteoma de MAP difiere en condiciones de stress [284, 285], sugiriendo que MAP expresa una gama diversa de antígenos a lo largo del curso de la infección durante el cual las condiciones ambientales son cambiantes. En este trabajo, el primer paso fue evaluar un panel de antígenos para la selección de candidatos para ser estudiados en diferentes rodeos con PTB de nuestro país. Esto es importante, ya que identificación de novedosos antígenos podría mejorar el diagnóstico del ganado bovino infectado con MAP.

Varios estudios indican que para el diagnóstico de PTB debería utilizarse una combinación de pruebas serológicas junto con la detección del agente causal por PCR o cultivo [286]. En nuestro laboratorio evaluando diferentes técnicas de diagnóstico de PTB, encontramos que el uso de una combinación de ELISA para la detección y el cultivo con PCR para la

confirmación de la infección por MAP, eran las técnicas más convenientes para la identificación de rodeos infectados [77]. Australia uno de los países que ha implementado los mejores programas de control de PTB, tiene un programa de control voluntario de la enfermedad de *Johne* que se basa en el uso de un ELISA adsorbido (absorbed *Johne* EIA Kit, CSL Farmacéutica, Parkville, Victoria) [287]. Cada país tiene preferencia por alguno de los ensayos de ELISA comerciales, pero la técnica subyacente sigue siendo la misma. El diagnóstico definitivo debería seguir las sugerencias de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), donde se resalta que la confirmación de la infección por MAP se basa en el hallazgo de lesiones patognomónicas macroscópicas o microscópicas y el aislamiento de la bacteria en el cultivo [136]. Sin embargo, en comparación al cultivo y los test de PCR en materia fecal, los métodos serológicos son más baratos, rápidos y fáciles de realizar. Aunque la identificación de individuos portadores por serología puede resultar con baja especificidad y sensibilidad en la infecciones por micobacterias en general, esto puede mejorarse considerando diferentes antígenos de MAP. Esto puede lograrse identificado un amplio repertorio de antígenos que pueden mejorar la sensibilidad de los test serológicos y a la vez evitando aquellos antígenos que den reacciones cruzadas con otras micobacterias y por lo tanto resultados falsos positivos.

Como se dijo anteriormente en varios trabajos se ha utilizado el enfoque proteómico para definir antígenos específicos a partir de proteínas de MAP por la técnica de 2D [193, 288, 289]. Otro enfoque para obtener antígenos específicos consiste en expresar proteínas recombinantes a partir de secuencias codificantes de la bacteria y utilizarlas en un *array* de proteínas [174]. En este trabajo, por un lado se evaluaron proteínas de MAP y por otro lado se separaron las proteínas de la PPD-A, para la identificación de antígenos para el diagnóstico de PTB. Luego de evaluar su reactividad con sueros de animales enfermos y su posterior identificación por espectrometría de masas se desarrolló un MAPIA con estas proteínas. Estos macroarrays fueron evaluados tanto con sueros de animales con PTB como de animales sanos control y animales experimentalmente infectados con *M. bovis*.

En un primer MAPIA se evaluaron 51 proteínas de MAP con sueros de animales con PTB, animales sanos y animales experimentalmente infectados con *M. bovis*, y se seleccionaron siete proteínas, MAP 0038, MAP 0210c, MAP 0209c, MAP 1272, MAP 1693, MAP 2020

y MAP 2513. Estas proteínas fueron incorporadas en combinación en una mezcla (M1-PTB). Esta mezcla fue evaluada en principio por el formato de MAPIA, resultado la mezcla más específica que el antígeno comercial PPA-3, ya que no detectó ninguno de los sueros de los animales con TBB.

Por otra parte, siguiendo una metodología similar a la utilizada con la PPD-B, se identificaron antígenos a partir de la PPD-A, la cual se utiliza en la detección de PTB aplicándola intradérmicamente o como antígeno en el ensayo de la liberación de IFN- γ . La PPD-A se utiliza también para diferenciar animales con TBB de aquellos con PTB, utilizándola en la IDR doble comparativa con PPD-B. La prueba doble comparativa es de utilidad en el caso de rodeos coinfectados con ambas enfermedades o en rodeos vacunados contra PTB, en los que se quiere diferenciar si las IDR producidas se deben a la vacunación o a la infección con *M. bovis*. Las proteínas de la PPD-A identificadas en este caso, fueron evaluadas por MAPIA tanto de forma individual como en combinación en una mezcla (M2-PTB), las mismas si bien no resultaron específicas fueron capaces de detectar animales infectados con MAP con una alta sensibilidad. El hecho de que reaccionen con sueros de animales con TBB, se debe a que las proteínas identificadas en la PPD-A son proteínas conservadas en el género de las micobacterias, pero su alta reactividad las hace de utilidad para una primera selección de rodeos infectados con micobacterias.

Una vez evaluados los antígenos seleccionados del panel de 51 antígenos de MAP, como las proteínas identificadas a partir de la PPD-A por la técnica de MAPIA, se procedió a evaluar las mezclas M1-PTB y M2-PTB en un formato de ELISA, comparando los resultados con los del antígeno comercial PPA-3 (antígeno protoplasmático comercial de MAP). Este nuevo ELISA para PTB tuvo una mayor especificidad con el antígeno M1-PTB que el ELISA con el antígeno PPA-3. Los sueros utilizados fueron de 25 animales con cultivo positivo a partir de materia fecal o positivos por ELISA utilizando el antígeno PPA-3. En el caso de M2-PTB, si bien tuvo una mayor sensibilidad que M1-PTB y que PPA-3 no resultó ser específico ya que fue reconocido por varios sueros de animales con TBB. La selección de sueros de animales con cultivo positivo de MAP y animales que aun no siendo cultivo positivo tenían un ELISA-PPA-3 positivo se debió a que el ganado naturalmente infectado puede presentar varios estadios de la infección con MAP, expresando patrones de

antígenos diferenciados [232]. Además, solo el uso de animales cultivo positivo para estimar la sensibilidad del ELISA puede sobreestimar este parámetro ya que la mayoría de los animales que son cultivo positivo son también ELISA positivo [211].

Una vez evaluadas las mezclas por serología y debido a que muchos antígenos presentan epítopes B y T, se evaluó el panel de antígenos en la detección de respuesta celular en PTB mediante el ensayo de liberación de IFN- γ . Sería interesante para el diagnóstico tanto de PTB como de TBB utilizar paneles de antígenos para evaluar la respuesta inmune humoral, la cual tarda en desarrollarse, y a la vez para detectar la respuesta celular, la cual se evidencia tempranamente. De este modo, contaríamos con las herramientas para detectar animales positivos que se encuentren en diferentes estadios de la enfermedad y además se detectarían los animales que no tienen respuesta humoral pero si celular, siendo estos animales generalmente eliminadores de la bacteria y por lo tanto permanente fuente de contagio en el rodeo. Para evaluar la respuesta celular se utilizaron las 51 proteínas de MAP, de estas 51, 9 fueron detectadas por al menos 2 animales de un rodeo con alta prevalencia de PTB (Rodeo Tandil). Con el fin de evaluar la especificidad de estos antígenos, se hizo un ensayo de liberación de IFN- γ con sangre de animales experimentalmente infectados con TBB. De estos 9 antígenos hubo 3 que no fueron detectados por los animales con TBB, MAP 2593c, MAP 3402 y MAP 3692c, los cuales son potenciales antígenos para utilizar para evaluar respuesta celular específica en animales con PTB y por lo tanto interesantes para seguir estudiando.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que varios antígenos específicos integrados en mezclas antigénicas pueden mejorar la detección de la infección con MAP. De hecho, los perfiles de respuesta de anticuerpos a antígenos individuales varió considerablemente y no fue prominente, mientras que la utilización de mezclas con varios antígenos recombinantes permitió reconocer la respuesta de anticuerpos a lo largo del tiempo en el transcurso de la infección [290]. En resumen, aquí se identificaron novedosos antígenos de MAP, algunos de ellos no estudiados con anterioridad, utilizando una técnica que consideramos de gran valor para una evaluación masiva de antígenos, que es la técnica de MAPIA [290]. Basándonos en estos resultados, se desarrolló una mezcla de antígenos, la cual permitió un diagnóstico sensible y específico de animales infectados con MAP en comparación con los resultados del ELISA PPA-3.

El presente trabajo de tesis presenta varias mezclas de antígenos para el diagnóstico sensible y específico de PTB, las cuales podrían ser de importancia diagnóstica, sin embargo, necesitan ser evaluadas con un número mayor de animales con el fin de estimar, los puntos de corte, así como la sensibilidad y especificidad real.

CONCLUSIÓN

La implementación de planes de control junto con la investigación orientada a producir reactivos de nueva generación para el diagnóstico, son pilares fundamentales pero no suficientes en la lucha contra la TBB y PTB. Así, se ha renovado el interés en la obtención de vacunas como herramientas de control, siendo considerada como una de las opciones para reducir el riesgo y la incidencia de la infección por *M. bovis* y MAP. Hoy en día se cuenta con vacunas comerciales para PTB, pero estas no son aplicadas en la mayoría de los países, como en Argentina, por su interferencia con el diagnóstico de TBB. Por otro lado, la posible vacunación con BCG u otras cepas atenuadas de *M. bovis* presenta también una limitación para el diagnóstico, dado que interferiría con el diagnóstico de TBB, basado en la inoculación de la PPD-B, la cual se produce a partir de una cepa de *M. bovis*.

Por lo tanto es altamente necesario el desarrollo de una técnica de diagnóstico DIVA que permita diferenciar animales vacunados de infectados y que no detecte sensibilización por la presencia de otras micobacterias ambientales o infección con otras micobacterias patógenas. La disponibilidad de los genomas secuenciados de las micobacterias, permitió realizar estudios bioinformáticos de comparación genómica y transcriptómica y de esta manera hallar antígenos diferenciales entre los animales vacunados con BCG y aquellos infectados, los cuales pueden ser útiles para un diagnóstico DIVA [173].

En este estudio se proponen antígenos para el diagnóstico de TBB y PTB, que fueron evaluados con estudios bioinformáticos, proteómicos, y genómicos. Pero principalmente fueron evaluados en modelos animales, en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* y en rodeos naturalmente infectados con *M. bovis* o con MAP.

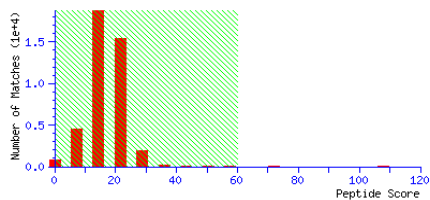
ANEXO

Resultados de la fracción 18

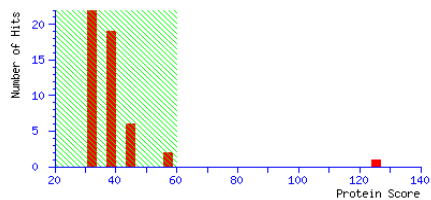
▼ Search parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
 Fragment mass tolerance : ± 0.8 Da
 Max missed cleavages : 2
 Instrument type : ESI-TRAP
 Number of queries : 45,159

▼ Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 60 indicate **identity** or **extensive homology** ($p < 0.05$).



[Deprecated] Score distribution for family members in the first 50 proteins. Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein families.

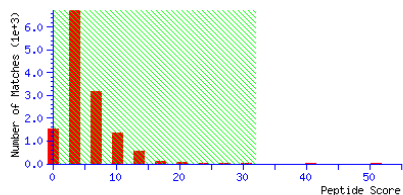
	Número de acceso	Score	Descripción
1	gi 156.0768	125	30S ribosomal protein S1 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]

Resultados de la fracción 21

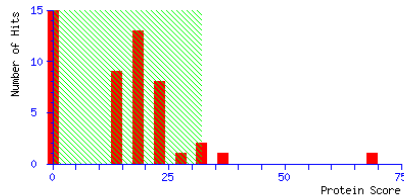
▼ Search parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
 Fragment mass tolerance : ± 0.8 Da
 Max missed cleavages : 2
 Instrument type : ESI-TRAP
 Number of queries : 30,171

▼ Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 32 indicate **identity** or **extensive homology** ($p < 0.05$).



[Deprecated] Score distribution for family members in the first 50 proteins. Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein families.

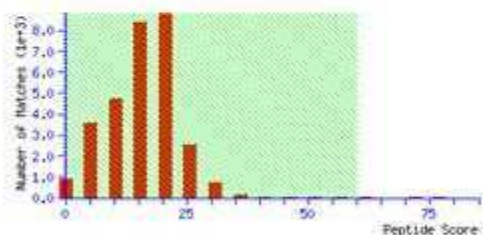
Número. de acceso	Descripción	Número de secuencias identificadas	Protein Score	emPAI	
1	gi 6469704	Mpt70 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i>]	2 (1)	69	0.15
2	gi 255098496	hypothetical protein MtubK_20555 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> KZN 605]	4 (1)	37	0.23
3	gi 71041815	Chain B, Solution Structure Of The Cfp-10.Esat-6 Complex. Major Virulence Determinants Of Pathogenic Mycobacteria	3 (1)	31	0.35
4	gi 15610792	hypothetical protein Rv3656c [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	4 (1)	30	0.50
5	gi 215448265	chromosome partitioning protein parA [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> T85]	8 (1)	26	0.10
6	gi 148823640	NAD synthetase [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> F11]	18 (1)	25	0.04
7	gi 15610188	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	14 (1)	25	0.04
8	gi 15608396	cytochrome P450 130 CYP130 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]	5 (1)	24	0.07
9	gi 215411828	hypothetical protein Mtub9_10959 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 94_M4241A]	8 (1)	24	0.09
10	gi 15841919	hypothetical protein MT2474 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551]	19 (1)	22	0.05

Resultados de la fracción 23

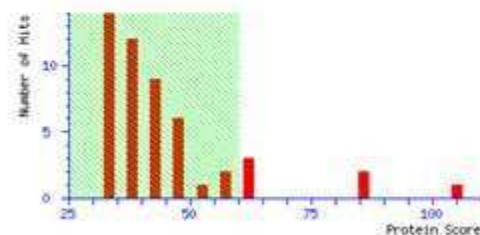
▼ Search parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
 Enzyme : Trypsin
 Variable modifications : ϵ -Oxidation (M)
 Mass values : Monoisotopic
 Protein mass : Unrestricted
 Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
 Fragment mass tolerance : ± 0.8 Da
 Max missed cleavages : 2
 Instrument type : ESI-TRAP
 Number of queries : 34,160

▼ Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-10\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 60 indicate **identity or extensive homology** ($p < 0.05$).



[Deprecated] Score distribution for family members in the first 50 proteins: Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein families.

Número de Acceso	Descripción	Número de secuencias identificadas	Protein Score	emPAI
gi 15611010	10 kDa culture filtrate antigen EsxB	3	105	1.3
gi 149926	antigen MPB70	2	87	0.46
gi 2149409	Unknown	1	87	0.27
gi 15609513	antigen CFP2	1	63	0.2
gi 15610165	electron transfer flavoprotein subunit alpha	1	62	0.11
gi 15607267	serine protease PepA	1	50	
gi 248681	MMP=19 kda major membrane protein	1	45	
gi 6469702	Mpt83	1	45	

Resultados de la fracción 24

Database : NCBI nr 20091103 (9,993,394 sequences; 3,409,286,210 residues)
Taxonomy : Mycobacterium tuberculosis complex (21,810 sequences)
Timestamp : 22 Mar 2012 at 05:20:32 GMT

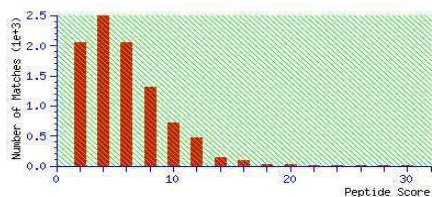
Re-search All Non-significant Unassigned [\[help\]](#) Export As: XML

Not what you expected? Try [the select summary](#).

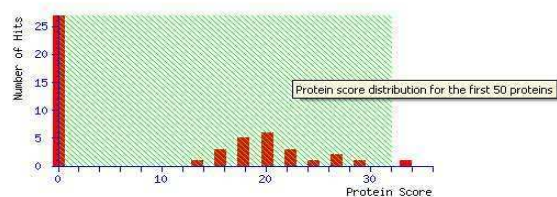
Search parameters

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin
Variable modifications : Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic
Protein mass : Unrestricted
Peptide mass tolerance : ± 1.5 Da
Fragment mass tolerance : ± 0.8 Da
Max missed cleavages : 2
Instrument type : ESI-TRAP
Number of queries : 25,143

Score distribution



Peptide score distribution. Ions score is $-\log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 32 indicate **identity** or **extensive homology** ($p < 0.05$).



[Deprecated] Score distribution for family members in the first 50 proteins. Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein families.

	Número de acceso	Score	Descripción
1	gi 15611012	33	Hypothetical protein Rv3876 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv]

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Aranaz A. Diagnóstico y Control de Enfermedades Producidas por Micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. CEBASEV. Septiembre 2013.
- [2] OMS http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/en/patmycobact6.pdf
- [3] Juste. Diagnóstico y Control de Enfermedades Producidas por Micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. CEBASEV. Septiembre 2013.
- [4] Antuña, J.C., Rossanigo, C., Arano, A. Escenario Internacional y análisis de la actividad ganadera bovina Nacional por estratos de productores y composición del stock Años 2008 a 2011 Comparativo por provincias Argentina Ganadería bovina de carne, tambo y engorde a corral.
- [5] Garro, C., Morris, W., Delgado, F., Garbaccio, S. (2011). Vet. Arg. Vol. XXVIII–Nº 276
- [6] Noste, J., Riso, R. y Costa, A. (1999). Prevalencia de tuberculosis bovina en la cuenca lechera de Cotar Jornadas de divulgación científica técnica. Facultad de Cs. Veterinarias, Casilda, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- [7] Navarro, F.; Velazquez, G.; Rubies. N. y col. (1997). Relevamiento de tuberculosis en tambos de Jovita y Serrano. Acreditación de veterinarios. Cursos de capacitación. Plan nacional de control y erradicación de tuberculosis bovina.
- [8] Magnano, G.; Schneider, M.; Sassia, E. (1997). Cursos de capacitación. Plan nacional de control y erradicación de tuberculosis bovina. I.S.B.N. 950-665-054-3. Imprenta UNRC, Argentina. Estudio prevalencia de tuberculosis bovina en tambos de la cuenca lechera de Coronel Moldes provincia de Córdoba, Argentina
- [9] Torres, P. (2009). http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion_tuberculosis_31_12_09.pdf. 2009. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina.
- [10] Torres, P. (2013). Diagnóstico y Control de Enfermedades Producidas por Micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. CEBASEV. Septiembre.
- [11] Paolicchi F-Romano MI, Microbiología Veterinaria. Capítulo 42.
- [12] Schiller I, et.al. (2009). Bovine Tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. Transboundary and Emerging Diseases. Vol. 57, no.4, pp. 215-27.
- [13] Johnson-Ifearulundu Y, et.al. (1999). Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. J Am Vet Med Assoc. 214(6):822-5.

-
- [14] Anon, 2003. Zoonotic Tuberculosis and Food Safety. Report of the Food Safety Authority of Ireland Scientific Committee. Food Safety Authority of Ireland, Dublin.
- [15] Barrera, L., and De Kantor, IN. (1987). Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop. Geogr. Med.* 39, 222–227.
- [16] de Kantor, IN., et.al. (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. 88, 358–65.
- [17] Pavlík, I, et.al. (1998). Occurrence of bovine tuberculosis in animals and humans in the Czech Republic in the years 1969 to 1996. *Vet. Med. (Czech)* 43, 221–31.
- [18] Samper et al. (1997). Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS*.
- [19] Rodwell et al. (2010). Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int J Infect Dis*.
- [20] Kamerbeek, J., et.al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–14.
- [21] Cousins, DV., et.al. (1999). Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: DNA typing of isolates, 1970–1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3, 722–31.
- [22] Sequeira, MD, et.al. (1990). Tuberculosis bovina en seres humanos. *Rev. Arg. Del Torax*.51, 13–17.
- [23] Etchechoury, I., et.al. (2010). Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses Public Health.* 57(6):375-81. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01233.x.
- [24] Chapman (1968). Isolation of atypical mycobacteria from pasteurized milk. *Am Rev Respir Dis.*;98(6):1052-4.
- [25] Hermon-Taylor J. et al. (2000). *World Journal of Gastroenterology*.6 (5), pp. 630-2.
- [26] Davis WC, Madsen-Bouterse SA. (2012). Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the need for a study is long overdue. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;145(1-2):1-6. Review.

-
- [27] Momotani E., Ozaki, H., Hori, M. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lipophilic antigen causes Crohn's disease-type necrotizing colitis in Mice. Springerplus. 1(1):47. doi: 10.1186/2193-1801-1-47.
- [28] Cirone, K.; et.al. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Rev. argent. microbiol.* vol.39, n.1 , pp. 57-68.
- [29] Hruska et al. (2005). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. *Vet Med – Czech* 8, 327–35.
- [30] de Kantor, IN. (1988). Something new about an old acquaintance: the tuberculous bacillus. *Medicina (B Aires)*. 48(3):321-3.
- [31] Rastogi, N. et.al. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* 20:21-54.
- [32] Daffe, M., and P. Draper. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39:131–203.
- [33] Biet, F., Boschioli, ML., Thorel, MF., Guilloteau, LA. (2005). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res.* 36(3):411-36. Review.
- [34] Aranaz, A., et.al. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53(Pt 6):1785-9.
- [35] Alexander, KA., et.al. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* Vol. 16, No. 8.
- [36] Telenti, A., et.al. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31, 175–8.
- [37] Pym, AS., et.al. (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol.* 46(3):709-17.
- [38] Garnier, T., et. al. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):7877-82.

-
- [39] Whittington, R.J., et al. (2004). Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2989–3004.
- [40] Primm, T.P., et.al. (2004). Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:98–106.
- [41] Thorel, M.F., et.al. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 :254-60.
- [42] Li, L., et.al. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(35):12344-9.
- [43] Marri, P.R., et.al. (2006). Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev.* 30(6):906-25. Review.
- [44] Whittington, R.J., et.al. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* in animal populations. *Aust Vet J.* 79(4):267-78.
- [45] Streeter, R.N., et. al. (1995). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res.* 56(10):1322-4.
- [46] Harris, N.B., Barleta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subs. *Paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews.* 489-512.
- [47] Menzies, F.D., Neill, S.D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.* 160(2):92-106.
- [48] Kaufmann, S.H.M. (2005). Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol* 26: 660–7
- [49] Volkman, H.E., et.al. (2004). Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS Biol* 2:e367
- [50] Pollock, J.M., et.al. (1996). Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 87: 236–41.

-
- [51] Welsh, M.D., et.al. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*. 114: 101–11.
- [52] Waters, W.R., (2000). Lymphocyte subset proliferative responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. *Vet Immunol Immunopathol*. 77: 257–73.
- [53] Buddle, B.M., et.al. (2005). Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108: 45–51.
- [54] Waters, W.R., et.al. (2001). Modulation of *Mycobacterium bovis*-specific responses of bovine peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Clin Diagn Lab Immunol* 8:1204–12.
- [55] Maue, A.C., et.al. (2005). Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infect Immun* 73: 6659–67.
- [56] Pollock, J.M., et.al. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81: 103 -7.
- [57] Momotani, E., et.al. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet Pathol*, 25(2):131-7.
- [58] Bermudez, LE., et.al. (2010). Peyer's patch-deficient mice demonstrate that *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* translocates across the mucosal barrier via both M cells and enterocytes but has inefficient dissemination. *Infect Immun*. 78(8):3570-7.
- [59] Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R., Xing, Z. (1999). Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 103(7):1023-9.
- [60] Hope, JC., Thom, ML., McCormick, PA., Howard, CJ. (2004). Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet Immunol Immunopathol*. 100(3-4):187-95. Review.

-
- [61] Begg, DJ. et al., (2010). Experimental infection model for Johne's disease using a lyophilised, pure culture, seedstock of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol.* 141(3-4):301-11.
- [62] Begg, DJ. et al., (2011). Does a Th1 over Th2 dominancy really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections? *Immunobiology.* 216(7):840-6. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.004.
- [63] Pérez, V., et.al. (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am J Vet Res.* 58(8):799-803.
- [64] Gillan, S., et.al. (2010). Identification of immune parameters to differentiate disease states among sheep infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol.* 17(1):108-17. doi: 10.1128/CVI.00359-09.
- [65] de Silva, K. et. al. (2011). The interleukin 10 response in ovine Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 139(1):10-6. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.07.022.
- [66] Clarke, CJ. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Pathol.* 116(3):217-61.
- [67] Nielsen, SS. and Toft, N. (2008). Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology,* 129, 217–35.
- [68] Delgado, F., Etchehoury, D., Gioffre, A., Paolicchi, F., Blanco Viera, J., Mundo, S., Romano, M. (2008). Comparison between two *in situ* methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection in tissue samples from infected cattle. *Vet Microbiol,* 134: 385-7.
- [69] Allen, JL. (1992). A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria. *Med Lab Sci.* 49(2):99-102.
- [70] Lehtola, M. J., Torvinen, E., Miettinen, IT. and Keevil, CW. (2006). Fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:848-85

-
- [71] Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-69.
- [72] Moss, M.T., Green, E.P., Tizard, M.L., Malik, Z.P. and J. Hermon-Taylor. (1991). Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut* 32:395-98.
- [73] Manual de diagnóstico de micobacterias de importancia en medicina veterinaria. (2005). Comisión Científica de Micobacterias, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Pp. 82-93.
- [74] Sockett, D.C., et.al. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 30:1134-9.
- [75] Whitlock, R.H, et.al. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77:387-98.
- [76] Whitlock, R. et al. (1996). The performance of fecal culture and serologic testing for Johne's disease: national comparative survey of diagnostic laboratories, p. 242-9. Madison, WI, USA.
- [77] Paolicchi, F.A., et.al. (2003). Application of Different Methods for the Diagnosis of Paratuberculosis in a Dairy Cattle Herd in Argentina. *J. Vet. Med. Series B.* 50, 20-6.
- [78] Thorel, M. F. (1984). Review of the occurrence of mycobactin dependence among mycobacteria species. *Ann. Rech. Vet.* 15:405-9.
- [79] Aduriz, J.J, et.al. (1995). Lack of mycobactin dependence of mycobacteria isolated on Middlebrook 7H11 from clinical cases of ovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 45:211-7.
- [80] Sockett, D.C., et.al. (1992). Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle. *Can. J. Vet. Res.* 56:148-53.
- [81] Whittington, R.J, et.al. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. *J. Clin. Microbiol.* 37:1077-83.
- [82] Damato, J.J and M.T. Collins. (1990). Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in

-
- radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Vet. Microbiol.* 22:31-42.
- [83] Stich, R. W, et.al. (2004). Evaluation of an automated system for non-radiometric detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in bovine feces. *J. Microbiol. Methods* 56:267-75.
- [84] Wards, B.J. Et.al. (1994). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 43:227-40.
- [85] Garbaccio, S. (2013). Diagnóstico y Control de Enfermedades Producidas por Micobacterias: Tuberculosis y Paratuberculosis. CEBASEV. Septiembre 2013.
- [86] Thierry, D., Brisson-Noel, A., Vincent-Levy-Frebault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B. (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 28:2668–2673
- [87] Antognoli, M.C., et.al. (2001). A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *J Vet Diagn Invest.*;13(2):111-6.
- [88] Leibana, E., et.al. (1994). Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissues sample by PCR. *J Clin Microbiol.* 35(1):33-6.
- [89] Zumárraga, M.J., Soutullo, A., García, M.I. et.al. (2012). Detection of *Mycobacterium bovis*-infected dairy herds using PCR in bulk tank milk samples. *Foodborne Pathog Dis.* 2012 Feb;9(2):132-7. doi: 10.1089/fpd.2011.0963.
- [90] Miller, J., et.al. (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Vet Diagn Invest.* 9(3):244-9.
- [91] Bull, T.J, et.al. (2000). Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* 146 (9):2185-97.
- [92] Corti, S. and R. Stephan. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC. Microbiol.* 2:15. 52.
- [93] Djonne, B., et.al. (2003). Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium*

-
- avium subsp. paratuberculosis in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* 92:135-43.
- [94] Englund, et.al. (2001). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Vet. Microbiol.* 81:257-71.
- [95] Marsh, I. B. and R. J. Whittington. (2001). Progress towards a rapid polymerase chain reaction diagnostic test for the identification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in faeces. *Mol. Cell Probes* 15:105-18.
- [96] Vary, P.H., et.al. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 28:933-7.
- [97] Whittington, R.J., et.al. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36:701-7.
- [98] Whittington, et.al. (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 77:392-7.
- [99] Brennan, P. J. and H. Nikaido. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64:29-63.
- [100] Uwatoko, K., et.al. (1996). Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples. *Vet. Microbiol.* 52:73-9.
- [101] Khare, S., et.al. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42:1075-81.
- [102] Halldorsdottir, S., et.al. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridisation. *Vet. Microbiol.* 87:327-40.
- [103] Fang, Y., et.al. (2002). Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular

-
- beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 40:287-91.
- [104] Collins, D. et.al. (1989). Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51:175-8.
- [105] Englund, S., et.al. (2002). An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:267-71.
- [106] Bosshard, C., et.al. (2006). Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J Food Prot.* 69(7):1662-7
- [107] Monaghan, M.L.et.al. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.40, p.11-124.
- [108] ANON. (2004). Bovine tuberculosis erradications: uniform methods and rules. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Washington.
- [109] dos Santos Medeiros, L. et.al. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 531-41.
- [110] Kerr, W.R. (1946). Studies on tuberculin sensitivity in the bovine; the Stormont test. *Vet Rec*
- [111] Blood y Radostits. (1994). Disease caused by mycobacteria IV. In: *Veterinary Medicine*. 7th ed. London, UK: Bailliere Tindall, eds., 7: 710–40.
- [112] Costello et.al. (1997). Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec.* 30;141(9):222-4.
- [113] Doherty et.al. (1995). Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci.* 58(3):217-21.
- [114] Lilenbaum, W. et. al. (1999). Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Zentralbl Veterinarmed B.* 46(5):353-8.

-
- [115] Wood, P.R., et.al. (1990). Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci.* 49(1):46-9.
- [116] Gormley, E., et.al. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *JD.Vet Microbiol.* 112(2-4):171-9. Review.
- [117] Neill, S.D., et.al. (1994). Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec.* 135(6):134-5.
- [118] Whipple, D.L. et.al. (1995). Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am J Vet Res.* 56(4):415-9.
- [119] Cagiola, M., et.al. (2004). Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11(5):952-6.
- [120] Rothel, J.S. et.al. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J.* 69(1):1-4.
- [121] Gormley, E., et.al. (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 102(4):413-20.
- [122] Thom, M., et.al. (2004). The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 102(4):399-412
- [123] Ryan, T.J., Et.al. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci.* 69(1):57-61.
- [124] Marassi, C.D., et.al. (2010). The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Acta Trop.* 113(2):199-201. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.10.002.
- [125] Billman-Jacobe, H, Carrigan, M., Cockram, F., Corner, L.A, Gill, I.J., Hill, J.F,

-
- Jessep, T., Milner, A.R. and Wood, P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Australian Veterinary Journal* Volume 69, Issue 2, pp. 25–28.
- [126] Collins, M.T. (1994). Clinical approach to control of bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc.* 204(2):208-10. Review.
- [127] Jungersen, G., Huda, A., Hansen, J.J., Lind, P. (2002). Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(2):453-60.
- [128] Huda, A., Jungersen, G., Lind, P. (2004). Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol*, 104: 43-53.
- [129] Aranaz, A., De Juan, L., Bezos, J., Alvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., López-Sánchez, J and Domínguez, L. (2006). Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Res.* 37(4):593-606.
- [130] OIE. <http://www.oie.int/doc/ged/D14008.PDF>
- [131] Casal, C., Díez-Guerrier, A., Álvarez, J., Rodríguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott R., Martel, E. and Aranaz, A. (2014). Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol.* 170(3-4):342-51.
- [132] Wiker, H.G., et.al. (1998). Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun.* 66(4):1445-52.
- [133] Griffin, J.F., et.al. (1991). Tuberculosis in domesticated red deer: Comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. *Res. Vet. Sci.* 50:279-85.
- [134] Lilenbaum, W., et.al. (1999). Evaluation of and ELISA – PPD for diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *Res. in Vet. Sci.* 66: 191-5.
- [135] Koo, H.C. et.al. (2005). Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 43(9):4498-506.

-
- [136] OIE http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/PARATUBERCULOSIS-ES.pdf
- [137] Schiller, I., et al. (2009). Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb as a novel antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16(9):1314-21.
- [138] Amadori, M. et al. (2002). Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* 85(4):379-89.
- [139] Plackett, P. et al. (1989). An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust Vet J.* 66(1):15-9.
- [140] Lilenbaum, W., et al. (2001). The use of Ag85 complex as antigen in ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis in dairy cows in Brazil. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 48(3):161-6.
- [141] De la Rua-Domenech, R., et al. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81(2):190-210. Review
- [142] Lightbody, K.A., McNair, J., Neill, S.D., Pollock, J.M. (2000). IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunized and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet. Microbiol.* 75 (2), 177-88.
- [143] Billman-Jacobe, et al. (1990). Mapping of the T and B cell epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein, MPB 70. *Immunol. Cell Biol.* 68 (6), 359-65.
- [144] Radford, A.J., et al. (1990). Epitope mapping of the *Mycobacterium bovis* secretory protein MPB 70 using overlapping peptide analysis. *J. Gen. Microbiol.* 136 (2), 265-72.
- [145] Waters, W.R, Palmer, M.V, Thacker, T.C., et al. (2006). Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin Vaccine Immunol* 13:648–54.
- [146] Wiker, H.G. (2009). MPB70 and MPB83--major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand. J. Immunol.* 69(6), 492-9.
- [147] Liu, S. et al. (2007). Novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 87 (3), 212–7

-
- [148] Ritacco, V. et.al. (1987). Assessment of the sensivity and specificity of ELISA for the detection of Mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *J. Vet. Med.* 34 (2), 119-25.
- [149] Lilenbaum, W. et.al (2006). The use of ELISA as a complementary tool for bovine tuberculosis control in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43 (2), 256-61.
- [150] Silva, E. (2001). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 78 (2), 111-7.
- [151] Pollock, J.M. & Neill, S.D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163 (2), 115-27.
- [152] Collins, M. T. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 12:357-71.
- [153] Yokomizo, Y. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 44(11):2205-7.
- [154] Beam, R.E.et.al (1969) Purified protoplasmic peptides of mycobacteria: isolation of species-specific peptides from protoplasm of mycobacteria. *Journal of Bacteriology* 100, 195–200.
- [155] Yokomizo, Y., et.al. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 47, 111–9.
- [156] Bech-Nielsen, S., et.al. (1985). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* antigenic proteins. *American Journal of Veterinary Research* 46, 2418–20.
- [157] Abbas, B., et.al. (1983). Isolation of specific peptides from *Mycobacterium paratuberculosis* protoplasm and their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 2229–36.
- [158] Collins, M.T., et.al. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(6):685-92.
- [159] Eda, S., et.al. (2005). New method of serological testing for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (Johne's disease) by flow cytometry. *Foodborne Pathog. Dis.* 2:250–62.

-
- [160] Waters, W.R., et.al. (2003). Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. *Infect.Immun.* 71:5130–8.
- [161] Bannantine, J.P., et.al. (2008). Early antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens in subclinical cattle. *Proteome Sci.*6:5. doi:10.1186/1477-5956-6-5.
- [162] Nielsen. (2009). Paratuberculosis, organism, disease, control. Capítulo 24
- [163] Muskens, J., et.al. (2002). Evaluation of the long-term immune response in cattle after vaccination against paratuberculosis in two Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology* ,86, 269–78.
- [164] Ferreira, R., et.al. 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:173-5.
- [165] Hope, A.F. (2000). Sensitivity and specificity of two serological tests for the detection of ovine paratuberculosis. *Aust Vet J.* 78(12):850-6.
- [166] Morris, J.A., et.al. (1977). An improved antigen for the paratuberculosis complement fixation test. *J Biol Stand.* (4):315-9.
- [167] Aalund, O. et.al. (1984). Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests applied to animals with subclinical infections of paratuberculosis. *In: Paratuberculosis, diagnostic methods, their practical application and experience with vaccination.* Commission of the European Communities, Copenhagen, Denmark. pp. 9–39.
- [168] Reichel, M.P., et al. (1999). Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of antigens involved. *Vet Microbiol* 66:135–50.
- [169] Lyashchenko, K. P., et.al. (2000). A multi-print immunoassay for the diagnosis of infectious diseases. *J. Immunol. Methods* 242:91–100.
- [170] Bryce, M. (2010). Sensitivity, Specificity, and Confounding Factors of Novel Serological Tests Used for the Rapid Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*). *Clin Vaccine Immunol.* 2010 Apr;17(4):626-30. doi: 10.1128/CVI.00010-10. Epub 2010 Feb 17.

-
- [171] Veerasami, M. (2012). Multi-antigen print immunoassay for seroepidemiological surveillance of bovine tuberculosis on indian cattle farms. *Vet Ital.* 48(3):253-67.
- [172] Fitzgerald, S.D. (2012). An evaluation of MAPIA in Michigan as an Ante-Mortem Supplemental Test for use in suspect Tuberculosis Cattle. *Veterinary medicine international*, 2012. Doi 10.1155/2012/674368. 6 pages.
- [173] Vordermeier, M., et.al. (2009). Antigen mining to define *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected animals: A VLA perspective. *Transbound Emerg Dis.* 56(6-7):240-7.
- [174] Bannantine, J.P., et.al. (2008). Development and use of a partial *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis protein array. *Proteomics*, vol.8, no.3, pp.463-74
- [175] Mullerad, J., et al. (2002). The immunogenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* 85B antigen. *Med Microbiol Immunol.* 190(4):179-87.
- [176] Rosseels, V. et al., (2006). Members of the 30- to 32-kilodalton mycolyl transferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Infect Immun.* 74(1):202-12.
- [178] Griffin, J.F. et. al. (2005). Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's Disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin Diagn Lab Immunol.* 12(12):1401-9.
- [179] Mukamolova, G.V., et.al. (2002). Family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 46(3):623-35.
- [180] Cole, S.T., et.al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393(6685):537-44.
- [181] Banu, S., et.al. (2002). Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?. *Mol Microbiol.* 44(1):9-19.
- [182] Yamaguchi, R., et.al. (1989). Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 57(1):283-8.
- [183] Bai, Y. et.al. (2008). Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse

-
- model. *Protein Expr Purif.* 59(2):189-96.
- [184] Nagai, S., et.al. (1981). Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 31(3):1152-60.
- [185] Matsuo, T. et al. (1996). Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol*, 43:483–9.
- [186] Hewinson, R.G., et.al. (1996). Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol*, 43:490–9.
- [187] Chambers, M.A., et al., (2004). Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41(2):93-100.
- [188] Mahairas, et.al. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 178:1274-82.
- [189] Wiker, H.G., et.al. (1992). The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev.* 56(4):648-61. Review
- [190] Yang, et.al. (2012). Purified protein derivatives of tuberculin-past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 66 (3):273-80.
- [191] Jones, et.al. (2010). Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin Vaccine Immunol.* 17(9), 1344-48.
- [192] Souza I.I. (2012). Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus.* 1(1):77.
- [193] Cho, D., et.al. (2006). Comparison of the proteosomes and antigenicities of secreted and cellular proteins produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, vol.13, no.10, pp.1155-61.
- [194] Gumber, S. et al., (2009). Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Vet Microbiol.* 137(3-4):290-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.012.
- [195] Shin, S.J., et.al. (2004). Comparative antibody response of five recombinant antigens

-
- in related to bacterial shedding levels and development of serological diagnosis based on 35 kDa antigen for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Sci.* 5, 111–117.
- [196] Dheenadhayalan, V., et.al. (2002). Cloning and characterization of the genes coding for antigen 85A, 85B and 85C of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *DNA Seq.* 13, 287–94.
- [197] Gilot, P., et.al., (1992). Induction of cellular immune-reactions by A36, an antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*: comparison of A36 and Johnin components. *Scand.J. Immunol.* 36, 811–21.
- [198] Ostrowski, et.al. (2003). B cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand. J. Immunol.* 58, 511–21.
- [199] Dekesel, M. (1993). Cloning and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 31, 947–54.
- [200] Vannuffel, P. (1994). Development of species specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1211–16.
- [201] Malamo, M., et.al. (2006). Development of ELISA to detect antibodies specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with truncated 34 kDa proteins. *Jpn. J. Vet. Res.* 54, 99–107.
- [202] Dekesel, M., et.al. (1992). Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 36, 201–12.
- [203] Gilot, P., et.al. (1993). Isolation and sequencing of the gene coding for an antigenic 34-kilodalton protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. *J. Bacteriol.* 175, 4930–5.
- [204] Frothingham, R., et.al. (1998). Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 1189–96.
- [205] Mackenzie, N., (2009). Genomic comparison of PE and PPE genes in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1002–11.

-
- [206] Annau, E. (1958). A purified complement-fixing antigen from *Mycobacterium johnei*. *Nature*. 181(4617):1206-7.
- [207] Sugden, E.A., et.al. (1989). Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res*. 50(6):850-4.
- [208] Jark, U., et.al. (1997). Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol*. 57(2-3):189-98.
- [209] Eckstein, T.M. et.al. (2006). A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 5209–15.
- [210] Biet, F., et.al. (2008). Lipopentapeptide induces a strong host humoral response and distinguishes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from *M. avium* subsp. *avium*. *Vaccine* 26, 257–68.
- [211] Costanzo, G., Pinedo, F.A., Mon, M.L., Viale, M., Gil, A., Illia, M.C., Gioffré and, Romano, M.I. (2012). Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Vet Microbiol*. 156(1-2):183-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.029.
- [212] Wu, C.W., et.al. (2007). Defining the stressome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in vitro and in naturally infected cows. *J Bacteriol*. 189, 7877-86.
- [213] Langelaar, M., et.al. (2002). *Mycobacterium paratuberculosis* heat shock protein 70 as a tool in control of paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 87(3-4):239-44.
- [214] Cobb, A.J. and Frothingham, R. (1999). The GroES antigens of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol*. 67(1):31-5.
- [215] Hughes, et. al. (2008). Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific proteins in sheep with paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 15(12):1824-33.
- [216] El-Zaatari, F.A. et al. (1994). Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E. coli*. *Curr Microbiol Sep*;29(3):177-84.
- [217] El-Zaatari, F.A. et.al. (1995). Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab*

-
- Immunol. 2(6):657-64.
- [218] Bannantine, et.al. (2007). Development and characterization of monoclonal antibodies and aptamers against major antigens of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 518–26.
- [219] Bannantine, et.al. (2008). Development and use of a partial *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis protein array. *Proteomics* 8, 463–74.
- [220] Bannantine, J.P., et.al. (2004). Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J Clin Microbiol.* 42(1):106-14.
- [221] Stevenson, K. (2006). Studying the pathogenesis of paratuberculosis: the enduring challenge. En: Manning y Nielsen editores. *Proc.8th Int.Coll.Paratub.*, pp. 88-97. IAP, Madison, WI, USA.
- [222] Bannantine, J.P., et.al. (2006). Identification of diagnostic proteins in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis by a whole genome analysis approach. *Methods Mol Biol.* 345:185-96.
- [223] Nagata, R., et.al. (2005). Expression Cloning of Gamma Interferon-Inducing Antigens of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Infection and Immunity*, Vol. 73, No. 6. p. 3778-82,
- [224] Hughes, V.M., et.al. (2006). Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. En: Manning y Nielsen editores. *Proc.8th Int.Coll.Paratub.*, p. 158. IAP, Madison, WI, USA.
- [225] Cho, D., et.al. (2006). Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. *Proteomics*, 6, 5785–94.
- [226] Cho D, et.al. (2007). Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein Expr Purif.* 53(2):411-20.
- [227] Meikle, V., et.al. Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vaccine Immunol*, 16(9):1352-9.
- [228] Alito, A., et.al. 2003. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell response after infection with a virulent strain. *Braz J Med Biol Res.*

-
- 36(11):1523-31.
- [229] Tesis doctoral. Gioffré A. 2007.
- [230] Mikkelsen, H., et.al. (2011). Review of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis antigen candidates with diagnostic potential. *Vet Microbiol.* 152(12):120.
- [231] Kathaperumal, K., et.al. (2009). Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vaccine.* 27(1):123-35. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.019.
- [232] Radosevich, T.J, et.al. (2007). Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains K-10 and 187. *J Bacteriol.* 189(3):1109-17.
- [233] Willemsen, P.T.J., et.al. (2006). Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets,” *Veterinary Microbiology*, vol. 114, no.3-4, pp. 337–44.
- [234] Blanco, F.C., et.al. (2013). *Mycobacterium bovis* Dmce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*”, *Tuberculosis*, vol. 93, no. 3, pp. 363-72.
- [235] Aguilar, L.D. (2009). *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 157(1):139-47. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03923.x.
- [236] Buddle, B.M, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy AR, Heslop J, De Lisle GW, Stanford JL, Aldwell FE. (1995). Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. *Res Vet Sci.* 59(1):10-6.
- [237] Mc Murray, D.N. et.al. (1996). Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Curr Top Microbiol Immunol.* 215:157-79. Review
- [238] Shin AR¹, Kim HJ, Cho SN, Collins MT, Manning EJ, Naser SA, Shin SJ. Identification of seroreactive proteins in the culture filtrate antigen of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis human isolates to sera from Crohn's

-
- disease patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Feb;58(1):128-37. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00617.x.
- [239] Skjot, R.L. Brock, I., Arend, S.M., Munk, M.E., Theisen, M., Ottenhoff, T.H., Andersen, P. (2002). Epitope Mapping of the Immunodominant Antigen TB10.4 and the Two Homologous Proteins TB10.3 and TB12.9, Which Constitute a Subfamily of the *esat-6* Gene Family *Infect Immun.* 70:5446-53.
- [240] Flores-Villalva, S., et.al. (2012). Specificity of the Tuberculin Skin Test Is Modified by Use of a Protein Cocktail Containing ESAT-6 and CFP-10 in Cattle Naturally Infected with *Mycobacterium bovis*”, *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 19, no. 5, pp. 797–803.
- [241] Jones, G., et.al. (2012). Improved Skin Test for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis by the Addition of Rv3020c-Derived Peptides. *Clin Vaccine Immunol.* 19(4):620-2. doi: 10.1128/CVI.00024-12.
- [242] Bigi F. (1995). Characterization of a novel *Mycobacterium bovis* secreted antigen containing PGLTS repeats. *Infect Immun.* 63(7):2581-6.
- [243] Gioffré, A. (2009). Characterization of the Apa antigen from *M. avium* subsp. paratuberculosis: a conserved *Mycobacterium* antigen that elicits a strong humoral response in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 132(2-4):199-208. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.06.008.
- [244] Harboe M, et.al Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG *Infect Immun* (1986) 52:293-302
- [245] Hermans, P.W., Abebe, F., Kuteyi, V.I., et al. (1995). Molecular and immunological characterization of the highly conserved antigen 84 from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 63:954–60.
- [246] Cockle, P.J, et.al. (2002). Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 12, pp. 6996–7003.
- [247] Sidders, B., et.al. (2008). Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Immun.* vol. 76, no. 9, pp. 3932–9.

-
- [248] Jones, G.J., et.al. (2011). Immune responses to the enduring hypoxic response antigen Rv0188 are preferentially detected in *Mycobacterium bovis* infected cattle with low pathology. *PLoS One*, vol. 6, no. 6, e21371, doi:10.1371.
- [249] Gideon, H.P., et.al. (2012). Bioinformatic and empirical analysis of novel hypoxia-inducible targets of the human antituberculosis T cell response”, *Journal of Immunology*, vol. 189, no. 12, pp. 5867–76.
- [250] Vordermeier, H.M., et.al. (2012). Conserved immune recognition hierarchy of mycobacterial PE/PPE proteins during infection in natural hosts. *PLoS One*, 7:e40890. doi:10.1371/journal.pone.0040890, 2012.
- [251] Pollock, J.M. et.al. (2003). Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle”, *Journal of Clin Microbiology*, vol. 41, no.5, pp. 1856–60.
- [252] Cockle, P.J., et.al. (2006). Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin and Vaccine Immunology*, vol. 13, no. 10, pp. 1119–24.
- [253] Lightbody, K.L., et.al. (2008). Molecular Features governing the stability and specificity of functional complex formation by *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10/ESAT-6 family proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 25, pp. 17681-90.
- [254] Buddle, B.M., Parlane, N.A., Keen, D.L. (1999). Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6 (1), 1–5.
- [256] Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8 (3), 571–578.)
- [257] Aagaard, C., et.al. (2006). Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 12, pp. 4326–35.
- [258] Vordermeier, H.M., et.al. (1999). Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle.

-
- Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 6, no. 5, pp. 675–82.
- [260] Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in sigK Danielle Charlet,¹ Serge Mostowy,² David Alexander,² Louis Sit,³ Harald G. Wiker⁴ and Marcel A. Behr¹, *Molecular Microbiology* (2005) 56(5), 1302–1313
- [261] Borsuk, S., Newcombe, J., Mendum, T.A., Dellagostin, O.A., McFadden, J. (2009). Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. *Tuberculosis (Edinb)*. 89(6):423-30. doi: 10.1016/j.tube.2009.07.003.
- [262] Amadori, M., Tagliabue, S., Lauzi, S., Finazzi, G., Lombardi, G., Teló, P., Pacciarini, L., Bonizzi, L. (2002). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the avium/intracellulare group. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 49(2):89-96.
- [263] Casal, C., Bezos, J, Díez-Guerrier, A.J. et.al. (2012). Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Preventive Vet Med* 105 149– 154.
- [264] Mon, M.L. Moyano, R.D., Viale, M.N., Colombatti Olivieri, M.A., Santangelo M.P., Singh M, Duran, R., Romano, M.I. (2014). Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *Bio Res Int*. 2014;2014:140829. doi: 10.1155/2014/140829.
- [265] Whelan, A.O., et.al. (2010). Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals”, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 9, pp. 3176–81.
- [266] tesis de Traversa MC
- [267] Whelan, C., Shuralev, E., O’Keeffe, G., Hyland, P., Kwok, H.F., Snoddy, P., O’Brien, A. (2008). Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol*. 15(12):1834-8. doi: 10.1128/CVI.00238-08.
- [268] Waters, W.R., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M. (2011). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of

-
- bovine tuberculosis in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 18(11):1882-8. doi: 10.1128/CVI.05343-11.
- [269] Pollock, J.M., et.al. (2001). Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens”, *Tuberculosis*, vol. 81, no. 1-2, pp. 65-9.
- [270] Stabel, J.R. (2000). Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* 61:754–60.
- [271] Coussens, P.M. (2001). *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* 2:141–61.
- [272] Coussens, P.M. et.al. (2004). Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*:evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern.*Infect. Immun.* 72:1409–22.
- [273] de Almeida, D.E., et.al. (2008). Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*125:234–45.
- [274] Waters WR, et.al. “Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection of calves”, *Infection and immunity*, vol.71, no.9, pp. 5130-5138, 2003.
- [275] Estes, D.M., Closser, N.M., Allen, G.K. (1994). IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. *Cell. Immunol.* 154:287–95.
- [276] Estes, D.M., Brown, W.C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90:1–10.
- [277] S. Schillinger, S., Bridger, P., Bulun, H., Fischer, M., Akineden, Ö., Seeger, M. Bülte, C. Menge and R. Bauerfeind. (2013). Flow Cytometric Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Specific Antibodies in Experimentally Infected and Naturally Exposed Calves. *Clin. Vaccine Immunol.* 20(9):1457. DOI: 10.1128/CVI.00295-13.
- [278] Koets, A.P. (2001). Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect Immun.* 69(3):1492-8.

-
- [279] White, W.B. (1994). Comparison of cellular and extracellular proteins expressed by various isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* and other mycobacterial species. *Am J Vet Res.* 55(10):1399-405.
- [280] Gumber and Whittington. (2009). Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to heat. *Vet Microbiol.* 136(1-2):82-90.
- [281] Bannantine, J.P., et.al. (2002). Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol.* 40(4):1303-10.
- [282] Paustian, M.L., et.al. (2004). Application of the genome sequence to address concerns that *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* might be a foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis.* Spring;1(1):3-15. Review.
- [283] Bannantine, J.P., et.al. (2003). Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol.* 3:10.
- [284] Gumber, S., et.al. (2009). Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol.* 133(4):344-57.
- [285] Gumber S, et.al. Evaluation of the immunogenicity of recombinant stress-associated proteins during *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection: Implications for pathogenesis and diagnosis. *Vet Microbiol.* 2009 Jun 12;137(3-4)
- [286] Gasteiner, J., et.al. (2000). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle in Austria, diagnosis with culture, PCR and ELISA. *Vet. Microbiol.* 77:339-49.
- [287] Whittington, R. J., et.al. (2000). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol.* 38:2550-6.
- [288] Shin, S.J, et.al. (2008). Diagnosis of bovine *paratuberculosis* by a novel enzyme-linked immunosorbent assay based on early secreted antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*”, *Clinical and Vaccine Immunology*, vol.15, no.8, pp.1277-81,

- [289] Leroy, B., et.al. (2007). Antigen discovery: a postgenomic approach to paratuberculosis diagnosis. *Proteomics*, vol.7, no.7, pp.1164-76,
- [290] Mon, ML. (2012). *Search for Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Antigens for the Diagnosis of Paratuberculosis.* *Veterinary Medicine International*. 2012:860362. doi: 10.1155/2012/860362. Epub 2012 Jun 24.