



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Identificación y Caracterización de antígenos de**  
***M. avium* subsp. *paratuberculosis***

Trabajo de Tesis presentado para optar por el grado de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires

**Autor: Lic. Andrea Karina Gioffré**

**Director: María Isabel Romano**

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

2007

## **Identificación y Caracterización de antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

La paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne es una enfermedad endémica en nuestro país que afecta a los rodeos ocasionando importantes pérdidas económicas. El agente etiológico de esta enfermedad es *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Las técnicas diagnósticas actualmente disponibles no son adecuadas por la gran inespecificidad que presentan, consecuencia de las reacciones cruzadas con las micobacterias ambientales relacionadas. En este trabajo, nos propusimos la identificación y el estudio de nuevos antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a partir de la construcción de una genoteca de expresión en el vector  $\lambda$ -ZapII (Stratagene). El análisis serológico de esta genoteca, nos permitió identificar distintos antígenos candidatos, entre ellos BfrA, Hsp70, GrpE y Lpp34. Este último, representó una secuencia novedosa, específica del complejo *M. avium*, al cual pertenece la bacteria. La finalización de la secuenciación del genoma de esta bacteria, permitió estudiar la presencia de distintos antígenos ortólogos, descritos con anterioridad en los integrantes del complejo *M. tuberculosis*: LprG y el antígeno 45/47 kDa (ModD). Adicionalmente fueron estudiadas otras proteínas como LppE y LppJ (complejo *M. tuberculosis*) y una proteína exclusiva de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, MAP860. Se expresaron las formas recombinantes de las mismas y se evaluó la respuesta humoral y celular. Se desarrolló un ELISA utilizando el antígeno recombinante ModD de MPTB. A partir de este ensayo, se pudo concluir que este antígeno constituye un buen marcador de los rodeos infectados. Este ensayo permitió detectar con la misma sensibilidad las inmunoglobulinas específicas presentes en leche. De esta manera, se puede considerar a este tipo de muestras como una alternativa al diagnóstico serológico en los tambos. Se realizó un análisis de los componentes en los Derivados Proteicos Purificados (PPDs) empleados en el diagnóstico celular de tuberculosis y paratuberculosis (PPDb y PPDa), pudiéndose caracterizar al antígeno ModD como un componente dominante en PPDa. La caracterización de la respuesta celular del antígeno Map860, exclusivo de la subespecie *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y de una PPD producida a partir de la misma micobacteria, permitió conocer la importancia de trabajar con una PPD específica y no con una derivada de una micobacteria relacionada, tal como se implementa en la actualidad. Los resultados de los estudios de la respuesta celular frente a los distintos antígenos demuestran que la elección de los candidatos adecuados podrían lograr la misma sensibilidad que el antígeno de referencia PPDa, mejorando la especificidad.

Este estudio constituye la primer evaluación de antígenos recombinantes para el diagnóstico de la paratuberculosis bovina en nuestro país.

**Palabras clave:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, paratuberculosis bovina, enfermedad de Johne, antígenos recombinantes, genoteca de expresión, diagnóstico

## **Identification and characterization of antigens from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

Paratuberculosis or Johne's disease is considered an endemic ruminant illness in our country that causes important economical losses. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB) is the ethiological agent. The current available techniques for the diagnosis have a low specificity, due to the presence of certain related bacteria in the environment. In the present work, we constructed and evaluated an expression library in  $\lambda$ -ZapII vector in order to find novel antigens from *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. We identified distinct potential antigens, such as BfrA, Hsp70, GrpE and Lpp34. The latter antigen was identified as one exclusive for the *M. avium* complex. The genomic sequence from the bacterium allowed us to study the presence of the orthologous, previously evaluated for the *M. tuberculosis* complex: LprG ant 45/47 kDa (ModD). Additionally, we studied the antigenicity of LppE, LppJ (from *M. tuberculosis* complex), and MAP860, a protein specie-specific for MPTB. The recombinant proteins were expressed and the humoral, and cellular response in infected cattle were evaluated. We performed an ELISA using ModD antigen. This assay constituted a good marker for the detection of infected dairy herds and was more specific than the conventional ELISA in tuberculosis infected cattle. Milk samples were evaluated with the recombinant ELISA, allowing the detection of positive animals. Thus, this kind of samples are suitable to perform a serological screening in dairy cattle. We studied the composition of the antigenic mixtures, Purified Protein Derivative (PPDa and PPDb), conventionally used for the diagnosis of tuberculosis and paratuberculosis infected cattle. The antigen ModD is dominant in the PPDa. This work demonstrated that the appropriate combination of antigen could reach the same level of sensitivity of the reference antigen, PPDa, with an increment in the specificity.

This study constitutes the first evaluation of recombinant MPTB antigens for diagnosis purposes in Argentina.

**Key words:** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, bovine paratuberculosis, Johne's disease, recombinant antigen, expression library, diagnosis.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis fue posible gracias a la valiosa colaboración de:

Dr. Fernando Paolicchi y Claudia Morsella: EEA-INTA-Balcarce

Med. Vet. Sergio Garbaccio y Med. Vet. Fernando Delgado: Instituto de Patobiología, INTA-Castelar

Lic. Gabriela Echeverría y Dra. Alicia I. Arese: IB- INTA-Castelar

Agradecemos especialmente la colaboración de los productores y Veterinarios de los establecimientos que nos abrieron sus puertas y la excelente asistencia técnica de Valeria Rocha.

Al sistema Científico Nacional: CONICET

Quiero agradecer especialmente a todo el grupo de Micobacterias por acompañarme todos estos años. A mis Directores, Angel Cataldi y Marisa Romano. A mis queridos compañeros, amigos y hermanos de “pipeta” Karina Caimi y Martín Zumárraga, porque crecimos juntos, por su inmensa disposición y colaboración.

A todas las personas que estuvieron atentas a este proceso, con su acompañamiento, con su palabra, con su paciencia. A las queridas Brucelitas, y los hemoparásitos...por tanto compartido. A todos los que colaboraron con la lectura, corrección, sugerencias: Ana Distéfano, Paz Santángelo, Kari, Fabiana Bigi, Cecilia Horny. A los responsables de bioterio y preparado de material: Silvio D., Jorge L., Isa, Majo, Fabián. A mi otra familia de la UNSAM, a la Dra. D.Tasat por su apoyo, comprensión, su palabra y su particular manera de ver la vida. Patricia Mandalunis por su oreja siempre dispuesta. A las chicas, Pao y Moni: Gracias por tanta atención. Javi y Leo: por estar y comprender.

A mi familia, por intentar comprender. A Sandra, por estar con nosotros.

A todos los que me acompañaron en este año tan particular, con tanto afecto y atención y que me sostuvieron para continuar el camino. A mi querida amiga Stella Moreno y a mi tía Alba Gioffré, por sus enseñanzas. Estoy segura que están siendo testigos de este momento.

A mi querido Roberto De Ruyver, eternamente agradecida por tu infinito soporte. Por las incontables horas a mi lado, acompañando esta última etapa del camino. Porque tuviste una mirada atenta y compasiva. Creo que no hay nada que pueda hacer para compensar tamaño esfuerzo y empeño para ESTAR siempre presente. Por eso siento, que este logro es de los dos.

*Andrea*

*“Felices aquellos que llevan consigo un ideal, un Dios, un ideal de belleza y que a él obedecen, el ideal del Arte, el ideal de la Ciencia, el ideal de la Patria, el ideal de las virtudes de los Evangelios”.*

Louis Pasteur

(1822-1895)

*A mis padres*

## INDICE

### 1. INTRODUCCION

1.1. La paratuberculosis bovina: Descripción histórica de la enfermedad.	1
1.2. Características de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	3
1.2.1. Características microscópicas y macroscópicas de la bacteria	3
1.2.2. Clasificación	3
1.2.3. Estructura de la pared celular	7
1.2.4. El genoma de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	9
1.2.5. Antígenos descriptos de la bacteria	12
1.3. La enfermedad de Johne o paratuberculosis	13
1.3.1. Paratuberculosis: Patología e Inmunología	15
1.4. Diagnóstico de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	19
1.4.1. Ensayos basados en la detección de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	20
1.4.1.1. Diferenciación de los aislamientos de MPTB	23
1.4.2. Ensayos basados en la Detección de la Respuesta Inmune	23
1.4.3. Estudios para la búsqueda y caracterización de nuevos antígenos candidatos para el mejoramiento diagnóstico	28
1.5. Situación epidemiológica de la paratuberculosis en el mundo y en Argentina.	30
1.5.1. Estrategias para el control de la paratuberculosis.	32
1.5.1. La situación actual en el control de la paratuberculosis en nuestro país.	34
1.6. El rol zoonótico de MPTB: Un debate abierto	35

### 2. OBJETIVOS

### 3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Descripción general del vector $\lambda$ -ZapII utilizado para la construcción de la genoteca de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	40
3.2. Construcción de la genoteca de expresión	41
3.2.1. Clonado en el sistema $\lambda$ ZapII	42
3.2.2. Evaluación inmunológica de la genoteca	44
3.2.3. Escisión automática <i>in vivo</i> del plásmido pBluescript a partir del vector $\lambda$ - Zap II	46
3.2.4. Análisis del tamaño promedio de inserto representados en la genoteca	46
3.2.5. Evaluación de la expresión del producto de fusión en <i>E. coli</i> XL-Blue	47
3.3. Secuenciación	47
3.4. Extracción de ADN micobacteriano	47
3.5. Amplificación génica por PCR	48
3.6. Clonado de genes	49
3.7. Transformación bacteriana	50
3.8. Minipreparaciones de ADN plasmídico	51
3.9. Expresión de proteínas recombinantes	51
3.9.1. Descripción del sistema de expresión pRSET y células empleadas para la expresión heteróloga	51

<b>3.9.2.</b> Evaluación de las condiciones óptimas de expresión de las proteínas recombinantes	52
<b>3.9.3.</b> Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales	53
<b>3.10.</b> Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la separación de proteínas	54
<b>3.11.</b> Detección de proteínas por tinción	54
<b>3.12.</b> Detección inmunológica de proteínas	54
<b>3.13.</b> Cuantificación de proteínas	55
<b>3.14.</b> Técnicas de hibridación genómica: <i>Southern blot</i> y RFLP	55
<b>3.15.</b> Evaluación de proteínas micobacterianas	56
<b>3.15.1.</b> Obtención de proteínas del extracto celular y o del sobrenadante de cultivo.	56
<b>3.15.2.</b> Fraccionamiento subcelular de proteínas de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	56
<b>3.15.3.</b> Separación de proteínas de membrana de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> utilizando Tritón X-114	57
<b>3.16.</b> Ensayo de unión a Concanavalina A (ConA)	58
<b>3.17.</b> Obtención de suero hiperinmune en ratón	58
<b>3.18.</b> Evaluación de la Respuesta inmunológica frente a los antígenos recombinantes.	58
<b>3.18.1.</b> Ensayo de $\gamma$ IFN bovino	58
<b>3.18.2.</b> <i>Immunoblotting</i> : MAPIA	59
<b>3.18.3.</b> Enzimo-inmuno ensayo	60
<b>3.19.</b> Técnicas histológicas	61
<b>3.19.1.</b> Inmunohistoquímica	61
<b>3.19.2.</b> Hematoxilina-eosina	61
<b>3.20.</b> Elaboración de un Derivado Proteico Purificado de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (PPDj).	61
<b>3.21.</b> Condiciones para el cultivo de micobacterias utilizadas en el presente trabajo	62
<b>3.22.</b> Análisis estadísticos	62

#### 4. RESULTADOS

<b>4.1.</b> Identificación y caracterización de antígenos a partir de la construcción y análisis de una genoteca de expresión	63
<b>4.1.1.</b> Aislamiento de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> seleccionado y extracción de ADN genómico.	63
<b>4.1.2.</b> Construcción y evaluación de la genoteca	64
<b>4.1.3.</b> Análisis de las secuencias codificadas por los clones pBluescript recombinantes. Clonado, expresión y evaluación de la respuesta humoral del antígeno seleccionado.	71
<b>4.1.3.1.</b> Análisis del clon pBL-1: BfrA	71
<b>4.1.3.2.</b> Análisis del clon pBL-20: PknB	78
<b>4.1.3.3.</b> Análisis del clon pBL-21: Hsp70 (DnaK) y GrpE	80
<b>4.1.3.4.</b> Análisis del clon pBL-24: Lpp34	91
<b>4.2.</b> Evaluación de la presencia de proteínas ortólogas: Búsqueda de secuencias antigénicas del complejo <i>M. tuberculosis</i>	109
<b>4.2.1.</b> Estudio del antígeno P27 (LprG) en <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> .	107
<b>4.2.2.</b> Estudio del antígeno de 45/47 kDa en <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	116

<b>4.3. Evaluación de la Respuesta celular en tambos con paratuberculosis.</b>	<b>129</b>
<b>4.3.1. Antecedentes de los tambos estudiados.</b>	<b>129</b>
<b>4.3.2. Toma de muestras y procesamiento.</b>	<b>131</b>
<b>4.3.3. Prueba de estimulación de la liberación de <math>\gamma</math>-IFN.</b>	<b>132</b>
<b>4.3.3.1. Derivados Proteicos Purificados (PPDs)</b>	<b>134</b>
<b>4.3.3.2. Antígenos recombinantes seleccionados a partir del análisis de la genoteca <math>\lambda</math>-Zap:: <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>: Lpp34, BfrA, PknB, GrpE y Hsp70</b>	<b>136</b>
<b>4.3.3.3. Antígenos recombinantes de MPTB, previamente descritos en la bibliografía: Map860</b>	<b>139</b>
<b>4.3.3.4. Antígenos homólogos descritos en el complejo <i>M. tuberculosis</i>: LprG, ModD, LppE y LppJ, Ag85A</b>	<b>140</b>
<b>4.3.3.5. Análisis comparativo del ensayo de liberación de <math>\gamma</math>IFN basado en los distintos antígenos.</b>	<b>143</b>
<b>4.3.3.6. Evaluación de combinaciones de antígenos recombinantes</b>	<b>148</b>
<b>4.3.3.7. Análisis de la respuesta celular frente a una PPD producida a partir de un aislamiento de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>.</b>	<b>150</b>
<b>4.4. Análisis de los Derivados Proteicos Purificados (PPDs)</b>	<b>153</b>
<b>4.4.1. Estudio comparativo de la respuesta humoral generada contra PPDa y PPDb en ratones BALB/c</b>	<b>153</b>
<b>4.4.2. Evaluación directa de antígenos presentes en las PPDs a partir de antisueros anti-antígeno específicos</b>	<b>156</b>
<b>4.5. Selección “a campo” de un antígeno adecuado para evaluar la respuesta humoral: Desarrollo del ELISA-ModD recombinante</b>	<b>161</b>
<b>4.5.1. Evaluación por ELISA del reconocimiento de ModD por bovinos paratuberculosos</b>	<b>165</b>
<b>4.5.2. Evaluación por ELISA del reconocimiento de ModD por bovinos tuberculosos</b>	<b>166</b>
<b>4.5.3. Detección de IgG anti-ModD en leche por ELISA</b>	<b>168</b>
<b>5. DISCUSION</b>	<b>170</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>192</b>
<b>7- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>194</b>



## 1- INTRODUCCION

### 1.1- La paratuberculosis bovina: Descripción histórica de la enfermedad

En el año 1826, se describió una enfermedad intestinal crónica y debilitante en el ganado. Las características de esta enfermedad diferían en parte, de la tuberculosis en humanos y animales, descritas por Robert Koch en el año 1882. No fue sino hasta el año 1894 que gracias a dos investigadores, Johne y Frothingham, esta patología fue reconocida como una enfermedad infecciosa con una etiología única.

La historia reporta la compra de un animal con dificultades tanto en la producción de leche como en la ganancia de peso, en la región de Oldenburg, Alemania (Chiodini, 1993a). Un veterinario local, Herr Frederick Harmes, examinó al animal observando diarrea y pérdida de peso, por lo cual sospechó de una tuberculosis intestinal. Sin embargo, cuando se le realizó la prueba de tuberculina, el animal resultó negativo. El animal murió en la primavera siguiente y el Dr. Harmes envió a la Unidad de Patología Veterinaria de Dresden, los intestinos, el estómago y otros órganos para su examinación. Los tejidos fueron analizados por el Dr. H.A. Johne y el Dr. L. Frothingham, un científico visitante de la Unidad de Patología de Boston, Massachusetts. Observaron un engrosamiento de la mucosa e hiperplasia de los nódulos linfáticos mesentéricos. En la examinación histológica, encontraron que la pared intestinal estaba infiltrada con leucocitos, células epitelioides y células gigantes ocasionales. Empleando la tinción de ácido-alcohol resistencia, conocida también como tinción de *Ziehl-Neelsen*, observaron abundante cantidad de bacterias ácido-alcohol resistentes. Sin embargo, pese a que la bacteria presentaba una gran similitud con el agente causal de la tuberculosis, cuando una muestra tomada del tejido infectado conteniendo la bacteria fue inyectada en un cobayo, no reprodujo la enfermedad. Como consecuencia de estas observaciones, los investigadores concluyeron que la enfermedad observada en el animal, podía ser consecuencia de la infección con el agente que causa micobacteriosis en aves (*Mycobacterium avium*). En reconocimiento de las similitudes con la tuberculosis intestinal en el bovino (causada por *Mycobacterium bovis*), proponen para esta enfermedad el nombre de “enteritis pseudotuberculosa”. En los comienzos del 1900, la enteritis pseudotuberculosa era reconocida como una enfermedad nueva pero que estaba distribuída ampliamente en los rodeos. Los científicos propusieron una variedad de nombres alternativos tales como “paratuberculosis” y “enteritis hipertrófica”. En 1906, en un reporte anual del *Royal Veterinary College*, J. McFadyean utilizó por primera vez el término “enfermedad de Johne”. A partir de entonces, la mayoría de las publicaciones se han referido a esta enfermedad como enfermedad de Johne o paratuberculosis.

En Dinamarca, en los años 1910 O. Bang concluyó que los animales con enfermedad de Johne respondían levemente o no reaccionaban frente a la inyección intradérmica de antígenos

preparados a partir de *M. bovis* (mezcla conocida como tuberculina), pero respondían positivamente a la tuberculina aviar (antígenos preparados a partir de *M. avium*). De esta manera Bang, sugirió que la tuberculina aviar debía ser implementada como ensayo diagnóstico en animales. Esto muestra, que pese a no haber aislado hasta ese momento la bacteria causante de la enfermedad de Johne, los científicos tenían evidencias que estaba relacionada a la bacteria causante de micobacteriosis en aves. La diferencia radicaba en que el organismo que causaba la micobacteriosis aviar podía ser cultivado en el laboratorio, mientras que los ensayos para el aislamiento del agente causal de la enfermedad de Johne, eran infructuosos. Las observaciones del científico británico F. Twort, condujeron al aislamiento del agente etiológico de la enfermedad de Johne. Este investigador, observó en cultivos viejos que se disponía a descartar, pequeñas colonias “satélites” creciendo en torno a colonias de mayor tamaño. Estas últimas, eran contaminantes comúnmente presentes, como el bacilo *Mycobacterium phlei*. Twort sospechó que esta bacteria podría proveer de algún nutriente esencial, por lo cual incorporó en el medio una preparación de *M. phlei*, tratada previamente con calor. Este nuevo medio de cultivo, permitió el desarrollo de bacterias ácido-alcohol-resistentes. Twort nombró a este bacilo *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudotuberculosis bovis Johne*. De esta manera, Twort logró cumplimentar con los postulados de Koch, cultivando a la bacteria en el laboratorio y reproduciendo experimentalmente la enfermedad en bovinos infectados (Harris y Barletta, 2001). En 1912 H. Holth, también reportó el aislamiento del agente etiológico de la enfermedad de Johne y llamó al organismo “el bacilo de la paratuberculosis”.

Luego del aislamiento de la bacteria, comenzó la etapa de desarrollo de pruebas diagnósticas. Se empleó una mezcla antigénica de la bacteria para la intra-dermo-reacción, como se realizaba hasta el momento con la tuberculosis, empleándose esta mezcla para los ensayos de detección de anticuerpos, fijación de complemento y técnicas de aglutinación. Las décadas siguientes, fueron dedicadas a la evaluación de éstas y otras técnicas diagnósticas y al mejoramiento de los métodos para el cultivo *in vitro* de la bacteria.

La denominación del bacilo en la actualidad, evolucionó a *M. paratuberculosis* y más recientemente, en base a trabajos de taxonomía numérica, se ha propuesto el nombre *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Thorel *et al.*, 1990).

## 1.2. Características de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

### 1.2.1. Características microscópicas y macroscópicas de la bacteria

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB) es el agente etiológico de una enteritis severa en rumiantes, conocida como enfermedad de Johne o paratuberculosis (PTB). Es una bacteria ácido-alcohol resistente. Cuando se la cultiva en medios artificiales como el medio de Herrold-yema de huevo, Watson-Reid o Löwenstein-Jensen, forma colonias pequeñas (1-2 mm), generalmente no pigmentadas y de margen entero. Las colonias rugosas son raras. Entre las micobacterias cultivables, MPTB es la bacteria de menor velocidad de crecimiento, dado que usualmente, el cultivo primario requiere entre 3-4 meses. Un patrón subespecie-específico es el crecimiento dependiente de micobactina, un componente de la pared bacteriana, quelante de hierro, producido por la mayoría de las micobacterias. Bajo el microscopio, las células tienen forma bacilar de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud y se presentan típicamente en grupos de hasta cientos de bacterias (*clumps*) (Figura 1).



**Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se observan las bacterias de morfología bacilar (1-2  $\mu\text{m}$ ) formando *clumps* o *cuerdas*. Fuente: Universidad de Wisconsin.

### 1.2.2. Clasificación

Esta bacteria pertenece al denominado complejo *Mycobacterium avium* (MAC), clasificado dentro del género *Mycobacterium*.

#### **El género *Mycobacterium***

Este género comprende un número de bacilos aeróbicos, ácido-alcohol resistentes, y es el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae*, dentro del orden *Actinomycetales*. Clasificados dentro de este orden, se encuentran también las familias *Actinomycetaceae*, *Dermatophilaceae*, *Nocardiaceae* y *Streptomycetaceae*. Las micobacterias son bacilos cortos, aerobios, inmóviles, no formadores de esporas, no capsulados, y no flagelados (Kantor, 1988). La presencia de una pared celular compleja, es la propiedad más distintiva de este género.

Mediante la coloración de *Ziehl-Neelsen*, las bacterias se tiñen con dificultad con fucsina, pero una vez que toman el colorante, resisten la decoloración con alcohol ácido, y es por esta razón que se los denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (Zinsser *et al.*, 1998).

Existen en la actualidad cerca de 100 especies en el género *Mycobacterium*. Reportes recientes indican que el 30 % de los aislamientos micobacterianos de agua, suelo, aire e incluso de pacientes, no pertenece a ninguna de las especies anteriormente descritas, por lo que se supone que el número de especies continuará creciendo (Primm *et al.*, 2004). El género *Mycobacterium* incluye tanto a organismos patógenos como saprófitos. Puede ser dividido en dos grupos en base a su significado clínico. El primer grupo está representado por los patógenos obligados en humanos y animales, los cuales generalmente no se encuentran en el medio ambiente. El segundo grupo, comprende a las micobacterias ambientales oportunistas (no son patógenos obligados). Estas pueden ser descritas como saprófitas, comensales y simbioses. Las micobacterias ambientales incluyen tanto las de crecimiento lento como las de crecimiento rápido. Estas bacterias ambientales son habitantes normales de una amplia variedad de reservorios incluyendo: aguas naturales y de red, suelo, aerosoles, protozoarios, flora, animales y humanos (Primm *et al.*, 2004). La presencia de micobacterias en el sistema de distribución de agua y el ambiente en general se puede explicar por los siguientes factores:

- Resistencia innata al cloro y resistencia a los biocidas. *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae* *Mycobacterium flavescens* y *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* son micobacterias que han sido aisladas del agua potable pública (Whittington *et al.*, 2004).

- Capacidad de formar *biofilm*. Descrito en *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium avium*.

- Capacidad de supervivencia en condiciones de “hambre” celular. *Mycobacterium intracellulare* persiste en agua destilada por un período de 1,4 años.

- Existencia de micobacterias termotolerantes. Descrito en micobacterias del Complejo *M. avium*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium chelonae*.

- Capacidad de sobrevivir y replicar dentro de amebas y otros protozoarios. Reportado en *M. avium*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium marinum*.

Una amplia variedad de características presentes en las micobacterias, contribuye su distribución en el ambiente. Estas bacterias tienen un pH óptimo para el crecimiento, entre 4,5 y 5,5; y su crecimiento es estimulado en suelos ricos en ácidos húmicos y fúlvicos. Un gran número de estas especies han sido recuperadas de aguas y suelos con bajos niveles de oxígeno. Además, estas adaptaciones a condiciones microaeróbicas y acídicas, contribuyen a la virulencia como patógenos intracelulares. Dentro de estas micobacterias ambientales, encontramos a las del complejo *M. avium* (*Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium silvaticum*). Antes de 1980, las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* no eran

consideradas como patógenos comunes al hombre. Sin embargo, se ha demostrado que producen enfermedad en pacientes con deficiencias congénitas en la inmunidad celular, y, por otro lado, el virus de la inmunodeficiencia humana transformó a estas micobacterias ambientales en el principal agente infeccioso en personas con SIDA en los países desarrollados (Danborn y Grange, 1993).

La supervivencia de estas micobacterias en protozoarios, es una ventaja considerable para los bacilos presentes en el agua. Mientras que *Mycobacterium smegmatis*, frecuentemente encontrado en el suelo es efectivamente fagocitado y eliminado, *M. avium*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium marinum*, invaden y replican dentro de *Acanthamoeba*. También se ha descrito que *M. avium* tiene la capacidad de invadir y replicar en *Dictyostelium discoideum*. La complejidad de la pared, rica en lípidos, provee a las micobacterias de una superficie hidrofóbica, que es uno de los principales determinantes en su distribución ambiental. Las micobacterias ambientales, se encuentran en la interfase agua-aire, donde se localizan los compuestos hidrofóbicos (lípidos, hidrocarburos). Adicionalmente, pueden metabolizar estos compuestos, 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* K-12. La hidrofobicidad es un factor que permite la unión de las micobacterias al material particulado. La turbidez del agua, como consecuencia de la presencia de material en suspensión ha sido correlacionado con el número de micobacterias presentes. La bacteria se une a las superficies por simples interacciones hidrofóbicas y pueden ser “pioneras” en la formación de *biofilm*. 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. Algunas micobacterias ambientales causan enfermedades oportunistas en el hombre y animales, las mismas incluyen: *Mycobacterium marinum*, responsable del granuloma de *swimming pool* en el hombre, y los bacilos aislados de de sapos y tortugas, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae*, que ocasionalmente originan una enfermedad pulmonar en el humano, *M. avium*, como se mencionó anteriormente, causante de micobacteriosis en pacientes inmunodeprimidos.

Dentro de las bacterias patógenas de este género podemos encontrar a las micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Existen siete especies de los denominados bacilos tuberculosos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, y la última especie incorporada *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2004). Estas especies y subespecies constituyen el denominado complejo *M. tuberculosis* (van Soolingen *et al.*, 1997). *M. tuberculosis* es el agente etiológico responsable de la tuberculosis en humanos. Aunque *M. bovis* tiene como hospedador principal al bovino, también afecta al ser humano y a un amplio rango de animales domésticos de interés económico como así también animales salvajes. La enfermedad que produce *M. bovis* en el humano es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*.

Las infecciones por *M. bovis* generalmente se transmiten al hombre a través del contacto directo o por consumo de la leche no pasteurizada o bien productos lácteos de animales infectados. *M. africanum* ha sido aislada de humanos y monos de África (MacLeod, 1977; Thoen *et al.*, 1980). *M. microti* causa tuberculosis en un ratón campestre europeo denominado "vole" (Boisvert, 1966), aunque fue aislada recientemente de pacientes inmunocomprometidos (van Soolingen *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1998). *M. canetti*, fue descrita por primera vez en el Instituto Pasteur por George Canetti en 1969 y es una variante lisa muy poco común, que produce tuberculosis (van Soolingen *et al.*, 1997; Pfyffer *et al.*, 1998). *M. pinnipedii* sp. nov, ha sido recientemente caracterizada como una nueva especie dentro del complejo, la cual produce tuberculosis en distintas especies de mamíferos marinos pertenecientes a las costas de Australia, Uruguay y Argentina (Cousins *et al.*, 1993). Distintos estudios apoyan la hipótesis de que dicho bacilo, constituye un nuevo y único taxón dentro del complejo *M. tuberculosis* (Romano *et al.*, 1995; Alito *et al.*, 1999; Zumárraga *et al.*, 1999a; Cousins *et al.*, 2003). Finalmente, *M. bovis* subsp. *caprae*, que fue aislada primeramente en cabras, en España (Aranaz *et al.*, 1999), y luego, en pacientes con tuberculosis en Alemania ha sido elevada a la categoría de especie dentro del complejo (Niemann *et al.*, 2002; Aranaz *et al.*, 2003). Otra de las micobacterias que constituyen una problemática importante para la Salud Pública es *Mycobacterium leprae*, causante de la lepra humana, una micobacteria patógena que todavía hoy no ha podido ser cultivadas *in vitro*, lo que constituye un serio problema en el estudio de dicho patógeno. Sin embargo en los últimos años se ha descubierto que mamíferos pertenecientes al género *Dasyopodidae* (armadillos) no sólo son un excelente modelo animal de estudio de la lepra, dada su facilidad para reproducir la enfermedad, sino que se ha encontrado animales naturalmente infectados en Estados Unidos, México y la zona norte de nuestro país (Zumárraga *et al.*, 2001). La micobacteria patógena, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, es una subespecie de la especie *avium*, es el agente etiológico de la enfermedad de Johne en rumiantes, una enteritis crónica (Harris y Barletta, 2001). Sin embargo, aún no se ha establecido claramente el rol zoonótico de esta micobacteria (McFadden y Fidler, 1996).

### **El complejo *Mycobacterium avium* (MAC)**

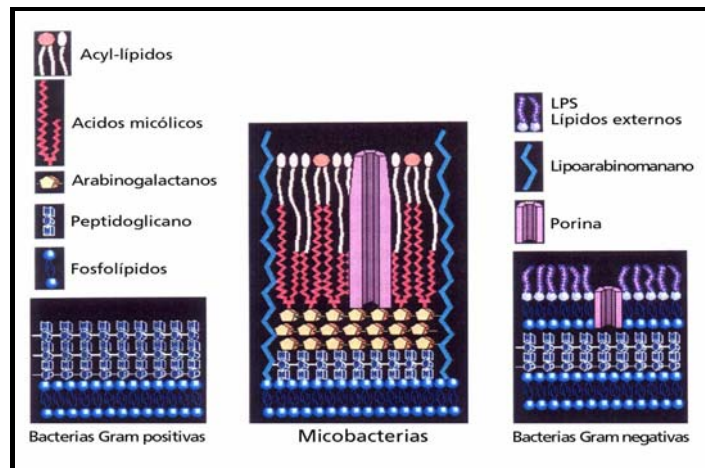
Se propone actualmente que el Complejo *Mycobacterium avium* esta conformado por las especies *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium chimaera*, mientras, que la especie *avium*, abarca a las subespecies: *avium*, *silvaticum*, *hominissuis* y *paratuberculosis* (Mijls *et al.*, 2002, Tortoli *et al.*, 2004). Este complejo está caracterizado por una similitud a nivel nucleotídico superior al 90 %, pese a esto, sus miembros difieren ampliamente en términos de tropismo de hospedador, fenotipo microbiológico y patogenia. Los miembros del complejo *M. avium* (MAC) están asociados con enfermedades en animales y humanos, incluyendo infecciones pulmonares, en nódulos linfáticos, piel, huesos, del tracto digestivo y genitourinario (Motiwala *et al.*, 2006) y se encuentran también, ampliamente distribuidos en el ambiente.

La clasificación de los aislamientos del MAC estuvo basada en pruebas fenotípicas, en las características epidemiológicas, en el análisis del ADN e incluso en el análisis de serotipo. En los 1990s, *M. avium* fue subdividido en tres subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *silvaticum*. La presencia de la secuencia de inserción *IS900* se encuentra específicamente en cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, mientras que las *IS901* e *IS1245*, son marcadores para las cepas de *M. avium* subsp. *avium*. El avance en los estudios moleculares ha replanteado la clasificación de las bacterias componentes de este complejo. El ADNr 16S es una región altamente polimórfica que contiene polimorfismos especie-específicos de gran utilidad para la identificación de especies micobacterianas. El estudio de la región intergénica 16S-23S, demostró ser aún más discriminativa. Este tipo de estudio, demostró diferencias menores en el espaciador ADN 16S-23S de las especies *M. intracellulare* y *M. avium*. Un trabajo realizado en distintos aislamientos, basado en el estudio de RFLP *IS1245*, ADN ribosomal 16S, y en la secuencia intergénica 16S-23S, junto al estudio de características fenotípicas como el rango de temperatura de crecimiento, reveló que los aislamientos de *M. avium* provenientes de aves, constituyen un taxón distinto dentro del complejo, separándolo de los aislamientos de *M. avium* provenientes de humanos y cerdos, para este último grupo de bacterias, los autores propusieron la designación: *M. avium* subsp. *hominissuis* (Mijs *et al.*, 2002). Restringiendo de esta manera a la subespecie *avium*, solamente para los aislamientos de origen aviar. De acuerdo al análisis de los resultados de RFLP-*IS1245*, los autores encontraron una mayor relación entre las cepas de *M. silvaticum* con la variante aviar de *M. avium*. Una de las características fenotípicas más explotada para caracterizar a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, ha sido la dependencia de micobactina. Sin embargo, el aislamiento primario de *M. avium* subsp. *silvaticum* también requiere de la presencia de este compuesto. Los datos moleculares derivados del análisis de la secuencia del gen *hsp65*, agruparon finalmente a estas micobacterias dentro de la subespecie *avium* (Turenne *et al.*, 2006). Recientemente, se diferenció un grupo de cepas aisladas de humanos de la especie *intracellulare*, proponiéndose una nueva especie, *M. chimaera* (Tortoli *et al.*, 2004).

### 1.2.3. Estructura de la pared celular

Las micobacterias poseen una pared celular compuesta de cuatro capas que cubren la membrana celular. La capa interna de la pared celular, esta constituida por péptidoglicanos los cuales están relacionados a los presentes en otras bacterias (Figura 2). Los péptidoglicanos están unidos covalentemente al arabino-galactano, polisacárido de arabinosa y galactosa, que constituyen la segunda capa. Las cadenas de arabino-galactano, están esterificadas a una tercer capa compuesta por ácidos micólicos. Estos ácidos grasos están constituidos por dos largas cadenas que difieren en su longitud, una contiene 50 átomos de carbono y la otra alrededor de 30. El ácido micólico es el principal compuesto de la pared celular y es el responsable de la característica ácido-alcohol resistencia que se observa durante la tinción con colorantes arilmetanos, como la fucsina básica,

esto último constituye la base de la coloración de *Ziehl-Neelsen*, método que se emplea para identificar las micobacterias al microscopio. Entre estos ácidos micólicos se encuentran sulfolípidos y dimicolato de trealosa, que junto con el ácido micólico determinan la formación del denominado “factor cuerda” durante el crecimiento *in vitro*. La cuarta capa de la pared celular contiene varios lípidos y compuestos relacionados incluyendo fenolglucolípidos, glicolípidos y péptidos-glicolípidos llamados micósidos, los cuales recuerdan los antígenos O de los bacilos gram-negativos.



**Figura 2. Esquematización de la pared micobacteriana y comparación con las paredes bacterianas de otros grupos.** Se muestra la complejidad de la pared micobacteriana: la capa de arabinogalactanos por fuera de la capa de peptidoglicanos, una tercer capa de ácidos micólicos y una cuarta capa, compuesta por distintos lípidos modificados como fenolglucolípidos, glicolípidos y péptidos- glicolípidos (micósidos).

La resistencia del bacilo al daño celular, a la deshidratación y a ciertos antibióticos está determinada en gran medida por la estructura de su pared celular, dado que la misma contiene una gran cantidad de glicolípidos, lipoglicanos y poliketidos como el fenolftiocerol, que se acompleja con el ácido micoserósico para conformar el denominado fenolftiocerol-dimicoserosato (PDIM) (Daffé y Draper, 1998). Dichos complejos, forman una capa hidrofóbica y es la responsable de la barrera de permeabilidad hacia los compuestos hidrofílicos.

Otro compuesto importante de la pared es el lipoarabinomanano (LAM). La porción lipídica se ubica en la membrana celular mientras que los polisacáridos se extienden hacia la superficie de la pared. Probablemente los LAM, cumplan el rol de anclar la pared a la membrana plasmática. Este compuesto, es considerado un importante inmunomodulador debido a su amplio rango de efectos biológicos: es un poderoso estimulador del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) en macrófagos humanos y murinos, que resulta en la estimulación de la síntesis de citoquinas tales como GM-CSF, IL-1, IL-6 y IL-8. Pero también se ha observado que tiene un efecto antiprotectivo: es también un potente inhibidor de la activación de macrófagos mediada por  $\gamma$ -Interferón ( $\gamma$ IFN), un efecto inhibidor de la presentación de antígenos por las células presentadoras



(Chan *et al.*, 1991) y supresor de la proliferación de células T *in vitro* (Kaplan *et al.*, 1987). El LAM, es también considerado un importante antígeno inductor de respuesta humoral. Las moléculas de manosa del LAM son reconocidas diferencialmente de acuerdo a la especie de micobacteria por los receptores de superficie de las células dendríticas DC-SIGN. La interacción específica de estos receptores y el LAM estaría involucrada en la invasión de células dendríticas por *M. tuberculosis*. Las especies saprofitas de crecimiento rápido tales como: *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* se unen débilmente a DC-SIGN y las micobacterias de crecimiento lento tales como *M. tuberculosis* y el bacilo de la cepa vacunal *M. bovis* Calmette-Guerin (BCG) lo hacen fuertemente (Maeda *et al.*, 2003).

Otros componentes lipídicos de la envoltura celular de las micobacterias, también presentan seroreactividad. Se pueden citar como ejemplo, los glicopeptidolípidos (GLPs) estudiados en *M. avium*, que son altamente inmunogénicos y están localizados en la parte externa de la envoltura celular. Recientemente, se ha descrito un lipopéptido específico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, denominado Para-LP-01, que es un componente principal de la parte externa de la envoltura celular y que fue reconocido específicamente por los sueros de animales paratuberculosos (Eckstein *et al.*, 2006).

La presencia de porinas en la pared micobacteriana, ha sido descrita por Trias *et al.*, (1992), en la pared de *Mycobacterium chelonae*. Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas denominadas OMP (*Outer Membrane Proteins*), que son proteínas que forman un poro en la pared celular, que permite el pasaje de ciertos compuestos hidrofílicos. Se ha descrito la presencia de un gen en *M. tuberculosis*, con homología a la familia de porinas OmpA (Senaratne *et al.*, 1998). Por otra parte, debido a que *M. tuberculosis* es 10 veces más permeable a distintas moléculas, como por ejemplo la cefalosporina o la estreptomina, que *M. chelonae* (Connell y Nikaido, 1994), es probable que existan otro tipo de porinas presentes en la pared de esta última micobacteria, que restringirían el paso de moléculas polares de mayor tamaño al interior de la bacteria.

#### **1.2.4. El genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis***

En un período de 10 años desde de la secuenciación del primer genoma procariota (1995), se pudo disponer de la secuencia completa de cinco micobacterias, *M. tuberculosis* (H37Rv y CDC1551), *M. bovis*, *M. leprae* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Tabla 1). En la actualidad, se dispone en las bases de datos de las secuencias genómicas de otras micobacterias. En muchos de los casos, no está concluida la anotación de los genes. *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, es una mutante de *M. smegmatis*, una micobacteria patógena oportunista, que al ser fácilmente transformable es una herramienta valiosa constituyendo un importante modelo de estudio dentro del género. La secuencia de este genoma se terminó de descifrar en Noviembre de 2006 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>). En el mismo año, se hicieron públicas las secuencias

completas de los genomas de *Mycobacterium avium* 104, una cepa aislada de un paciente con SIDA; *Mycobacterium ulcerans* Agy99, que es el agente etiológico de la úlcera de Buruli; *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, una micobacteria ambiental, capaz de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos, y *Mycobacterium* sp. KMS, una cepa de especie aún no determinada, que tiene la capacidad de degradar pireno. A comienzos de 2007, se hizo pública en las bases de datos, la secuencia de otra cepa, *Mycobacterium* sp. JLS, de especie aún no determinada, también relacionada a la degradación de pireno, y la secuencia completa de la cepa vacunal *M. bovis* BCG (Brosch *et al.*, 2007). El proyecto de secuenciación del genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, fue desarrollado en la Universidad de Minnessota (USA) bajo la dirección de Vivek Kapur y fue finalizado recientemente (Li *et al.*, 2005). La cepa seleccionada fue la K-10, un aislamiento bovino proveniente de un establecimiento ganadero de Wisconsin obtenido por los investigadores *National Animal Disease Center* del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) en la década de 1970.

El genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* consiste en una molécula circular, doble cadena, y su tamaño es de 4.829.781 pb. No se conocen elementos extra-cromosómicos. Los datos derivados del análisis de la secuencia del genoma, indican que codificaría para 4.350 marcos abiertos de lectura, 45 ARN de transferencia y un operón de ARN ribosomal. Las micobacterias, así como otros *Actinomycetales*, con los que están muy relacionadas por pertenecer al mismo orden, como *Nocardia* y *Corynebacterium*, tienen un contenido de nucleótidos guanina-citosina (G+C), que es inusualmente alto entre las bacterias (Tabla 1). El contenido de estos nucleótidos en MPTB, es relativamente constante en todo el genoma, existiendo algunas regiones genómicas pequeñas con un bajo contenido de G+C, correspondiendo a profagos o secuencias que codifican para ARN. Con respecto a la presencia de secuencias de ADN repetitivas (secuencias de inserción, familias multigénicas y genes duplicados *housekeeping*), estas comprenden cerca del 1,5 % del genoma. En MPTB K-10, se identificaron 17 copias de la secuencia *IS900*, 7 copias de *IS1311* y 3 copias de *ISMav2*. En total, fueron descritas 19 secuencias de inserción distintas con 58 copias distribuidas en el genoma. Muchos de estos elementos, son homólogos a los de otras micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. bovis* y *M. marinum*. Sin embargo, el análisis de la secuencia, reveló que existen secuencias repetidas como *IS\_MAP02* (6 copias), *IS\_MAP04* (4 copias) que no presentan homología con las secuencias de otras micobacterias (Li *et al.*, 2005).

Micobacteria (acceso en GenBank)	Tamaño del Genoma	% de G+C	Número de genes posibles	Publicación (año) y sitio público de acceso a la secuencia
<i>M. bovis</i> AF2122/97 (BX248333)	4.345.492 pb	65,63	3.953	Garnier <i>et al.</i> , (2003) <a href="http://genolist.pasteur.fr/BoviList/index.html">http://genolist.pasteur.fr/BoviList/index.html</a>
<i>M. tuberculosis H37Rv</i> (AL123456)	4.411.432 pb	65,61	3.959	Cole <i>et al.</i> , (1998) <a href="http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/index.html">http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/index.html</a>
<i>M. leprae</i> TN (AL450380)	3.268.203 pb	49,50	1.604	<a href="http://genolist.pasteur.fr/Leproma/">http://genolist.pasteur.fr/Leproma/</a>
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 104 (CP000479)	5.475491 pb	68,99	5.313	<a href="http://Tigr.org">http://Tigr.org</a> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes</a>
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10 (AE016958)	4.829.781 pb	69,30	4.398	Li <i>et al.</i> (2005) <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes</a>

**Tabla 1. Análisis comparativo de distintos genomas micobacterianos actualmente disponibles.** La cepa TN de *M. leprae* fue inicialmente aislada de un paciente en Tamil Nadu, India y se replicó en el armadillo de nueve bandas en el Instituto Nacional de Investigación Médica (Londres), se aisló la bacteria del hígado para la obtención del ADN. La cepa MPTB K-10, es un aislamiento clínico bovino proveniente de un animal de Wisconsin y aislado en la década de 1970. La cepa *M. bovis* AF2122/97 es un aislamiento bovino procedente de Inglaterra. *M. tuberculosis* H37Rv fue aislada en 1905 y conserva su patogenicidad, siendo la cepa de referencia más utilizada en la actualidad.

El análisis comparativo de las secuencias genómicas, permitió conocer que mientras *M. tuberculosis* y *M. bovis* comparten cerca de 3.700 genes, solo tienen en común cerca de 2.600 con MPTB. Análisis comparativos por BLAST-p, mostraron que mientras *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y *M. leprae* tienen 26, 414 y 155 proteínas únicas, respectivamente, MPTB, tiene 966 secuencias únicas. El estudio de la secuencia mostró otro aspecto interesante, MPTB tiene un alto número y una alta redundancia de genes relacionados al metabolismo lipídico en comparación con *M. tuberculosis*. Esto indica una potencialidad genética para generar una composición lipídica variable en la envoltura celular. Por otro lado, la bacteria carece de genes como *mmpS6* y *mmpL6* que codifican para proteínas transmembrana. La ausencia de genes que codifican para las proteínas de la familia PE-PGRS, es otra diferencia que puede afectar la estructura de la pared y la morfología de las colonias de MPTB. Otro aspecto llamativo es la presencia de genes regulatorios (235), en mayor proporción que *M. bovis* y *M. tuberculosis* (190). Como *M. avium* subsp. *paratuberculosis* puede sobrevivir en el ambiente, la expansión del repertorio de genes regulatorios podría contribuir a la supervivencia en un amplio rango de condiciones (Marri *et al.*, 2006).

### 1.2.5- Antígenos descriptos de la bacteria

En la Tabla 2, se muestran los antígenos principales descriptos en MPTB.

Antígeno	Peso Molecular	Características principales, localización	Función propuesta o deducida	Rta*	Referencia
HBHA ( <i>Heparin Binding Hemagglutinin Adhesin</i> )	21 kDa (30 kDa la forma recombinante)	Posiblemente en la superficie celular	-diseminación extrapulmonar en <i>M. tuberculosis</i> -citoadherencia <i>in vitro</i>	B	Sechi <i>et al.</i> , 2006
Complejo Ag85 (Familia de Micolil-transferasa)	A, 32 kDa B, 30 kDa C, 32,5 kDa	-Ag85AyB: proteína de unión a fibronectina -Principalmente secretadas	-Biogénesis del factor cuerda (dimicolato de trehalosa) -posible asociación a resistencia térmica	T	Rosseels <i>et al.</i> , 2006 Nackmoon <i>et al.</i> , 2004
Hsp65 (Familia GroEL)		<i>Heat shock protein</i> Antígeno citosólico	Generación de Rta. autoinmune en humanos	B	El-Zaatari <i>et al.</i> , 1994
Hsp70 homólogo a DnaK de <i>E. coli</i>	70 kDa	<i>Heat shock protein</i> Antígeno citosólico	Rol en plegamiento y traslocación de proteínas	T	Stevenson <i>et al.</i> , 1991 Koets <i>et al.</i> , 1999
GroES (antígeno de 10 kDa, Hsp10)	10 kDa	<i>Heat shock protein</i> -antígeno secretado	Promueve plegamiento de proteínas y ensamblado -probable regulador transcripcional -posible asociación a resistencia térmica	T	Cobb y Frothingham, 1999 Nackmoon <i>et al.</i> , 2004
LAM	banda difusa en un rango de 30-50 kDa	Antígeno estructural, polisacárido (puede secretarse al medio en cultivo en crecimiento)	Estructural: Componente de la pared celular	B	Jark <i>et al.</i> , 1997
A36/ TMA (antígeno macromolecular termoestable)	complejo antigénico, Fracción de 20-90kDa	-Polisacáridos, lípidos y proteínas - -Componentes de pared y secretados	La identidad precisa de cada uno de los componentes es desconocida (a excepción del antígeno de 34 kDa).	B/T	De Kesel <i>et al.</i> , 1992
Antígeno de 34 kDa (del Complejo A36,)	34 kDa	Antígeno localizado en la superficie celular	desconocida	B	De Kesel <i>et al.</i> , 1993
SOD (superóxido dismutasa)	23 kDa	-Enzima Mn dependiente -secretada	Protección contra el <i>stress</i> oxidativo	B/T	Xiaofei <i>et al.</i> 2001 Mullerad <i>et al.</i> , 2002
Antígeno A Antígeno D	31 kDa 20 kDa	-antígeno citosólico	-desconocida -bacterioferritina	B	Sugden <i>et al.</i> , 1991
AhpC y AhpD (alkyl hidroperoxidoreductasas C y D)	-45 kDa (dímero) -19 kDa	-20 kDa -19,5 kDa	- Protección contra el <i>stress</i> oxidativo	B/T	Olsen <i>et al.</i> , 2000
Antígeno de 34 kDa	34 kDa	-Antígeno expresado <i>in vivo</i> . -Posiblemente secretado	Serina proteasa hipotética	B	Cameron <i>et al.</i> , 1994
MMP ( <i>Major Membrane Protein</i> )/antígeno de 35 kDa	35 kDa	-expuesto en la superficie celular	-rol en la invasión de células epiteliales bovinas	B	Banasure <i>et al.</i> , 2001 Bannantine <i>et al.</i> , 2003

**Tabla 2. Antígenos descriptos en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.**

“\*” Respuesta inmunológica característica: T, antígeno inductor de la respuesta celular; Rta B, antígeno inductor de la respuesta humoral.

Pese a que la mayoría de los antígenos descritos son de naturaleza proteica, una de las primeras moléculas descritas como antigénicas en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, fue el lipoarabinomanano (LAM). Dicha descripción fue realizada por Annau en 1958, y Yugi *et al.*, en 1966 (Jark *et al.*, 1997) y ha demostrado ser de utilidad para su implementación en ensayos de ELISA, tanto en ovinos como en bovinos (Sugden *et al.*, 1989, Jark *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito la capacidad inmunogénica de un lipopéptido específico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, denominado Para-LP-01, que es un componente principal de la parte externa de la envoltura celular (Eckstein *et al.*, 2005).

La identificación de los componentes inmunogénicos principales de la bacteria es impulsada por el requerimiento de moléculas específicas para el diagnóstico de la infección. Sin embargo, muchos de los antígenos descritos tienen sus respectivos homólogos en otras micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. lepra*. Las proteínas de *stress* térmico de 65 kDa, 10 kDa, 70 kDa, así como el Ag85 y HBHA, son proteínas conservadas en otras especies. GroES (10 kDa) y GroEL (65 kDa) tienen una identidad superior al 90 % con otras micobacterias (El-Zaatari *et al.*, 1994; Cobb y Frothingham, 1999; Stevenson *et al.*, 1991; Sechi *et al.*, 2006; Rosseels *et al.*, 2006). Recientemente, Sechi *et al.* (2006b) describieron un ensayo de vacunas a ADN, utilizando los antígenos 85A y Hsp65, en el cual demuestran la capacidad de estimular una respuesta inmune protectora contra *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en corderos. Otro antígeno fue el descrito por De Kesel *et al.*, (1993). Es uno de los componentes del complejo A36 y lo denominaron por su masa molecular, antígeno de 34 kDa. Esta proteína tiene homología a un antígeno presente en *M. lepra* y se describieron dos epítopes B especie-específicos. Otros antígenos denominados por su masa molecular son, el antígeno de 34 kDa, una serina proteasa hipotética, descrita por Cameron *et al.* (1994) y el antígeno de 35 kDa, del que se describió su rol en la invasión de la línea celular epitelial bovina Madin-Darby, este antígeno también fue previamente descrito en *M. lepra* (Bannantine *et al.*, 2003). En la sección 1.4.3, se amplía esta descripción de antígenos y metodologías de estudio.

### **1.3. La enfermedad de Johne o paratuberculosis**

La enfermedad de Johne o paratuberculosis, es una enfermedad que afecta a rumiantes. Generalmente, se requiere de varios años desde el tiempo de infección (animales de menos de 6 meses de edad) hasta el desarrollo de sintomatología clínica (animales mayores a 2 años de edad). En el bovino (*Bos taurus*), los signos típicos son diarrea acuosa y pérdida de peso progresiva, mientras que en cabras y ovejas, frecuentemente no se observa diarrea. Los resultados de las necropsias realizadas en animales infectados, muestran lesiones típicas compatibles con enteritis crónica en íleon distal de bovinos y ovejas, pudiéndose extender en estos últimos al colon y yeyuno. Las lesiones se pueden distinguir histológicamente, según su extensión, en lesiones leves,

moderadas y marcadas, todas ellas presentan macrófagos que contienen en su interior una cantidad variable de micobacterias. Se ha demostrado, la presencia de la micobacteria en la fracción mononuclear de sangre periférica de ganado infectado, sugiriendo la posibilidad que los macrófagos sean el vehículo de diseminación de la bacteria a partir de los sitios infectados. Los nódulos linfáticos que drenan el íleon, también son considerados sitios de infección secundaria donde las alteraciones patológicas son comúnmente observadas. Sitios terciarios de infección son el hígado, el bazo y nódulos linfáticos distantes del tracto gastrointestinal. Con el progreso de la infección la infiltración inflamatoria se vuelve pronunciada y las células gigantes más numerosas. Este tipo de inflamación en bovinos, difiere de lo observado en las lesiones producidas por la infección por *M. bovis*. La inflamación observada en la paratuberculosis es, en muchos casos difusa y la lesión no está circunscripta por tejido conectivo fibroso. En muchos aspectos, esta lesión se asemeja a la lesión producida por *M. leprae*. Algunas lesiones pueden tener gran cantidad de bacilos. Tales lesiones son conocidas como lepromatosas o multibacilares. Otras lesiones, tienen pocas bacterias y se conocen como paucibacilares o tuberculoideas. En la paratuberculosis bovina, también pueden encontrarse lesiones focales o multifocales, formadas por granulomas bien definidos y diferenciados del resto de las estructuras titulares. Las lesiones focales, son un extremo de la forma tuberculoidea, que corresponde al inicio de la infección o a su forma latente. La paratuberculosis, evidencia un espectro inmunológico e histopatológico amplio, dependiendo de la respuesta del hospedador. En un extremo del espectro se localiza el extremo tuberculoideo, donde el animal ofrece una fuerte respuesta inmune celular con una muy baja respuesta humoral. Al extremo opuesto del espectro, se encuentra la forma lepromatosa asociado con una respuesta celular débil pero con una fuerte respuesta humoral. Los animales en este extremo exhiben los síntomas clínicos más severos. En los estadios terminales de esta infección, usualmente luego de varios años de desarrollo, el intestino está dañado y el animal muestra signos de diarrea y una disminución marcada de peso corporal. En este estadio terminal, la mucosa del intestino, usualmente se encuentra engrosada y los nódulos linfáticos presentan hiperplasia con numerosas células T, B e infiltración de macrófagos y células gigantes.

Whitlock y Buergelt (Yayo Ayee *et al.*, 2001) clasifican a los animales infectados de acuerdo a la severidad de los síntomas clínicos en cuatro estadios:

- 1) Estadio silente: representado por animales jóvenes (terneros o novillos) hasta la edad de 2 años, sin sintomatología clínica de la enfermedad. En este estadio temprano de la infección el animal libera micobacterias al medio. Muchas veces los niveles son indetectables, entonces la micobacteria solo puede ser detectada mediante el cultivo a partir del tejido o a través de la examinación histológica del intestino o nódulos linfáticos. La respuesta celular específica es baja o nula.
- 2) Estadio subclínico: representado por animales adultos sin signos visibles de paratuberculosis. En este estadio, pueden ser detectadas tanto la respuesta humoral como la

respuesta mediada por células dirigida contra la bacteria, predominando esta última. Sólo entre el 15-25 % de los casos son detectados por el cultivo fecal.

- 3) Paratuberculosis clínica: transcurridas varias semanas desde el comienzo de la sintomatología, los animales pierden peso y sufren diarrea intermitente. Algunos animales pueden recuperar el estadio 2), mientras que la mayoría progresa al estadio 4) con diarrea persistente. El cultivo fecal y la evaluación serológica de estos animales son positivas.
- 4) Estadio avanzado de paratuberculosis clínica: los animales presentan edema submandibular, caquexia y diarrea persistente. La mayoría de estos animales son inmediatamente faenados o mueren por deshidratación y caquexia

### **1.3.1. Paratuberculosis: Patología e Inmunología**

El avance en el estudio de la biología y la patogénesis de la enfermedad ha sido limitado, los períodos de incubación extremadamente largos en las infecciones y la ausencia de modelos experimentales de laboratorio contribuyeron a esta situación. Pese a las distintas en la vía de entrada (oral), tropismo de tejido (intestino) y especificidad de hospedador (rumiantes), algunas de las hipótesis que se manejaban hasta hace pocos años acerca de los mecanismos de infección y patogenicidad de MPTB, estaban basados en estudios y conceptos desarrollados para *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*. Estudios recientes derivados de la aplicación de herramientas de genómica funcional y PCR cuantitativa en tiempo real para estudiar la respuesta inmune durante las infecciones, tanto naturales como experimentales en bovinos con MPTB, han aportado un considerable avance en el conocimiento en la respuesta del hospedador frente a este organismo (Aho *et al.*, 2003, Coussens *et al.*, 2002, 2003, 2004, Lee *et al.*, 2001, Weiss *et al.*, 2001, 2002).

#### **Entrada y supervivencia en el hospedador**

El ganado usualmente es infectado por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en edad temprana, ya sea mediante la vía de transmisión *in útero* o como neonatos, vía la ingestión de material fecal, leche o calostro conteniendo la micobacteria. (Chiodini *et al.*, 1984).

Se considera que la principal vía de entrada de la bacteria es a partir de la ingestión de material contaminado. Dos estudios demostraron que las células M de las placas de Peyer del íleon, son la vía de entrada de la bacteria al sistema linfático (Momotani *et al.*, 1988; Sigur-Dardottir *et al.*, 2001). Contrariamente a los enterocitos, las células M carecen de membrana apical con microvellosidades, *mucus* y enzimas digestivas, exponiendo así una superficie fácilmente accesible para la adhesión de los microorganismos. Las bacterias, atraviesan las células M por transitocis y en la cara basolateral, quedan a expensas de los macrófagos o células dendríticas. En este punto, los microorganismos pueden permanecer intactos dentro del fagocito o bien pueden ser procesados, y sus componentes celulares presentados a los linfocitos T. De este modo se inicia el proceso de generación de respuesta inmune.

Por análisis de microscopía electrónica de macrófagos murinos y bovinos se encontró que la bacteria persiste en el fagosoma. Luego de 2-8 h de infección los fagosomas contienen unos pocos bacilos, algunos de ellos, degradados. A tiempos mayores (>24 h) numerosas bacterias intrafagosomales son detectadas, pudiendo persistir *in vitro* por varias semanas sin una pérdida significativa de la viabilidad. El cuestionamiento principal es cómo logra sobrevivir la bacteria en un ambiente intrafagosomal hostil. El fagosoma maduro contiene enzimas y un ambiente ácido, necesario para degradar el material fagocitado. Luego de la fagocitosis de la micobacteria por el macrófago, las micobacterias desarrollaron distintos mecanismos para adaptarse o modificar el medio intracelular. Se detiene la maduración de los endosomas que contienen micobacterias por inhibición de la fusión lisosomal al fagosoma, observándose:

- 1) Modificación del fagosoma (inhibición de la acidificación), consecuencia de la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma y de la actividad enzimática lisosomal.
- 2) Resistencia o neutralización de los efectos nocivos causados por los reactivos intermediarios del oxígeno y nitrógeno.
- 3) Supresión de la respuesta del macrófago a citoquinas activadoras como el  $\gamma$ IFN.

La infección de una célula por un patógeno, puede seguir dos vías diferentes. Se contiene la infección dentro de la célula del hospedador infectado, favoreciendo al hospedador o se transmite la infección a otras células, favoreciendo al patógeno. Hay autores que refieren que las micobacterias patógenas inducen la apoptosis de la célula hospedadora. Se observó en células de los tejidos con lesiones obtenidas de animales con paratuberculosis, un incremento de la apoptosis celular (Allen *et al.*, 2001). Se desconoce, si este proceso favorece al hospedador o al patógeno. La destrucción del medio intracelular, que la bacteria requiere, sería favorable para hospedador, pero también puede ayudar a la diseminación de la infección por ingestión del patógeno por otras células fagocíticas. Contrariamente a esta evidencia, otros autores sostienen que un incremento en la sobrevivencia del macrófago (inhibición de la apoptosis), es responsable del aumento del número de macrófagos en el tejido infectado y esto asegura la supervivencia intracelular de MPTB (Coussens, 2004a). La infección de los macrófagos no activados en el intestino del rumiante, puede ser considerado como el evento inicial en el establecimiento de la infección persistente y el subsecuente desarrollo de la enfermedad de Johne.

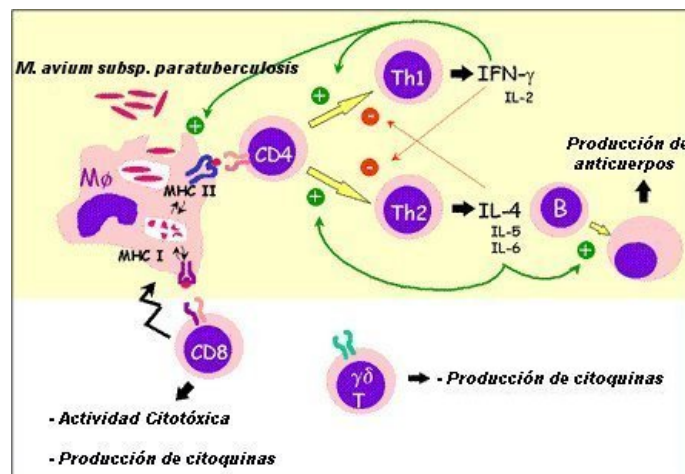
### **Respuesta inmune en el hospedador**

*M. avium* subsp. *paratuberculosis*, como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, es un patógeno intracelular, por lo tanto la respuesta inmune mediada por células juega un rol importante en el control de la propagación de la bacteria y en la protección contra la enfermedad de Johne (Flynn *et al.*, 2004). La progresión de la fase asintomática a la fase clínica de la enfermedad de Johne, está asociada a una disminución en la inmunidad mediada por células y un incremento en la producción de anticuerpos. Durante la etapa subclínica temprana de infección, el microorganismo desencadena



en el hospedador una respuesta celular intensa, que puede estar caracterizada por una fuerte reacción de hipersensibilidad tipo IV, respuesta linfoproliferativa en respuesta a mitógenos y producción de citoquinas por parte de los linfocitos T estimulados. Distintos estudios en modelos experimentales de infección, indican que la protección contra la infección micobacteriana está mediada sobre todo por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, secretores de interferón  $\gamma$  ( $\gamma$ IFN) (

Figura 3). Adicionalmente, también es requerida la participación de las células T CD8<sup>+</sup>, que también producen  $\gamma$ IFN y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) para la resistencia a la infección. Pese a que, ha sido focalizada la atención en el rol de las células T  $\alpha\beta$ , distintos estudios demuestran que las células T  $\gamma\delta$  están involucradas en las infecciones micobacterianas (Boom *et al.*, 2002). Las células T  $\gamma\delta$ , son capaces de producir  $\gamma$ IFN en respuesta a antígenos micobacterianos, mostrando una fuerte activación, es por esto que se postula que al menos, parte de la respuesta innata en la respuesta de  $\gamma$ IFN observada en terneros jóvenes, se deba a la abundancia de este tipo subtipo celular en estos animales.



**Figura 3. Interacción de los distintos tipos celulares en la infección micobacteriana.**

En otras especies, se ha descrito un amplio espectro de reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos  $\gamma\delta$  (antígenos proteicos, no proteicos y compuestos fosfatados de bajo peso molecular) (Batoni *et al.*, 1998; Constant *et al.*, 1994). Welsh *et al.* (2002) estudiaron el rol de las células T  $\gamma\delta$  en ganado infectado con *M. bovis*. Se observó la estimulación de estas células, tanto en presencia de antígenos proteicos como no proteicos. Sin embargo, la producción de  $\gamma$ IFN estuvo ligada a la presencia de antígenos proteicos, mientras que los antígenos no proteicos indujeron sólo una respuesta proliferativa. Esto demuestra una respuesta diferencial de las células T  $\gamma\delta$  a los distintos antígenos. Por otro lado, se sabe que contrariamente a las células T  $\alpha\beta$ , las células T  $\gamma\delta$  no requieren de la interacción con el antígeno presentado en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) para su activación, ya que estas células tienen la capacidad de ser activadas directamente por “superantígenos” micobacterianos, a través de la interacción directa de

estos antígenos no convencionales con el receptor T (Kabelitz *et al.*, 2000). Este tipo de interacción durante la infección micobacteriana, contribuiría con un desarrollo rápido de una respuesta policlonal, sumado a los altos niveles de producción de  $\gamma$ IFN. Por lo tanto, se sostiene que estos linfocitos tendrían un rol fundamental en el control de la infección por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, ya que determinarían la magnitud del control de la infección (Coussens, 2001). Estas células, parecerían estar involucradas en suplementar la respuesta inmune celular, respondiendo a antígenos que no son capaces de estimular a los linfocitos T $\alpha\beta$  (Kabelitz *et al.*, 2002). La activación de las células CD4<sup>+</sup>, junto a la producción de citoquinas pro-inflamatorias ( $\gamma$ IFN, TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-12) y el reclutamiento de linfocitos CD8<sup>+</sup> citolíticos al sitio de la infección, constituyen al desarrollo de la respuesta inmune adquirida de tipo Th1. Durante la infección temprana, la producción de cantidades suficientes de  $\gamma$ IFN y TNF $\alpha$  por parte de las distintas poblaciones de células T y los macrófagos infectados en la mucosa intestinal, es clave para el control de la diseminación de la bacteria. Sin embargo, la producción de estas citoquinas no puede contribuir a la eliminación total de la bacteria, existiendo una población de macrófagos persistentemente infectados. Como consecuencia, resulta esencial la respuesta citotóxica para controlar a esta población. Esta es la principal función de las células T CD8<sup>+</sup>, las cuales lisan a las células infectadas. La incapacidad de eliminar estos macrófagos infectados lleva al hospedador a un lento proceso en el que se incrementa, tanto el daño tisular, como la expansión bacteriana. La respuesta inmune mediada por células parece controlar la infección de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* por un período de tiempo considerable, dado que los síntomas clínicos de la enfermedad aparecen luego de varios años (entre 2 y 5 años) (Rosseels *et al.*, 2006). Con el progreso de la enfermedad desde el estadio subclínico al clínico, la respuesta inmune mediada por células disminuye y la respuesta humoral se vuelve predominante. La activación del macrófago y la destrucción de la bacteria fagocitada es seguida por la secreción de IL-10, citoquina que suprime la actividad T. La producción de IL-10 es una respuesta del sistema inmune a la mayoría de las bacterias patógenas, limitando el daño tisular causado por las citoquinas pro-inflamatorias. Sin embargo, en la infección por MPTB la supresión de la actividad celular CD4<sup>+</sup>-Th1 se ve traducida en una disminución de la secreción de  $\gamma$ IFN. Esta disminución de  $\gamma$ IFN permitiría la multiplicación de la bacteria en los macrófagos persistentemente infectados. Existen reportes que indican que las bacterias pueden inducir la expresión de IL-10 en el macrófago (Flesh y Kaufmann, 1994). Existe un cambio de la respuesta predominante, pasando de Th1 a Th2. La subpoblación de linfocitos Th2, CD4<sup>+</sup>, producen citoquinas como IL-4-IL-5 e IL-6, las cuales inducen la inmunidad humoral, traduciéndose en un incremento en los niveles de anticuerpos. La respuesta de anticuerpos que se genera es incapaz de contener la infección y puede exacerbar la situación, promoviendo la fagocitosis de las bacterias opsonizadas por los macrófagos (Coussens, 2001). Este pasaje desde una respuesta predominante T *helper* de tipo 1 (Th1) a una T *helper* de tipo 2 (Th2), ha sido demostrado en ovejas experimentalmente infectadas y en bovinos. Durante el estadio clínico de la

enfermedad de Johne el daño del epitelio intestinal es muy extenso, pudiendo haber engrosamiento de la mucosa con numerosos granulomas (Coussens, 2001). Durante los estadios finales de la enfermedad la respuesta mediada por células antígeno-específica está ausente o el animal entra en estado de anergia, llevando a una rápida diseminación de la bacteria en el hospedador (Stabel, 2000).

#### **1.4. Diagnóstico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis***

Las pruebas disponibles para el diagnóstico de la paratuberculosis, están basadas en la detección del agente etiológico o en la detección de respuesta inmune del hospedador (humoral o mediada por células). La principal dificultad encontrada en el diagnóstico de la paratuberculosis, reside en la identificación precisa de los casos subclínicos. Los animales infectados pueden no presentar síntomas durante un período de 3 a 5 años después de la infección, y aún cuando los síntomas se hayan presentado, ha transcurrido un intervalo de tiempo suficiente, para que el animal contamine el ambiente y disemine la bacteria. La naturaleza lenta y progresiva de la infección, complica el proceso diagnóstico. Teniendo en cuenta los 4 estadios de la enfermedad, mencionados anteriormente, las pruebas actuales no detectan fácilmente el estadio temprano de infección, conocido como estadio silente (1) y fallan en la detección de algunos de los animales con infección subclínica (2). Dada la naturaleza de la enfermedad, con una eliminación intermitente de la bacteria y una respuesta inmune diferencial de acuerdo al estadio (Figura 4), un resultado negativo, no prueba que el animal está libre de la infección. Actualmente, un diagnóstico efectivo, requiere de la utilización de múltiples pruebas complementarias. Se han desarrollado un gran número de pruebas y están disponibles comercialmente, sin embargo, el diagnóstico de la paratuberculosis, continúa siendo hoy un campo a mejorar.

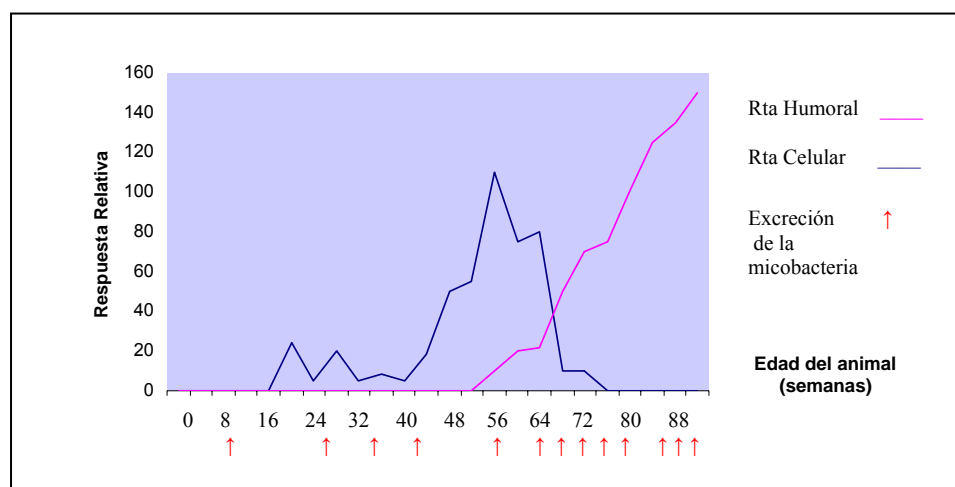


Figura 4. Respuesta inmunológica típica en animales naturalmente infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* a una edad temprana.

#### 1.4.1. Ensayos basados en la detección de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Como consecuencia de la naturaleza de la infección descrita más arriba, las técnicas de aislamiento de la bacteria, permanecerán como la prueba definitiva en el diagnóstico de la paratuberculosis. Como se mencionó, el resultado negativo requiere de la confirmación por otras metodologías. Las técnicas de detección directa o de cultivo, pueden ser llevadas a cabo en el laboratorio de bacteriología sin mayores requerimientos de equipamiento, lo que permite que sean accesibles a regiones poco desarrolladas, donde la paratuberculosis también representa una problemática a controlar.

**Detección directa de bacilos ácido-alcohol resistentes en materia fecal o tejido.** La examinación microscópica de materia fecal para el diagnóstico de la enfermedad de Johne, constituyó una técnica muy utilizada en el siglo pasado. Incluso tenía un valor práctico superior sobre el cultivo bacteriológico (Whipple *et al.*, 1991), dado que aún no existían los medios de cultivo ni los métodos de decontaminación apropiados. La tinción de frotis de materia fecal y observación microscópica es uno de los métodos más ampliamente utilizados por su rapidéz y sencillez, además de su bajo costo. Sin embargo, en muchos casos su sensibilidad es menor a la del cultivo y el resultado requiere de la confirmación por otras metodologías.

**Cultivo convencional.** Es considerada la prueba más ampliamente utilizada para el diagnóstico de la paratuberculosis. El método bacteriológico convencional ha sido utilizado por casi 100 años y está basado en el cultivo de la micobacteria en un medio apropiado, conteniendo el factor de

crecimiento micobactina. Los primeros medios empleados, contenían huevo en su formulación y eran suplementados con extractos o suspensiones de otras micobacterias como *M. tuberculosis* o *M. phlei* para aportar los nutrientes que favorezcan su crecimiento. Luego se reemplazó esta práctica, por el producto derivado de la extracción con etanol caliente del compuesto, a partir de *M. phlei*, que hoy se conoce como micobactina. A partir de estos medios primitivos, derivan las formulaciones subsiguientes y actualmente utilizadas. Los medios empleados comúnmente son el medio de Herrold con yema de huevo o el medio Löwenstein-Jensen modificado. El cultivo de la bacteria a partir de materia fecal y tejido es considerado la *prueba de oro* o prueba confirmatoria, pero pese a que puede detectar hasta 100 UFC/g de materia fecal, tiene una sensibilidad muy baja. Como consecuencia que la mayoría de los animales infectados, eliminan la bacteria por materia fecal en forma intermitente, sobre todo en los estadios iniciales de la enfermedad, la sensibilidad del cultivo está estimada entre 45-50 % (Stabel *et al.*, 2002). Además de la baja carga bacteriana, la baja recuperación de la bacteria está asociada también al riguroso proceso de decontaminación que es requerido para prevenir el crecimiento de bacterias saprófitas de crecimiento rápido y de hongos. Se ha estimado que a partir de este procedimiento, se mata a más del 80 % de la micobacterias presentes en la muestra. El crecimiento extremadamente lento (5-16 o hasta 24 semanas), limita a esta técnica y se suma el requerimiento de micobactina que incrementa su costo. Algunas cepas de MPTB aisladas de oveja, frecuentemente no crecen en los medios de cultivo tradicionales. La confirmación de la identidad de las colonias se realiza usualmente por cultivo simultáneo en distintos medios, con o sin micobactina. Actualmente, la confirmación del aislamiento, puede realizarse por amplificación génica de una secuencia de inserción específica de MPTB, IS900. La ventaja del cultivo es que logra el aislamiento de la micobacteria, la cual puede someterse a posteriores estudios de identificación por PCR y de tipificación molecular. Adicionalmente, el valor informativo del cultivo es importante, dado que el número de UFC de MPTB contabilizado en las muestras fecales es considerado una medida del estado de infección del animal (Collins *et al.*, 2005).

**Cultivo radiométrico o fluorimétrico.** Es una técnica basada en la detección radiactiva y fue desarrollada para el aislamiento de *M. tuberculosis* en humanos (BACTEC) y adaptado por Collins *et al.* (1990) para el cultivo de MPTB. El crecimiento de la micobacteria es evaluado mediante la cuantificación de la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  por el metabolismo bacteriano a partir de la incubación con palmitato radiactivo. La principal ventaja de este método sobre el cultivo convencional, es la detección de la bacteria en bajo número y la detección de crecimiento en un tiempo menor (7 semanas). Este tipo de cultivo permite además el crecimiento de una amplia variedad de cepas, inclusive las provenientes de ovejas. Las desventajas, están asociadas a los costos elevados de la metodología, ya que requiere del instrumental para medir el crecimiento de los cultivos e involucra la manipulación de radioisótopos. Recientemente, otros métodos basados en fluorescencia fueron

introducidos para el crecimiento de micobacterias, BACTEC MGIT 960 (Becton-Dickinson) y el MB Bact (Organon Technika) aunque estas metodologías, están en evaluación para el cultivo de MPTB.

### **Detección por métodos de biología molecular**

El diagnóstico basado en estudios genéticos se presenta como promisorio, aunque aún no ha igualado la eficiencia de los métodos basados en el cultivo de la micobacteria. Además, al no permitir contar con el organismo viable para estudios adicionales, no son técnicas que reemplacen al cultivo y aislamiento de la bacteria (Collins *et al.*, 2005)

**Hibridación *in situ* con sondas de ADN.** La secuencia de inserción *IS900*, fue descrita a finales de 1980s (Collins *et al.*, 1989) y es el marcador más ampliamente utilizado para la detección específica de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. La utilización de sondas, dirigidas contra la región 5' puede distinguir en forma específica a MPTB de otras micobacterias incluso de los miembros de la misma especie. Esta técnica permite la detección en el tejido afectado, sin necesidad de cultivar la bacteria, mientras que la principal desventaja es el costo de la prueba y que es aplicable sólo a cortes histológicos, es decir, permite un diagnóstico *post-mortem*.

**Amplificación génica.** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ofrece la posibilidad de acortar los tiempos de diagnóstico. La amplificación génica es ampliamente utilizada para confirmar la identidad de los cultivos. Esta estrategia, requiere la identificación de una secuencia de ADN presente solo en MPTB y no en *M. avium* subsp. *avium* u otra micobacteria estrechamente relacionada. La secuencia de inserción *IS900* es la secuencia de elección. Es una técnica que tiene una alta sensibilidad y si es aplicada a muestras de materia fecal o leche, el resultado es complementario al cultivo. También es aplicable a muestras de tejido de un animal biopsiado. La principal limitación es la presencia de inhibidores en las muestras clínicas y su extrema dificultad para removerlos en la extracción del ADN de la muestra. Esto resulta particularmente problemático en las muestras fecales, que contienen inhibidores de la PCR como bilirrubina, sales biliares, agentes quelantes, pigmentos y compuestos húmicos, que hacen dificultosa la extracción a partir de un número reducido de bacterias que se encuentra en esa matriz compleja (Vansnick *et al.*, 2005). La combinación del cultivo fecal y posterior PCR podría superar este problema y acortar el tiempo del diagnóstico (Harris y Barletta, 2001; Paolicchi *et al.* 2003). Su aplicación en muestras de leche y materia fecal está actualmente en desarrollo y evaluación.

#### **1.4.1.1. Diferenciación de los aislamientos de MPTB.**

**Análisis en el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).** Como consecuencia de la dificultad para diferenciar entre los aislamientos de *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, la tipificación molecular representa un aporte importante y complementa a las técnicas de cultivo. La técnica de RFLP permite diferenciar a los microorganismos por un perfil derivado de la digestión del ADN genómico, y posterior separación electroforética de los fragmentos. Para aumentar la discriminación, se emplean sondas dirigidas a una secuencia génica. Pavlík *et al.*, (1999), propusieron una técnica de RFLP estandarizada, basada en la secuencia IS900. Esta técnica permite identificar los aislamientos clínicos, posibilitando además realizar estudios de transmisión. También permitió la diferenciación entre las cepas ovinas de bovinas (Bauerfeind *et al.*, 1996) como así la identificación de aislamientos provenientes del mismo animal con un perfil único, constituyendo una evidencia de que la coinfección es posible (Pavlík *et al.*, 1995). Este método es laborioso y requiere cantidades de ADN relativamente altas y de buena calidad. El crecimiento lento de la bacteria y la dificultad del cultivo de algunas cepas como las de ovejas, limitan la aplicación de este tipo de técnica. En base a esta técnica, pudimos establecer los perfiles más frecuentes en nuestro país (Moreira *et al.*, 1999). Las secuencias polimórficas VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) y MIRUS (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), dispersas en el genoma de la bacteria, también se utilizan para diferenciar entre las especies del MAC y entre cepas ovinas de bovinas (Bull *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Ensayos basados en la Detección de la Respuesta Inmune**

Son pruebas diagnósticas indirectas que contemplan la evaluación de la inmunidad mediada por células o la respuesta humoral del animal.

##### **Evaluación de la Respuesta mediada por células**

Son pruebas que se realizan en el animal *in vivo* (intradermoreacción) o *ex vivo* (liberación de  $\gamma$ IFN). Se evalúa la respuesta específica frente a una mezcla antigénica conocida como tuberculina o Derivado Proteico Purificado (PPD).

**Derivado Proteico Purificado (PPD).** Los Derivados Proteicos Purificados son mezclas antigénicas no definidas, que se utilizan tanto para las pruebas de intradermoreacción como para la estimulación de la liberación específica de  $\gamma$ IFN. Se denomina PPD a la mezcla de componentes celulares solubles, producidos por el crecimiento de micobacterias en medio líquido. Los métodos de producción pueden variar, pero, esencialmente, el producto consiste en proteínas liberadas al medio de un cultivo en fase estacionaria, las que son concentradas con sulfato de amonio o ácido tricloroacético, después de la inactivación. Dado que el proceso, involucra la inactivación de las bacterias por calor, en este producto, se encuentran también proteínas celulares liberadas por la lisis de la micobacteria. Las tuberculinas son mezclas complejas de proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos, incluyendo una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales son comunes a varias

especies micobacterianas (Monaghan *et al.*, 1994). Las proteínas presentes en este extracto, son difícilmente identificables, se ha determinado por gradiente de densidad la presencia de tres componentes con densidades que oscilan entre 8.000 S y 12.000 S. Los carbohidratos están presentes en cantidades variables y su presencia es favorecida cuando se precipita el PPD con ácido tricloroacético (TCA) (25 % contra 3-6 % del total obtenido con sulfato de amonio). Los ácidos nucleicos, son el tercer componente de las PPDs, que se encuentran en el rango del 1 % cuando se precipita con sulfato de amonio y hasta 26 % cuando se utiliza TCA (SENASA, 2000). La Tabla 3, muestra los tipos de tuberculinas disponibles. El contenido de proteínas de las tuberculinas no predice su actividad biológica, en consecuencia, las PPDs son evaluadas en animales y comparadas con un estándar de referencia internacional.

PPD	Micobacteria Empleada
humana	<i>M. tuberculosis</i> , cepas C, Dt y Pn
bovina	<i>M. bovis</i> , cepa AN5
aviar	<i>M. avium</i> cepa D4
johnina	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>

**Tabla 3. Tuberculinas o PPDs de distintos orígenes.** Se denominan también, PPDh, PPDb, PPDa y PPDj, para indicar humana, bovina, aviar y johnina respectivamente (también denominada PPDp, a la derivada de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*). SENASA, 2000.

En nuestro país, las tuberculinas son producidas por la Dirección de Laboratorio y Control Técnico (DILACOT) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) y por distintos laboratorios de la industria privada.

**Intradermoreacción (IDR) o Prueba de la tuberculina.** Las pruebas de hipersensibilidad retardada, comúnmente conocidas como IDR, han sido utilizadas por muchos años para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. La prueba, fue originalmente descrita para diagnosticar tuberculosis humana por R. Koch, más tarde, la misma técnica fue adaptada para su utilización en el ganado cuando se descubrió que los animales tuberculosos tenían una respuesta febril seguida a la inoculación subcutánea de 0,2-0,5 mL de tuberculina (Monaghan *et. al*, 1994). En el siglo siguiente, Moussu y Mantoux (1908) fueron los primeros en describir la prueba intradérmica inoculando en el pliegue ano-caudal, que se emplea en la actualidad en el ámbito veterinario. La inyección intradérmica de tuberculina o derivado proteico purificado de tuberculina (PPD) induce,



en el individuo infectado, una reacción inflamatoria localizada a causa de una importante infiltración celular en la dermis. Es una respuesta de tipo celular denominada reacción de hipersensibilidad tardía (DTH). También se la conoce en los humanos como reacción de Mantoux. En forma semejante, en la paratuberculosis, esta prueba es realizada inoculando intradérmicamente un extracto de MPTB (PPDj). Un incremento en el grosor de la piel en el sitio de inoculación (pliegue ano-caudal) mayor a 4 mm dentro de las 24 a 72 h es considerado positivo. La sensibilidad de la prueba es afectada por la potencia y la dosis de tuberculina administrada, el intervalo transcurrido entre distintas inoculaciones, desensibilización del animal, anergia y variaciones del observador. Mientras que es la prueba de referencia para los programas de control de la tuberculosis bovina, dado que existe una mejor correlación entre el resultado de la prueba y la infección del animal, esta prueba no es recomendada para el diagnóstico de paratuberculosis por la ausencia de especificidad, consecuencia de la reactividad cruzada con las micobacterias ambientales, principalmente las del complejo *M. avium*. También existe una correlación pobre con el estado de infección del animal (Yayo Ayele *et al.* 2001; Gilot y Cocito, 1993).

**Prueba de liberación específica de Gamma-Interferón ( $\gamma$ IFN).** La técnica de  $\gamma$ IFN es un ensayo rápido desarrollado por Wood *et al.* en 1990 (Wood *et al.*, 1990), que puede realizarse a partir de sangre entera. El ensayo está basado en la liberación de  $\gamma$ IFN a partir de linfocitos sensibilizados durante una incubación de, al menos 16 h con un antígeno específico. La detección de  $\gamma$ IFN en el plasma es llevada a cabo por medio de un ELISA *sandwich* empleando un anticuerpo monoclonal específico. La prueba, también puede ser utilizada para la detección de otras bacterias y virus si los antígenos adecuados están disponibles. Para las infecciones micobacterianas producidas por *M. bovis* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* se emplean las mezclas antigénicas PPD<sub>b</sub> o PPD<sub>a</sub>, respectivamente, a las cuales se hizo referencia con anterioridad.

**Alcances y limitaciones de la técnica de  $\gamma$ IFN.** La prueba de  $\gamma$ IFN es la única técnica diagnóstica con potencial para diagnosticar paratuberculosis subclínica en animales vivos. Otra ventaja importante es que la prueba puede repetirse a cualquier tiempo (contrariamente al ensayo de IDR). Dentro de las limitaciones, se encuentra que los animales con paratuberculosis clínica pueden presentar una respuesta inmune celular baja y así, resultar negativos a la prueba. Sin embargo, en este estadio de la enfermedad, ya se habilitan para el diagnóstico otras pruebas como los ensayos serológicos y el aislamiento de la bacteria por cultivo. Algunos animales infectados, que presentan una respuesta celular específica por la prueba de  $\gamma$ IFN en etapas tempranas, pueden controlar la infección manteniendo el estado subclínico y en consecuencia, no permiten ser diagnosticados por otras metodologías como las serológicas. Otros animales con paratuberculosis subclínica pueden en algún punto, entrar en la etapa clínica de la infección con eliminación bacteriana marcada y seroconversión, dando una confirmación retrospectiva de los estudios previos o tempranos de la prueba de  $\gamma$ IFN. Por estos motivos, no hay *prueba de oro* disponible para la evaluación de la

prueba de  $\gamma$ IFN para la enfermedad de Johne subclínica (Jungersen *et al.*, 2002). Por otro lado, la técnica de  $\gamma$ IFN no puede ser utilizada para el diagnóstico de animales en una etapa tardía de infección ya que en esta etapa existe un predominio de respuesta Th2, y en etapas más avanzadas, los animales pueden entrar en estado de anergia completa o de desactivación inmune. Esta prueba presenta también sus limitaciones frente a animales jóvenes, tanto para el diagnóstico de paratuberculosis como para la tuberculosis bovina, ya que en estos animales se presentan muchas reacciones falso-positivas. Estos falsos positivos detectados en edades tempranas, estarían asociados a que las células T  $\gamma\delta$ , que son capaces de producir  $\gamma$ IFN en respuesta a antígenos micobacterianos o a antígenos inespecíficos. Es por esto que se postula que al menos parte de la respuesta observada en terneros jóvenes, se deba a la abundancia de este tipo subtipo celular en estos animales. De esta manera, el ensayo de  $\gamma$ IFN para infecciones micobacterianas no es recomendable para ser implementado en animales jóvenes.

**Interpretación de la prueba.** Existen en la actualidad distintos parámetros de interpretación de la prueba, aunque no hay un criterio uniforme (Jungersen *et al.*, 2002; Walravens *et al.*, 2002). Uno de ellos es la evaluación de la diferencia absoluta de la densidad óptica (DO<sub>450</sub>) entre los valores de estimulación obtenidos frente al antígeno específico y sin estímulo (PBS). Los valores superiores a 0,05 o 0,1 unidades (dependiendo del punto de corte), son considerados positivos. Otro criterio es contemplar la relación entre los valores de DO<sub>450</sub> obtenidos frente a PPDa y PPDb o índice de estimulación específico. En el caso del diagnóstico de paratuberculosis, se usa la PPDb como antígeno de referencia. Distintos criterios han sido utilizados para confirmar el diagnóstico de paratuberculosis de acuerdo a las DO<sub>450</sub> relativas de PPDa y PPDb:

- a) PPDb/PPDa menor a 1.( o PPDa mayor a PPDb)
- b) PPDb/PPDa menor a 0,71 (este es el que se conoce como criterio IDEXX)

Walravens *et al.* (2002) basaron su criterio de interpretación en el trabajo de Wood *et al.* (1992) Establecieron que una relación PPDb/ PPDa >2 es indicativa de tuberculosis bovina, en cambio una relación  $\leq 0,7$ , es indicativa de animales con paratuberculosis, mientras que valores entre 0,7 y 2, consideran que la sensibilización es consecuencia del contacto del animal con micobacterias ambientales. Cualquiera sea el criterio a considerar, es importante evaluar, en aquellas regiones donde la tuberculosis no está erradicada, la posibilidad de que los animales también estén expuestos a *M. bovis*.

### **Detección de la Respuesta Inmune Humoral**

Dado que la respuesta humoral intensa no se manifiesta sino hasta la última etapa de la enfermedad de Johne, la sensibilidad de estas pruebas es mayor en animales con lesiones lepromatosas, con sintomatología clínica o en aquellos que sean eliminadores de una alta carga bacteriana. La limitación principal en relación a esta prueba, radica en la incapacidad de detectar

animales en los estadios tempranos de la infección. Tres pruebas distintas son empleadas actualmente para la medición de anticuerpos contra MPTB en el suero de animales infectados: la fijación de complemento (FC), la inmunodifusión en agar (conocida por sus siglas en inglés, AGID) y el enzimo-inmuno-ensayo, ELISA.

**Fijación de Complemento.** La FC detecta los anticuerpos que fijan complemento en el suero. La especificidad es considerada menor que las técnicas de AGID y ELISA, y la sensibilidad, intermedia. Esta técnica detecta los anticuerpos tardíamente respecto de la técnica de ELISA (entre 1 y 5 meses más tarde). No es una técnica recomendada para el diagnóstico de rutina.

**AGID.** La técnica de inmunodifusión en gel, ha sido una de las primeras pruebas serológicas desarrolladas para el diagnóstico de la paratuberculosis. Esta técnica, tiene una especificidad superior al 90 % en animales con signos compatibles con la enfermedad de Johne (estadios tardíos), sin embargo, la sensibilidad está estimada en un 30 %. Pese a que es una técnica simple, la gran concentración de antígeno que la técnica requiere, constituye una importante limitación. Esta prueba es considerada menos sensible que la técnica de ELISA y la Fijación de Complemento.

**Enzimo-Inmuno-Ensayo (ELISA).** Para el establecimiento de programas de control en forma extensiva, es necesario adoptar técnicas que provean de información diagnóstica y pronóstica, permitiendo conocer, por ejemplo, las tropas de animales infectadas. Además, como los rodeos deben ser evaluados en forma periódica, los costos son una variable a tener en cuenta. La técnica de ELISA es muchas veces, la técnica de elección dada la potencialidad de automatización para el análisis de un gran número de muestras y el relativo bajo costo. Algunas variantes del método de ELISA han sido utilizadas hasta el momento y existen en la actualidad distintos *kits* comerciales. La sensibilidad puede variar entre el 30 y 45 % y la especificidad entre 84 y 99 % (Collins *et al.*, 2005). Uno de los aspectos importantes de la técnica, es la preparación de antígeno utilizada para la captura de anticuerpos del suero a evaluar, afectando este parámetro en forma directa a la sensibilidad y especificidad de la prueba. Distintos antígenos han sido utilizados y varios de ellos están disponibles comercialmente. El ELISA más difundido es el que está basado en el antígeno protoplasmático PPA (Allied Monitor). Contrariamente a la idea ampliamente difundida acerca del origen del antígeno, este no proviene de una cepa de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Jara *et al.*, 1997, Dr. C. Murdock, Allied Monitor, comunicación personal), en la actualidad se sabe que es una cepa de *M. avium* subsp. *avium* (*M. avium* cepa 18) que originalmente se había tipificado como MPTB (*M. paratuberculosis* cepa 18), (Chiodini, 1993b). Otro antígeno, también utilizado en un ELISA comercial, es el lipoarabinoman (LAM). Usualmente, se presentan resultados falso positivos como resultado de la reacción cruzada con bacterias relacionadas (*Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Corynebacterium* sp.), o en países donde la tuberculosis bovina es endémica, lo que

indica que la ocurrencia de falsos positivos es también geográficamente dependiente. La preabsorción del suero con antígenos de *M. phlei* ha resultado en un incremento en la especificidad del ELISA. Este paso remueve los anticuerpos inespecíficos dirigidos contra los antígenos compartidos con las micobacterias ambientales o hacia otros que, potencialmente pueden reaccionar en forma cruzada con los antígenos de MPTB. Aunque la pre-adsorción de los sueros es controversial, dada la disminución que acarrea en la sensibilidad, muchos países la implementan. La técnica de ELISA es la técnica que se utiliza para los estudios de incidencia en establecimientos de producción y tambos. Los expertos en el control de paratuberculosis recomiendan que cada animal positivo por la técnica de ELISA sea confirmado por la técnica de cultivo fecal.

#### **1.4.3. Estudios para la búsqueda y caracterización de nuevos antígenos, candidatos para el mejoramiento diagnóstico.**

Numerosos esfuerzos están dirigidos al mejoramiento y desarrollo de nuevos ensayos para el diagnóstico de distintas enfermedades causadas por micobacterias tanto en humanos (lepra y tuberculosis), como en animales (tuberculosis bovina y paratuberculosis). Dada la amplia distribución de las micobacterias del complejo *M. avium* en el ambiente, las reacciones cruzadas con los antígenos compartidos con estas bacterias, se presenta como un problema en el diagnóstico de PTB, que se basa en mezclas antigénicas o semipurificadas. Las micobacterias contienen numerosos componentes que pueden interaccionar con el sistema inmune del hospedador, siendo esencial evaluar la mejor combinación de antígenos y epítopes especie-específicos para el diagnóstico de la enfermedad. Muchos estudios se han basado en métodos bioquímicos de fraccionamiento y purificación para la obtención de distintos componentes celulares, a partir de extractos crudos de la micobacteria y su posterior análisis. El uso de antisueros generados en animales de experimentación, ha sido de utilidad para la identificación de proteínas inmunogénicas en las distintas fracciones. Olsen *et al.*, (2000) utilizaron para identificar antígenos secretados en el complejo *M. avium*, un antisuero policlonal contra proteínas del filtrado de cultivo de estas especies y antisueros contra proteínas conocidas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. En este trabajo, detectaron una proteína de bajo peso molecular, 14 kDa en micobacterias del MAC, como así el reconocimiento de homólogos a 85A, 85B, 85C y 85D del complejo antigénico 85. Romain *et al.*, (1993) caracterizaron las proteínas presentes en el filtrado del cultivo de *M. bovis* BCG e identificaron al complejo antigénico de 45/47 kDa (Apa) por medio de una estrategia de selección y contraselección con sueros de animales inmunizados con la bacteria muerta o viva. De esta manera, identificarían los antígenos que se expresan en la bacteria durante el transcurso de la infección. Distintas líneas han contribuido con la identificación de homólogos presentes en otras especies bacterianas a partir del estudio de la reactividad cruzada o identidad de secuencias, es el caso de la proteína inmunodominante de 35 kDa de *M. leprae*, presente también en *M. avium* (Triccas *et al.*, 1998). En el mismo sentido, los anticuerpos monoclonales han sido empleados para caracterizar

antígenos asociados a la pared celular y del filtrado de cultivo de MPTB. De esta manera, se caracterizó un antígeno de masa molecular aparente de 34,5 kDa, el cual fue reconocido por el anticuerpo monoclonal Mab B6A en un lisado (extracto proteico) de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, mientras que no reaccionó con el extracto de otras micobacterias, sugiriendo el reconocimiento de un epítipo especie-específico (Mutharia *et al.*, 1997).

La biología molecular ha contribuido para ampliar el desarrollo en esta área, que también puede proporcionar evidencias para el entendimiento de la inmunopatología de las infecciones. La identificación de antígenos a partir de la evaluación de genotecas de expresión, constituye una herramienta valiosa. La implementación y utilización del sistema de expresión  $\lambda$  gt11-*E. coli* (Young *et al.*, 1985) ha constituido un avance importante y ha impulsado la identificación y caracterización de antígenos micobacterianos. En base a los análisis serológicos de estas genotecas (y derivadas de este sistema), se han podido identificar antígenos en distintas micobacterias. Sathish *et al.*, (1990) identificaron determinantes antigénicos de *M. leprae* usando sueros de pacientes leprosos; en el mismo sentido, se enfrentó una genoteca de *M. tuberculosis* con sueros de pacientes tuberculosos (Amara y Satchidanandam, 1996) y se identificaron determinantes antigénicos que potencialmente discriminarían entre pacientes con tuberculosis e individuos vacunados (Bisen *et al.*, 2003). Con la misma estrategia de emplear sueros de pacientes con tuberculosis, se identificó la proteína del filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP-10) (Dillon *et al.*, 2000), que en la actualidad, su homólogo en *M. bovis*, se presenta como uno de los antígenos más promisorios para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. En el campo veterinario, Bigi *et al.* (1997) identificaron los antígenos p27 y P36 utilizando una genoteca de expresión de *M. bovis* y sueros de animales tuberculosos. Distintos grupos han utilizado la misma estrategia para la identificación de antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. De estos trabajos surgieron los antígenos de 35 kDa (El-Zaatari *et al.*, 1997), y de 34 kDa (De Kesel *et al.*, 1993). Adicionalmente al empleo de sueros, se han utilizado anticuerpos monoclonales y sueros hiperinmunes de animales de experimentación para el análisis de las genotecas de expresión (Stevenson *et al.*, 1991). Una limitación importante de la evaluación humoral de las genotecas de expresión en fago  $\lambda$ , es que no se contempla la identificación de antígenos inductores de la respuesta celular, que es la respuesta inicial y protectora a la infección. Recientemente Nagata *et al.*, (2005) identificaron antígenos de MPTB inductores de la respuesta celular (Map10, Map39 y Map41) analizando la capacidad de estimular la producción  $\gamma$ IFN *in vitro* por los extractos proteicos de las bacterias transfectadas con los *fagémidos* escindidos de una genoteca de expresión en fago  $\lambda$ . Este trabajo, pese a la complejidad del procedimiento, demuestra la adaptación y utilidad de estos sistemas de expresión en la identificación de antígenos capaces de estimular la respuesta inmune celular. Otra alternativa a la búsqueda de antígenos T, es la implementación de un fraccionamiento de proteínas de la bacteria por SDS-PAGE y posterior elusión continua. De esta manera, las proteínas constituyen fracciones de distinto rango de peso molecular. Luego se evalúa la actividad biológica de las

fracciones, para finalmente analizar las inmunoreactivas por electroforesis en 2 dimensiones y microsecuenciación. Este tipo de aproximación experimental, fue utilizada para el estudio de antígenos en *M. tuberculosis* (Mehrotra *et al.*, 1997; Sudhir *et al.*, 2005) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Rosseels *et al.*, 2005).

La finalización de la secuencia del genoma de MPTB sumado al conocimiento de la secuencia de los antígenos presentes en otras micobacterias, permite el análisis mediante genómica comparativa para la búsqueda de genes homólogos. Este tipo de análisis acelera los tiempos en la búsqueda de candidatos para el mejoramiento diagnóstico. Realizando un análisis comparativo de secuencias *in silico*, Bannantine *et al.* (2004), identificaron en el genoma de MPTB, 21 secuencias hipotéticas codificantes que no se encuentran en otras micobacterias, de las cuales, 5, demostraron ser antigénicas. Si bien esta descripción resulta relevante, no hay estudios extensivos que avalen la utilidad diagnóstica de estos genes. Del mismo modo, la disponibilidad de la secuencia del genoma, permite evaluar la presencia de antígenos homólogos descriptos previamente en otras micobacterias. Se puede citar como ejemplo, la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*, también presente en MPTB (MAP0261c), aunque con menor capacidad de inducir respuestas de tipo Th1 y Th2 (Huntley *et al.*, 2005). También es el caso de HBHA (*Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin*), descripta en MPTB (Sechi *et al.*, 2006), con capacidad inmunogénica, demostrándose la citoadherencia en la línea celular Caco2 y que fue descripta originalmente en *M. tuberculosis*. Contrariamente a la infección micobacteriana en bovinos causada por *M. bovis*, donde se encontraron dos antígenos inmunodominantes promisorios, ESAT-6 y CFP-10 (Vordermeier *et al.*, 2001) con potencialidad diagnóstica, en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, estos antígenos candidatos aún no han sido identificados.

### **1.5. Situación epidemiológica de la paratuberculosis en el mundo y en Argentina.**

La oficina Internacional de Epizootias (OIE), es un organismo internacional fundado en 1924 que cuenta con 164 países miembros. Su función es informar a los gobiernos sobre la presencia y evolución de las enfermedades animales en el mundo y de los medios para combatir las; coordinar a nivel internacional los estudios sobre la vigilancia y el control de las enfermedades animales y armonizar las reglamentaciones de los países miembros en materia de intercambios internacionales de animales y productos de origen animal. Tanto la tuberculosis bovina como la paratuberculosis son consideradas enfermedades que son importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario en el nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio de animales y productos son de magnitud considerables. En nuestro país son enfermedades endémicas. Estas enfermedades son objeto de un informe anual a la OIE, aunque en algunos casos, pueden ser informes más frecuentes.

La enfermedad de Johne ha sido reportada en cada continente y es más común en el ganado lechero que en el ganado de carne. Los datos de prevalencia estimados en algunos países se

presentan en la Tabla 4. La prevalencia de paratuberculosis en Europa oscila entre un 7 % y un 55 %, mientras que en los Estados Unidos entre un 20 % y 40 % de los rodeos de más de 300 cabezas están infectados (entre 11 % y 18 % de portadores subclínicos) y en Australia la prevalencia en rodeos lecheros se encuentra entre un 9 % y un 22 %.

País	Prevalencia aparente (%)
Nueva Zelanda	60
Holanda	55
Dinamarca	47
Estados Unidos	22
Alemania	20
Bélgica	17-4
Inglaterra y Gales	17
Austria	15

**Tabla 4. Estimación de la prevalencia de la enfermedad de Johne en establecimientos de producción láctea en distintos países del mundo (Grant, 2005).**

En 1984, las pérdidas anuales ocasionadas por MPTB en los Estados Unidos fueron estimadas en US\$ 1.500 millones y estudios recientes calculan pérdidas entre US\$ 200 y US\$ 250 millones por año en la industria láctea (Motiwala *et al.*, 2006). Se ha calculado que cuando la prevalencia de la enfermedad en un rodeo con enfermedad es igual o mayor al 10 %, el costo promedio anual de las pérdidas alcanzaría los US\$ 200 /animal. Las pérdidas directas causadas por paratuberculosis son: a) disminución en la producción de carne y/o leche, b) disminución de la fertilidad, con un incremento del intervalo entre partos, c) prematura eliminación de los animales del rodeo, d) pobre conversión alimenticia, e) aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas (se estima que el desarrollo de mastitis es entre 4 a 7 veces mayor respecto de los no infectados), f) pérdida en el potencial genético y en los mercados de exportación y, g) un incremento en los costos derivados del uso de medicamentos. Por estos motivos y su potencialidad zoonótica, que se discute más adelante, el control de la enfermedad se considera de alta prioridad, para lo cual la aplicación de planes estatales de control son considerados estratégicos en los países desarrollados. Argentina no cuenta con una caracterización epidemiológica global de paratuberculosis, como tampoco existen datos concretos en Sudamérica. La información regional de Argentina indica una seroprevalencia entre el 7,2 % y 19,6 % en rodeos de cría de la Cuenca del Salado (Provincia de Buenos Aires) (Paolicchi *et al.*, 2003).

Por otro lado, el diagnóstico clínico se ha incrementado en el último tiempo entre un 5 % y 10 %, siendo los valores previos menores del 3 % y se han observado cambios en el

comportamiento de la enfermedad, ya que la presentación clínica es cada vez más frecuente en animales jóvenes (a partir de los 18 meses de edad), incorporando de esta forma a la invernada, como otra categoría de riesgo. Estudios previos en nuestro país, estimaron una disminución en la producción de carne y/o leche que alcanzaría hasta un 19 %. Según los datos de seroprevalencia de paratuberculosis, la estimación preliminar de las pérdidas económicas referentes al valor bruto de la producción ganadera y de la comercialización y flete, durante el año 2001 son de aproximadamente U\$S 22.0 millones (zona de cría de la Cuenca del Salado) y de U\$S 6.3 millones (Cuencas Lecheras) en el resto de la Provincia de Buenos Aires. Por otro lado, se identificó a la enfermedad como una problemática de impacto económico en la cría de ciervos colorados (*Cervus elaphus*) en cautiverio (Paolicchi *et al.*, 2001).

### **1.5.1. Estrategias para el control de la paratuberculosis**

Distintas formulaciones de vacunas, han sido evaluadas a la fecha, empleando bacterias vivas, atenuadas o no atenuadas, organismos muertos por calor y bacterias rotas mecánicamente. La vacunación consistió originalmente en la inoculación sub-cutánea de bacilos vivos no atenuados en animales de 1-30 días, y se implementó en el año 1926. En la actualidad, según las especificaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), las vacunas deben estar constituidas por organismos vivos atenuados o bacterias muertas administradas junto con adyuvante. Dados los actuales debates en torno a la naturaleza zoonótica de MPTB, el uso de vacunas vivas, no está permitido en algunos países como Holanda. Si bien la efectividad de la vacunación para controlar la infección no está demostrada, reduce la cantidad de animales con enfermedad clínica y el número de excretores (Wentink *et al.*, 1994). Las desventajas de la vacunación, radican en que los animales se vuelven serológicamente positivos descartando la posibilidad de un diagnóstico basado en anticuerpos. Los animales vacunados también se sensibilizan a la tuberculinización con PPD bovina, utilizado en el programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina.

Dada las características de las técnicas diagnósticas, presentadas anteriormente, es necesaria la implementación de técnicas complementarias y el análisis periódico de los establecimientos para conocer el estado real de infección. La detección de animales positivos y remoción de los mismos, son normas ampliamente aceptadas (*test-and-cull*) para la erradicación de la enfermedad, sumadas a distintas pautas de manejo que se mencionarán más adelante. El estudio de los reservorios naturales de la bacteria es importante al momento del control y erradicación de la enfermedad. En nuestro país se registró un aislamiento de mouflon (*Ovis musimon*) (Bernardelli *et al.*, 2005). Este aislamiento, fue tipificado por RFLP en nuestro laboratorio, y tuvo el perfil identificado como el más abundante en nuestro país para los aislamientos bovinos (datos no publicados). En Argentina, no hay estudios de la presencia de la bacteria en fauna salvaje, aunque está proyectada su evaluación en el marco de un proyecto institucional del INTA. Se aisló *M.*



*avium*. subsp. *paratuberculosis* de distintos animales de la fauna salvaje y doméstica en diferentes regiones geográficas (

Tabla 5). Si bien la asociación con la patología no está demostrada en estos animales, se pone en evidencia que esta bacteria puede colonizar una variedad de especies, incluso monogástricas, constituyendo reservorios potenciales de la enfermedad. La posibilidad de la transmisión inter-especies y el rol de la fauna salvaje en la epidemiología de la paratuberculosis pueden condicionar la eficacia de los programas de control de la enfermedad (Greig *et al.*, 1999).

Especie*	País	Especie	País
<i>Urdus arctos</i> (Oso marrón)	Eslovaquia	<i>Alces alce</i> (Alce)	USA
<i>Dama dama</i> (Gamo)	Rep. Checa Alemania USA	<i>Mustela erminea</i> (Armiño de cola negra)	Reino Unido
<i>Ovis musimon</i> (Mouflon)	Argentina* <sup>1</sup> Rep.Checa USA Alemania	<i>Cervus elaphus</i> (Ciervo rojo)	Argentina* <sup>2</sup> Rep. Checa Escocia Irlanda N. Zelanda
<i>Pudu pudu</i> (Pudú)	Bélgica	<i>Capra hircus</i> (Cabra enana)	Alemania
<i>Camelus bactrianus</i> (camello de Bactriana)	USA	<i>Vulpes vulpes</i> (Zorro)	R. Unido
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Conejo)	R. Unido	<i>Lama pacos</i> (Alpaca)	Australia
<i>Equus asinus</i> form. Dom (Asno enano)	Holanda	<i>Macaca arctoides</i> (Macaco de cola corta)	USA

**Tabla 5. Listado de especies hospedadoras de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se incluyen especies de la fauna salvaje como animales domésticos o en cautiverio. \* junto al nombre específico, se indica entre paréntesis, el nombre vulgar correspondiente. Tabla adaptada de Pavlik *et al.*, (2000); \*<sup>1</sup>Bernardelli *et al.*, (2005); \*<sup>2</sup>Paolicchi *et al.*, (2001)

### **1.5.2. La situación actual en el control de la paratuberculosis en nuestro país.**

La paratuberculosis bovina ha sido identificada en algunas regiones de nuestro país, pero en términos generales, existe desconocimiento de la importancia real del problema. La presencia de síntomas clínicos de la enfermedad de Johne (diarrea persistente, pérdida de peso, desmejoramiento progresivo) es sólo la puesta en evidencia de una pequeña fracción del problema, ya que por cada caso clínico que se presenta en un establecimiento se estima que hay entre 4 y 8 animales con enfermedad sub-clínica y son portadores asintomáticos (Grant, 2005). En la gran “ventana” que representa el período que va desde la infección hasta la aparición de la sintomatología (entre 2 y 5 años), los animales portadores asintomáticos pueden contaminar el ambiente del lugar de cría y potencialmente infectar a otros animales o pueden ser vendidos a otros productores diseminando la enfermedad a otros establecimientos. La realidad de la enfermedad en nuestro país se presenta con una cantidad de casos subestimada. En parte, consecuencia de la inexistencia de un plan Nacional oficial que obligue al productor a informar los casos positivos. Se suma muchas veces el desconocimiento de la enfermedad por parte de los veterinarios y productores. Recientemente, se ha promovido en nuestro país el control voluntario de la paratuberculosis en establecimientos “piloto” para caracterizar la población afectada en los distintos sistemas de producción y regiones del país (INTA-Balcarce). Estos trabajos permitieron reconocer una amplia difusión de la paratuberculosis en rodeos lecheros y de carne, donde la producción se ha intensificado en los últimos años. Este modelo está basado en la experiencia institucional local (INTA) y en la de otros países donde se implementan planes de control y erradicación de la enfermedad de Johne.

Algunas medidas de manejo y prevención de la paratuberculosis son descritas a continuación:

1) Los terneros nacidos de una madre positiva son susceptibles a contraer la infección, dado que la bacteria es excretada tanto en calostro como en leche, y por la materia fecal. Los sustitutos de leche, cuando son utilizados para la alimentación de los terneros de tambo, disminuye la probabilidad de infección. El uso de pasteurizadores para el tratamiento de leche cruda y la alimentación de los terneros en las guacheras ha demostrado ser de utilidad. Donde alejar a la cría de la madre es la medida más útil.

2) Si la presencia de hembras positivas es alta, existe una alta exposición y probabilidad de contagio en los animales de reposición. Por lo tanto, las hembras de un rodeo deben ser reemplazadas con terneras de madres negativas.

3) Para determinar la tasa de infección en un rodeo, se recomiendan las técnicas serológicas como ELISA y el cultivo fecal para el aislamiento de la bacteria. Ambas técnicas aplicadas en combinación, incrementa la sensibilidad diagnóstica.

4) Las pasturas muy contaminadas no deben ser utilizadas por animales susceptibles (desde el nacimiento hasta los 6 meses). Los animales jóvenes deben ser destinados a campos con pasturas nuevas y evitar el manejo conjunto con bovinos adultos.

5) Los animales nuevos, que entran un establecimiento, deben tener un diagnóstico negativo de paratuberculosis o provenir de establecimientos que estén libres de la enfermedad por lo menos durante los 4 años previos a la compra del animal.

6) Todo programa de diagnóstico y control de la enfermedad debe extenderse por al menos 5-6 años. El abandono puede implicar un incremento en la prevalencia de la enfermedad y por lo tanto, la pérdida del esfuerzo previo en llevar a cabo el programa.

Las medidas higiénicas que preserven a las instalaciones y los alimentos, del contacto con materia fecal contaminada, sumados a las medidas asociadas al control sanitario de los adultos contribuyen al control de la transmisión en los rodeos.

### **1.6. El rol zoonótico de MPTB: Un debate abierto**

La enfermedad de Crohn en el humano es una forma de enteritis granulomatosa que fue históricamente comparada por su semejanza, con la tuberculosis intestinal. Es una enfermedad inflamatoria crónica que está caracterizada por una pérdida de peso continua, dolor abdominal y diarrea. Pese a que el íleon distal es comúnmente afectado, cualquier zona del tracto digestivo puede estar involucrada. La morbilidad es alta y aunque pueden haber remisiones temporarias, es una enfermedad de por vida. La enfermedad afecta típicamente a personas jóvenes entre 16 y 25 años. El tratamiento involucra desde anti-diarreicos, agentes anti-inflamatorios para tratar los síntomas, drogas inmunosupresoras, e incluye en muchos casos la cirugía, para remover las zonas del intestino afectadas para evitar complicaciones como obstrucciones y formación de fístulas (Grant, 2005).

La idea de que MPTB puede causar la enfermedad en el humano fue propuesta originalmente por Dalziel en 1913 (Hermon-Taylor, 2001). En 1901, este cirujano intervino quirúrgicamente a un colega con inflamación crónica intestinal. Como Dalziel tomó conocimiento para entonces de la enfermedad de Johne, recolectó evidencias con otros casos y publicó sus observaciones en la Revista Británica en 1913 (Dalziel, 1913). Escribió entonces, que las características histológicas de la enfermedad que describía en los humanos eran similares a aquellas de la enfermedad de Johne, justificando así la propuesta de que eran la misma enfermedad, pero el caso quedó abierto, dado que no pudo detectar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras analizadas (Yayo Ayee *et al.* 2001). El nombre de la enfermedad deriva de la descripción de 8 casos de *ileítis* focalizada realizada por Crohn, Ginsburg y Oppenheimer en 1932 (Crohn *et al.*, 1932), en el Hospital *Mount Sinai* de Nueva York. La idea de una etiología micobacteriana persistió con el transcurso de los años pese a la imposibilidad de detectar o aislar la bacteria y se reforzó en los años 80, con el primer aislamiento. El reporte del aislamiento de MPTB

a partir de muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn, impulsó nuevamente la especulación del posible rol de esta bacteria en la etiología de la enfermedad (Chiodini *et al.*, 1984). En ese trabajo, se describió la obtención de 3 aislamientos de *Mycobacterium* sp. (denominados por los autores “Linda”, “Dominic” y “Ben”) a partir de muestras de ileon terminal de tres pacientes con enfermedad de Crohn. El cultivo primario de estas tres cepas llevó entre 3 y 18 meses y existe también un aislamiento posterior (“Leona”), recuperado luego de 30 meses de cultivo (Chiodini *et al.*, 1986). La dificultad del aislamiento se justificaría por la presencia de las micobacterias como esferoplastos (células sin pared celular) en los tejidos humanos. En consecuencia, según lo descrito por Chiodini, las primeras formas de crecimiento *in vitro* son *Ziehl-Neelsen* negativas pero a tiempos largos de cultivo (mayores a 1 año), estas formas revierten y son positivas a la misma tinción. Este mismo hecho, justificaría el por qué no es detectada la presencia de células ácido-alcohol resistentes en los cortes histológicos de pacientes con Crohn.

Más tarde, McFadden *et al.* (1987) identificaron por técnicas moleculares a estos aislamientos como *M. paratuberculosis* (actualmente reconocida como una subespecie de la especie *avium*). A partir de este primer aislamiento, distintos grupos de investigación también han reportado el aislamiento de la bacteria en pacientes con Crohn (Sechi *et al.*, 2005). Los estudios de hibridación *in situ* utilizando como sonda la secuencia *IS900*, demostraron la presencia de ADN de MPTB en el tejido de aproximadamente el 70 % de pacientes con Crohn (Sechi *et al.*, 2001, 2004). Estos estudios fueron cuestionados, dado que no se realizó el análisis en un grupo control. Sin embargo, Romero *et al.*, (2004) obtuvieron un resultado similar en los pacientes con Crohn estudiados, mientras que ninguno de los pacientes del grupo control tuvieron señal positiva que indique la presencia de la bacteria. Estos estudios de hibridación *in situ* y otros de PCR (Collins *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2002) permiten la detección de las formas celulares sin pared en los tejidos humanos. Otra evidencia fue aportada por los ensayos serológicos. Distintos trabajos demostraron el reconocimiento de proteínas de la bacteria por parte de los pacientes con Crohn (Collins *et al.*, 2000, Naser *et al.*, 2000).

Sin embargo, que MPTB sea detectado por cultivo, PCR o hibridación *in situ* más frecuentemente en pacientes con Crohn que en los pacientes control, no implica necesariamente que dicha bacteria sea el agente causal. Esto ciertamente pone en evidencia una asociación entre la presencia de la bacteria y la enfermedad en el mismo paciente, pero no implica necesariamente una consecuencia, es decir, que la bacteria haya iniciado la enfermedad en el individuo. Este argumento fue sostenido por el Comité en Diagnóstico y Control de la enfermedad de Johne (2003). En este sentido, existen varias teorías que explicarían la presencia de MPTB en el intestino de los pacientes con Crohn. Una de ellas, postula que la presencia de la micobacteria puede ser consecuencia de una infección secundaria, también podría ser un agente que sólo coloniza el intestino sin ser virulento. Estas teorías, se contraponen a la hipótesis de que la bacteria es el agente infeccioso primario que causa la enfermedad de Crohn. La carencia de datos epidemiológicos que describan casos de

transmisión entre personas (como los que se cuenta en la tuberculosis humana), impide lograr un consenso generalizado al respecto.

Distintos estudios describen un gradiente Norte-Sur en la incidencia geográfica de la enfermedad de Crohn. Esto fue observado tanto en los países europeos, donde el estudio involucró 20 centros entre los años 1991-1994, como en Canadá (*European Commission, 2000*). Estas diferencias sugerirían que distintas variables como el clima, la dieta, el agua de consumo u otras condiciones ambientales pueden representar factores de riesgo para contraer la enfermedad en las distintas áreas geográficas del mundo. Si la hipótesis de que la enfermedad de Crohn en humanos es causada por MPTB, y que la bacteria deriva de la infección de animales con paratuberculosis, se esperaría una convergencia o solapamiento entre la incidencia geográfica y la prevalencia de las dos enfermedades. La ausencia de datos confiables de prevalencia, especialmente de paratuberculosis en las áreas donde se cuenta con datos precisos de incidencia de la enfermedad de Crohn, impide llegar a una conclusión en ese sentido. Por otro lado, es posible que tal como ocurre en los animales, los signos de la enfermedad en el humano se manifiesten luego de muchos años de la infección, por lo tanto, el análisis comparativo de incidencia actual de Crohn debería realizarse con los datos retrospectivos de incidencia de paratuberculosis (10-15 años anteriores), nuevamente, la ausencia de estos datos hacen imposible dicho análisis.

La discusión ha sido planteada y subsiste a la fecha el debate en distintas Reuniones científicas y revistas de impacto internacional (*European Commission, 2000, Committee on Diagnosis and Control of Johne's disease, 2003, National Association for colitis and Crohn's disease, 2003, Hermon-Taylor, 2001, Roholl et al., 2002*). Las distintas asociaciones mantienen una posición neutral a escéptica, en la que sostienen que “no hay evidencias suficientes que confirmen o descarten la etiología zoonótica de la enfermedad de Crohn”. Sin embargo, muchas no niegan una evidente asociación entre la presencia de la bacteria y la enfermedad. En este sentido, llama la atención el reporte derivado de la Reunión conjunta de la WHO/FAO/OIE sobre enfermedades zoonóticas emergentes, realizada en Mayo de 2004 en Suiza. Allí se menciona a las enfermedades que son consideradas “zoonosis clave” de interés en la región, y la paratuberculosis aparece mencionada como una de estas enfermedades (WHO/FAO/OIE, 2004). Fuera de este reporte, de acuerdo a nuestro conocimiento, no existe ningún otro documento derivado de Organizaciones Nacionales o Internacionales, donde se puntualice el rol zoonótico de la bacteria. Los investigadores que sostienen la línea del rol zoonótico de MPTB, hacen hincapié en distintos factores, que inducen justificadamente a pensar en que deben tomarse medidas tendientes a controlar la problemática. Estos factores se discuten a continuación.

1- Las vacas de tambo con infección subclínica pueden excretar MPTB en su leche. Es una de las vías por las cuales la bacteria puede pasar desde la madre a la cría cuando ésta es más susceptible. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* es más resistente al calor que *M. bovis*, recordemos que las condiciones de tiempo y temperatura de la pasteurización fueron diseñados para matar esta

bacteria. La destrucción de la totalidad de los organismos viables utilizando la actual metodología de pasteurización (72 °C, 15 s), no está garantizada. Un estudio llevado a cabo por el Departamento de Agricultura y desarrollo Rural, en la Universidad de Queen, Belfast, encontró que el 1,7 % de las leches pasteurizadas muestreadas en Gran Bretaña, contenían MPTB cultivables. Esta exposición frente a esta bacteria potencialmente zoonótica, convierte a esta situación en una situación similar a la exposición frente a *M. bovis*, previo a la introducción de la pasteurización en la mitad del siglo 20. Distintos grupos han aislado al bacilo a partir leche pasteurizada. Muchos estudios se realizaron bajo condiciones de estudio experimental, aunque otros analizaron leches luego del proceso industrial de pasteurización o listas para el consumo (Chiodini y Hermon-Taylor, 1993, Grant *et al.*, 2002; Hope *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 2004). En nuestro país existe un reporte sobre el aislamiento de la bacteria a partir de leches comercializadas (Cirone *et al.*, 2007). Pese a que los resultados al respecto son discordantes, se puede afirmar que ocasionalmente algunas bacterias viables pueden sobrevivir al proceso de pasteurización. Los factores involucrados son desconocidos, pudiendo contribuir a su resistencia térmica, el número inicial de bacterias y la tendencia a agregarse de las mismas.

2- Los animales infectados excretan MPTB en las pasturas. Los reservorios salvajes contribuyen a la diseminación y a la contaminación en el ambiente. Los problemas causados por esta micobacteria difieren a los causados previamente por *M. bovis* en que MPTB puede sobrevivir por largos períodos en el ambiente (Whittington *et al.*, 2005). Es probable que MPTB sea tomado del ambiente por amebas y que en estas pueda sobrevivir. El agua tomada de lagos y ríos contaminados constituye un nexo entre la bacteria y la población. Es inevitable que las poblaciones que comparten la misma región geográfica con animales infectados extensivamente, estén expuestos a este patógeno.

Sin lugar a dudas, es necesaria la convergencia de estudios multidisciplinarios para la obtención de resultados concluyentes y poder así evaluar la verdadera naturaleza de la etiología de la enfermedad de Crohn. Sin embargo, hasta tanto no se cuente con evidencias suficientes para desestimar su ingerencia en esta patología, es imperativo tomar las medidas necesarias para disminuir la incidencia de la bacteria en los rodeos y así disminuir el riesgo del contacto de la bacteria con el humano a través del consumo de agua y alimentos contaminados.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1. Identificar antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB).

- Construir una genoteca de expresión utilizando el vector  $\lambda$ -ZapII.
- Realizar un análisis inmunológico de la genoteca empleando sueros de animales con paratuberculosis y sueros hiperinmunes generados en animales de experimentación.
- Caracterizar las secuencias derivadas de este análisis.

### 2.2. Estudiar en MPTB, la presencia de distintos antígenos homólogos presentes en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*.

### 2.3. Caracterizar los antígenos seleccionados en los puntos 2.1 y 2.2.

- Estudiar la expresión de los antígenos en otras especies micobacterianas, por medio de antisueros hiperinmunes específicos.
- Caracterizar la respuesta inmunológica humoral con un panel de sueros de animales sanos y con paratuberculosis por técnicas de *immunoblot*.

### 2.4. Evaluación “a campo”, de la respuesta inmunológica celular de los antígenos recombinantes derivados de los puntos 2.1 y 2.2, y de diferentes Derivados Proteicos Purificados (PPD) en rodeos bovinos infectados con paratuberculosis de nuestro país.

- Evaluar la capacidad de estimular la liberación de  $\gamma$ IFN de los antígenos y combinaciones antigénicas.
- Producir una PPD a partir de un aislamiento local de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y evaluar comparativamente la respuesta de los animales estudiados a las PPD de referencia.
- Evaluar la presencia de los antígenos estudiados en las distintas PPDs empleadas en este análisis.

### 2.5. Seleccionar con los animales del muestreo “a campo”, un antígeno recombinante candidato para la evaluación de la respuesta humoral por la técnica de enzimo-inmuno-ensayo (ELISA).

- Evaluar la posibilidad de implementar un diagnóstico serológico en leche.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1- Descripción general del sistema utilizado para la construcción de la genoteca de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

##### Vector de clonado y expresión

En el presente trabajo, se utilizó el vector de expresión  $\lambda$  Zap II (Stratagene). Este vector tiene 6 sitios únicos de clonado pudiéndose insertar fragmentos de ADN de hasta 10 kb de longitud.  $\lambda$  Zap II permite la escisión *in vivo* y recircularización de cada inserto clonado para obtener el *fagémido* p-Bluescript (forma híbrida entre un fago y un plásmido). Este evento posibilita el análisis de la secuencia clonada en un sistema plasmídico (Figura 5). El plásmido p-Bluescript tiene un sitio múltiple de clonado flanqueado por las secuencias de los promotores T3 y T7, estas pueden ser empleadas para secuenciar el inserto de ADN clonado. El promotor lacZ dirige la expresión de proteínas de fusión para ensayos de *Western blot* o purificación de proteínas, mientras que el gen *lacZ*, es requerido para estrategia de selección, basada en la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

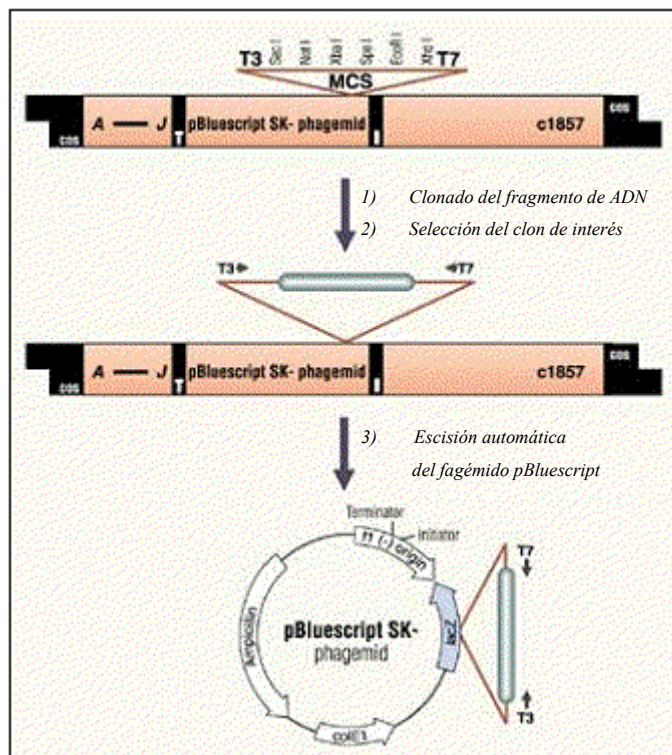


Figura 5. Descripción del sistema  $\lambda$ -Zap (Stratagene). Se muestran los sitios de clonado y la escisión automática del fagémido pBluescript.



**Cepa hospedadora utilizada en los ensayos.** La utilización de *E. coli* XL1-Blue MRF' como cepa hospedadora, en presencia de los sustratos correspondientes, optimiza la diferenciación de la coloración producida por los fagos no recombinantes (placas de lisis azules), de la de los fagos recombinantes (placas de lisis incoloras), mediante el mecanismo de  $\alpha$ -complementación de *lacZ*. El episoma F' presente en XL1-Blue tiene dos propósitos fundamentales. El primero, el episoma contiene la mutación  $\Delta M15$  del gen *lacZ* requerido para la  $\alpha$ -complementación del amino terminal del gen *lacZ* presente en el vector  $\lambda$  Zap, generándose entonces la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La inserción de un fragmento de ADN en el sitio múltiple de clonado, dentro del gen *lacZ*, interrumpe la funcionalidad de este gen, resultando en placas de lisis incoloras. La segunda función del episoma F' es que este, contiene los genes para a expresión del *pili* bacteriano F', que es requerido para la infección de los fagos filamentosos. La conversión de un clon  $\lambda$  Zap a *fagémido* p-Bluescript, requiere de la superinfección con un fago filamentosos (fago *helper* o asistente), el fago R408. Finalmente, el episoma F' contiene el represor *lac* que bloquea la transcripción en ausencia del inductor, IPTG. Este episoma es mantenido selectivamente en presencia de tetraciclina, dado que este contiene también el transposón Tn10 que codifica para el gen de resistencia a la tetraciclina.

### **3.2- Construcción de la genoteca**

#### **3.2.1. Clonado en el sistema $\lambda$ ZapII**

**Digestión del ADN de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se utilizó para la construcción de la genoteca, el ADN genómico de un aislamiento salvaje de MPTB. Con el objetivo de realizar una digestión parcial del ADN, fueron seleccionadas enzimas con alta frecuencia de corte en el genoma micobacteriano y cuyos sitios de restricción fueran compatibles con los presentes en el sitio múltiple de clonado del vector  $\lambda$ -Zap. Se trabajó con las enzimas *PvuII* y *EaeI*, (New England BioLabs). Se evaluaron distintos tiempos de digestión y relaciones ADN:enzima. En base al patrón de digestión observado, se decidió utilizar el ADN de MPTB digerido con *EaeI*. Este sitio es compatible con el sitio de clonado *NotI* del vector  $\lambda$  -Zap II. Se evaluaron distintos tiempos de digestión a 37°C, de 20 min a 180 min y distintas condiciones de inactivación de la enzima. Se empleó un protocolo de inactivación térmica a 65 °C por 20 min (siguiendo las indicaciones del fabricante) y de 75 °C por 1 h. También fue evaluada la inactivación química de la enzima empleando EDTA 12,5 mM.

**Digestión del vector.** Previo a la digestión del vector, se ligaron los sitios *Cos* de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Luego se digirió la totalidad del vector pre-ligado (2  $\mu$ g) con 5 U de la enzima *NotI* (Promega) en un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción de digestión se realizó a 37 °C durante 1 h. Luego se trató con 1 $\mu$ L de fosfatasa alcalina (Promega) por 30 min a 37 °C. Por

último, se concentró el ADN por precipitación por alcohol, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (1989) y se resuspendió en *buffer* TE.

**Ligación del ADN bacteriano con el ADN del vector.** Se ligó 1 µg del vector con 0,4 µg del ADN digerido. La ligación se realizó con la enzima ADN ligasa T4 (Promega). La reacción de ligación transcurrió a 4 °C por 16 h.

**Empaquetamiento de los fagos.** Se utilizó el extracto de empaquetamiento *Gigapack III Gold* (Stratagene) y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se descongeló el extracto de empaquetamiento y se le agregó 50 µL del extracto al ADN ligado. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Luego se agregó 0,5 mL de *buffer* SM (NaCl 0,58 %, MgSO<sub>4</sub> 0,2 %, Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 y gelatina 0,01 %), 20 µL de cloroformo y se conservó a 4 °C.

**Evaluación de la eficiencia de la ligación y empaquetamiento.** Se incubó la reacción de empaquetamiento con 200 µL de *E. coli* XL1-Blue crecidas a una DO<sub>600</sub> de 0,5 en medio Luria Bertani (LB) (NaCl 10 g, Bacto-triptona 10 g y extracto de levadura, 5 g por litro) adicionado con maltosa 0,2 % (p/v) y MgSO<sub>4</sub> 10 mM. La incubación se realizó con agitación durante 15 min, luego se agregó 3 mL de agarosa 0,6 % (*top agar*), preparada en medio LB. Previamente el *top agar* fue disuelto al microondas, luego de templar (48 °C), se lo adicionó con 50 µL de X-Gal 250 mg/mL disuelta en dimetilformamida y 15 µL de IPTG 0,5 M. La mezcla se plaqueó inmediatamente en placas conteniendo LB-agar y se incubó a 37 °C entre 6 y 10 h hasta la visualización de placas de lisis. Se procedió luego al recuento de las placas para el cálculo de las UFP/mL (Figura 6).

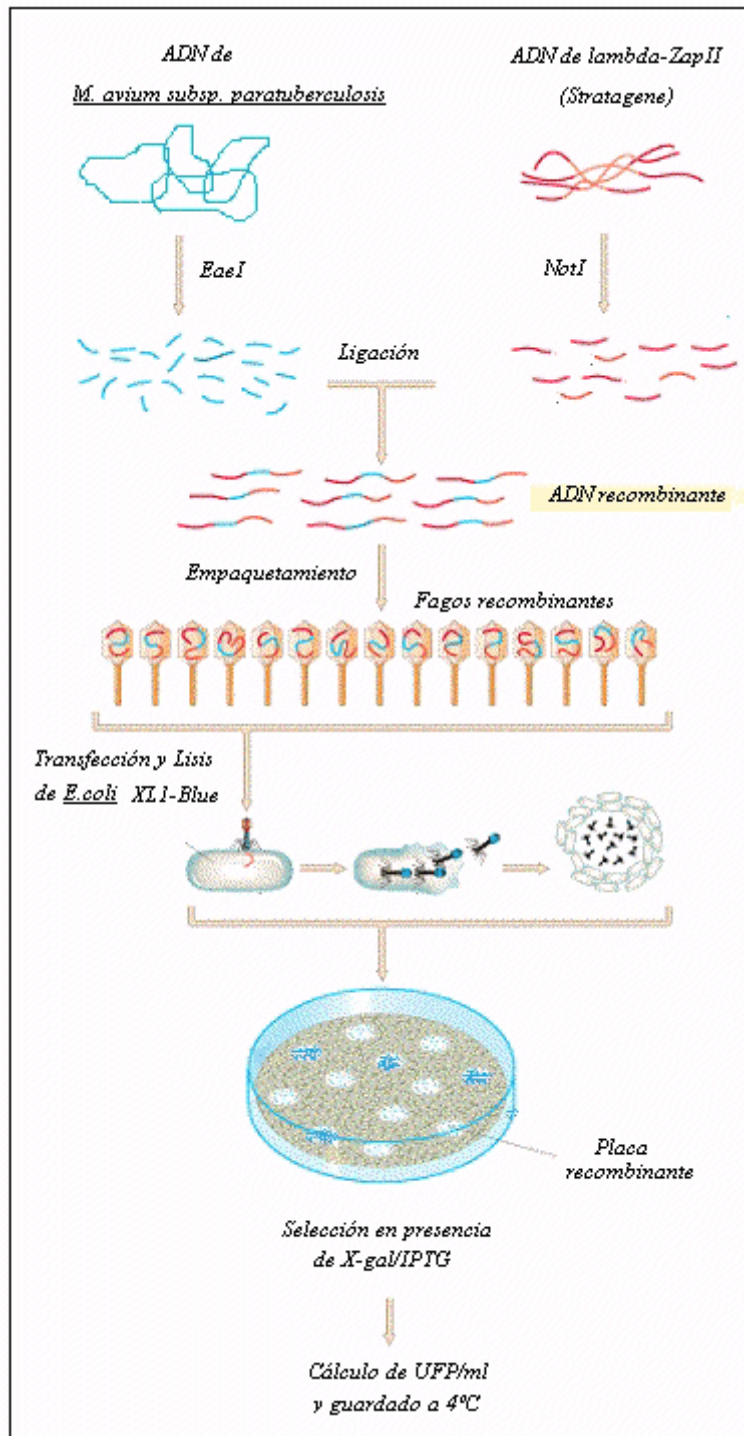


Figura 6. Representación simplificada de la construcción de la genoteca de *M. avium subsp. paratuberculosis* en el vector  $\lambda$ -ZapII (Stratagene).

**Amplificación de la genoteca.** Se amplificó la genoteca, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se mezclaron alícuotas de los fagos empaquetados con 600  $\mu$ L de bacterias *E. coli* XL1-Blue ajustadas previamente a una  $DO_{600}$  de 0,5, se realizaron diluciones adecuadas de las alícuotas para obtener aproximadamente 50.000 clones recombinantes por placa de Petri y se incubó durante 15 min a 37 °C. Se mezclaron las células transfectadas con 7 mL de *top agar* a 48 °C, se plaqueó en placas de Petri de 150 mm de diámetro conteniendo LB-agar y se incubaron de 5 a 8 h a 37°C. Luego se le agregó a cada placa 10 mL de *buffer* SM (NaCl 0,58 %,  $MgSO_4$  0,2 %, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 y gelatina 0,01 %) y se incubaron a 4 °C en agitación toda la noche. Al día siguiente se recuperaron las suspensiones de fagos, se lavaron las placas con 2 mL adicionales de *buffer* SM y se mezclaron las distintas fracciones. Se removieron los restos celulares por centrifugación a 4.000 xg, se recuperó el sobrenadante, se agregó cloroformo al 0,3 %, luego se fraccionó en alícuotas y se conservó a 4 °C hasta su utilización. De una fracción, se realizaron diluciones seriadas y mediante el protocolo descrito previamente, se tituló la genoteca amplificada en presencia de X-Gal/IPTG.

### 3.2.2. Evaluación inmunológica de la genoteca de expresión

Para los ensayos de inmunodetección (análisis primario) se utilizaron bacterias *E. coli* XL1-Blue crecidas en medio LB conteniendo tetraciclina 12,5  $\mu$ g/mL. Para cada ensayo en placa de Petri de 150 mm se utilizaron 0,6 mL de células, las cuales fueron infectadas con aproximadamente  $5 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  unidades formadoras de placas. Se utilizaron 7 mL de *top agar*. Luego de incubar a 37 °C durante un período no inferior a 4 h, se cubrió la superficie de la placa con un disco de nitrocelulosa de 150 mm de diámetro (*Hybond-ECL*, Amersham Biosciences) para la transferencia de las placas de lisis. La nitrocelulosa fue embebida previamente en una solución de IPTG 10 mM durante unos 10 min. Las placas de Petri fueron incubadas toda la noche a 37 °C. Luego de este período se realizaron marcas de orientación con una jeringa embebida en tinta china y se retiró la membrana. Esta fue lavada con *buffer* TBS (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01M pH 7,5) varias veces y se procedió al bloqueo en TBS-leche descremada 5 % para el posterior análisis con sueros animales por *Western blot*. Las placas se conservaron a 4 °C hasta la obtención de los resultados del inmuno-análisis.

**Sueros animales.** Para el análisis de los clones recombinantes se utilizaron dos metodologías. En la primera, se seleccionaron bovinos con paratuberculosis subclínica y clínica. Estos animales eran seropositivos para la prueba de ELISA-PPA (que utiliza el antígeno protoplasmático de *M. avium* comercializado por Allied Monitor) y tenían aislamiento positivo de la bacteria a partir de materia fecal. Uno de ellos, presentó sintomatología diarreica y lesiones compatibles con paratuberculosis (PTB) a nivel de intestino, comprobadas por necropsia. Fueron seleccionados preferentemente aquellos con marcada inmunoreactividad frente al extracto de proteínas totales de la micobacteria.

Estos sueros fueron utilizados conjuntamente (*pool*es). Estos sueros, como los resultados serológicos y bacteriológicos, fueron provistos por el Dr. Fernando Paolicchi (Dpto. de Producción animal, EEA-INTA Balcarce). La segunda estrategia, consistió en la obtención de sueros hiperinmunes inmunizando ratones BALB/c tanto con bacterias enteras inactivadas como con lisados obtenidos por sonicación. Se seleccionaron los sueros de aquellos animales con mayor reconocimiento de las proteínas de la bacteria. Los sueros murinos y bovinos fueron diluidos 1/200 con el *buffer* de inmunoanálisis (TBS-leche 5%, azida sódica 0,05 %, nonidet P400 1 %).

**Absorción de anticuerpos anti-*E. coli*.** Los sueros fueron absorbidos previamente a su utilización para eliminar o disminuir la presencia de anticuerpos anti-*E. coli*. Para la absorción de los sueros, se procedió de acuerdo a los protocolos descritos en el manual de laboratorio *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989). El primero consistió en la absorción con extracto de *E. coli* para lo cual se hizo crecer a saturación un cultivo de *E. coli* XL-blue en 100 mL de medio LB. Se cosecharon las células por centrifugación a 5.000 xg por 10 min a 4 °C y luego fueron resuspendidas en 3 mL de Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM. Se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se descongelaron en baño de agua a 37 °C, para luego sonicar aplicando varios ciclos de 20 s en hielo. El extracto se centrifugó a 12.000 xg por 10 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Para la absorción del suero, se agregaron 0,5 mL del lisado a la dilución del suero a absorber, previamente diluido en 5 % de leche descremada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 4 h en agitación. Como los anticuerpos anti-*E.coli* fueron difíciles de eliminar con el protocolo descrito, se realizó una absorción adicional utilizando un filtro de nitrocelulosa, el cual se había depositado en una placa de Petri conteniendo un césped de *E. coli* XL-Blue. Se incubó el suero previamente diluido junto a la membrana en agitación durante 3 h a 4 °C.

**Inmuno-detección de las UFP recombinantes seroreactivas.** Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas de 2 a 4 h en agitación con los sueros de los animales diluidos en el *buffer* de inmunoanálisis. La detección del complejo antígeno-anticuerpo fue realizada con anticuerpos secundarios acoplados a la enzima fosfatasa alcalina. En el caso del análisis con los sueros bovinos como anticuerpo primario, fue utilizado un anti-IgG anti-bovino (Sigma-Aldrich), diluido 1/3000, mientras que en el caso de los sueros murinos, un anti-IgG anti-ratón (Sigma-Aldrich), empleando el mismo factor de dilución. Los complejos antígeno-anticuerpo primario-anticuerpo secundario fueron detectados usando el sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) en combinación con nitro blue tetrazolium (NBT). La solución de revelado consistió en 33  $\mu$ L de NBT (50 mg/mL) y 16,5  $\mu$ L de BCIP (50 mg/mL) cada 5 mL de *buffer* para fosfatasa alcalina (Tris-Cl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Se realizó una réplica de la señal positiva en la membrana en una hoja de acetato transparente, que se utilizó de plantilla para identificar en la placa original la

posición de las UFP inmunoreactivas. Con un sacabocados, se tomó esa porción de agar conteniendo el clon positivo, y se resuspendió en 0,25 mL de *buffer* SM (NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,4). Se dejó toda la noche a 4 °C para la elución de los fagos. Se realizaron diluciones de los mismos y se procedió a repetir el procedimiento de plaqueo y análisis como se describió anteriormente, pero en placas de Petri de 90 mm (*screening* secundario). El proceso fue repetido hasta la obtención de una población homogénea inmunoreactiva de fagos para la selección unívoca de una única placa de lisis. Los fagos correspondientes a esta UFP, aislada fueron eluidos para luego escindir el *fagémido* p-Bluescript.

**3.2.3. Escisión automática *in vivo* del plásmido pBluescript a partir del vector  $\lambda$ - Zap II.** Para la escisión, se utilizó 200  $\mu$ L de células *E. coli* XL1-Blue (DO<sub>600</sub>=1) que se transfectaron con 50  $\mu$ L de los fagos en solución (que representan un único clon) y 1  $\mu$ L del fago filamentoso R408 (fago *helper*, con un título aproximado de 1x10<sup>6</sup> UFP/mL), la escisión depende de la coinfección con este fago que aporta funciones en *trans*. La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 min y luego se agregó 1 mL de medio LB y se incubó por 3 h adicionales con agitación, permitiendo la circularización del ADN a empaquetar y la secreción. Posteriormente, se eliminaron las células incubando a 70 °C durante 20 min en termobloque, luego se centrifugó por 5 min a 4.000 xg y se guardó a 4 °C el sobrenadante conteniendo el *fagémido* p-Bluescript. Para obtener el ADN doble cadena y recuperar el plásmido, se procedió de la siguiente manera. En un tubo tipo *epENDORF* conteniendo 50  $\mu$ L de XL1-Blue (DO<sub>600</sub>=1), se agregó 50  $\mu$ L del *fagémido* p-Bluescript obtenido en el paso anterior, y se incubó a 37 °C durante 15 min. Luego se plaqueó en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubó toda la noche a 37 °C para la obtención de las UFC.

**3.2.4. Análisis del tamaño promedio de inserto representados en la genoteca.** Con este fin, se seleccionaron 10 UFP recombinantes al azar, se eluyeron los fagos, y se escindió el *fagémido* p-Bluescript. Una vez obtenido el plásmido en *E. coli*, y luego de cultivar la bacteria en medio LB, se procedió a extraer el mismo empleando el protocolo de mini-preparaciones de ADN plasmídico para luego liberar el fragmento de ADN clonado por digestión con las enzimas *EcoRI* y *SacI* (Promega), cuyos sitios están ubicados en los extremos del sitio múltiple de clonado de p-Bluescript. Se digirió el ADN plasmídico de cada clon con 10 U de cada enzima, en un volumen final de 20  $\mu$ L. La reacción de digestión se realizó a 37 °C durante 1 h 30 min.

**3.2.5. Evaluación de la expresión del producto de fusión en *E. coli*.** Con este objetivo se cultivaron las bacterias *E. coli* XL1-Blue recombinantes en medio LB con ampicilina y se indujeron a una DO<sub>600</sub> de 0,5 con IPTG 5 mM. Luego de un tiempo de inducción de 3 h, se recolectó una fracción de 1 mL del cultivo, se centrifugó a 12.000 xg, se resuspendió el *pellet* en 200  $\mu$ L de *buffer* de siembra (SDS 2 %, 0,125 M Tris HCl 0,125 M pH 6,8, 2-mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0,02 %, glicerol 10 %) y se trató a las muestras a 100 °C durante 5 min. Las proteínas del extracto fueron procesadas para su evaluación por *Western blot* utilizando como primer anticuerpo, el suero utilizado para la inmunodetección de los fagos de la genoteca.

### **3.3. Secuenciación.**

Todas las construcciones obtenidas en el presente trabajo fueron secuenciadas. Las secuencias fueron obtenidas utilizando el sistema *Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Core* (Applied Biosystem) en un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem) y fueron realizadas en el servicio de secuenciación del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola-INTA. Para la reacción de secuenciación, se usaron los oligonucleótidos universales correspondientes, salvo indicación.

### **3.4. Extracción de ADN micobacteriano.**

Se centrifugó una fracción del cultivo de micobacterias a 10.000 xg durante 20 min, se fraccionó en tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL y se procesó la masa celular de acuerdo al protocolo descrito por van Embden *et al.* (1992). Se resuspendió el *pellet* celular en 400  $\mu$ L de TE (solución equilibradora de pH o *buffer*), (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) y se expuso a una temperatura de 80 °C para inactivar las bacterias. Para lisar las células y liberar el ADN, se realizó un tratamiento enzimático. Primeramente, se digirió la pared con 50  $\mu$ L de lisozima 10 mg/mL (Promega), se incubó toda la noche a 37 °C. Después se agregó 100  $\mu$ L de SDS 10% y 10  $\mu$ L de proteinasa K 10 mg/ mL (Promega) y se incubó a 65 °C por 10 min. Posteriormente, los restos de pared, proteínas desnaturalizadas y polisacáridos fueron acomplejados a CTAB para su subsecuente eliminación, para lo cual se agregó 100  $\mu$ L de NaCl 5M y 100  $\mu$ L de una solución de CTAB-NaCl (4,1 % de NaCl, 10 % de N-cetil-N,N,N,-trimetil bromuro de amonio), se vortexeó por 30 s, y se incubó a 65 °C por 10 min. El ADN fue purificado de la solución luego del agregado de 750  $\mu$ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se vortexeó y se centrifugó a 12.000 xg por 5 min a temperatura ambiente. Luego se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Para concentrar el ADN, se agregó 450  $\mu$ L de isopropanol frío y se dejó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó para precipitar el ADN, se realizó un lavado con 1 mL de etanol 70 % y luego de centrifugar y de evaporar el alcohol, se resuspendió en 20  $\mu$ L de *buffer* TE 0,1X. Se corrió el producto obtenido en gel de agarosa 0,8 % para evaluar la integridad y concentración del ADN, se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### 3.5. Amplificación génica por PCR

Los oligonucleótidos diseñados (Tabla 6) fueron evaluados con el programa *OligoAnalyzer 3.0*, IDT SciTools (<http://www.idtdna.com/analyzer/application/OligoAnalyzer/default.aspx>) y fueron sintetizados por Alpha DNA (Montreal, Canadá).

**Condiciones de amplificación.** La mezcla de amplificación consistió en *buffer* Taq (Tris-HCl 10 mM pH 9; KCl 50 mM y Tritón X-100 0,1 %), MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y 0,2 mM de cada dNTP, 1 μM de cada oligonucleótido iniciador (Tabla 6), 2 μL de ADN cromosómico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y 1,25 U de Taq polimerasa (Promega), se llevó a un volumen final de 50 μL con agua milli-Q. La mezcla de reacción fue cubierta con un volumen de aceite mineral. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research). Las condiciones fueron las siguientes, un paso inicial de desnaturalización de 96 °C por 3 min y 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 1 min a la temperatura de hibridación de cada par de oligonucleótido (T<sub>m</sub>), 1 min de extensión a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 10 min. El tiempo de extensión se incrementó de acuerdo al tamaño del gen a amplificar. En los casos que fue requerido (Tabla 6), se utilizó un protocolo de *touch down*, en el que luego del paso inicial de desnaturalización se realizan 10 ciclos en los cuales se va disminuyendo la T de hibridación, 1 °C por ciclo, desde una temperatura igual a T<sub>m</sub> + 5 °C hasta una temperatura de T<sub>m</sub>-5 °C, para luego proceder con 30 ciclos con la T<sub>m</sub> estimada y la extensión final a 72 °C por 10 min. El producto de PCR fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa de concentración apropiada preparado en *buffer* TAE (Tris-acetato 10 mM pH8, EDTA 1mM) para lo cual se utilizó una fuente de poder Bio-Rad utilizando un voltaje constante de 90V. El bromuro de etidio (0,5μg/mL), se adicionó a la preparación de agarosa. Para la visualización del producto amplificado se expuso el gel en un transiluminador a la luz ultravioleta.





37 °C para visualizar las UFC, se seleccionaron al menos 5 colonias blancas, para la evaluación de la presencia del inserto. Luego de crecer a 37 °C por 18 h en caldo nutritivo LB, se procedió a la extracción de ADN plasmídico y posteriormente se corroboró por digestión, la liberación de un fragmento del tamaño correspondiente al gen de interés, utilizando las enzimas de restricción apropiadas (Tabla 6). Este fragmento fue extraído del gel de agarosa y purificado utilizando el sistema comercial, descrito anteriormente. Para el clonado y propagación de los plásmidos se transformaron cepas de *E. coli recA, endA*. En particular se utilizó la cepa *E. coli DH5α*.

**Ligación al vector de expresión.** El ADN a ligar (inserto) y el ADN del vector de expresión, pRSET (Invitrogen) (ver ítem 3.9.1), previamente digerido con las mismas enzimas que el inserto, fueron cuantificados por corrida electroforética en gel de agarosa y por comparación con los fragmentos derivados de la digestión del genoma de fago  $\lambda$  (Promega) con la enzima *Hind* III (Promega). Para la reacción de ligación se utilizó una relación molar 1:1, utilizando 25 ng de ADN del vector 1  $\mu$ L de *buffer* ligasa 10X, 1  $\mu$ L de la enzima T4 ligasa (Promega) por reacción de ligación, llevando a un volumen final de 10  $\mu$ L con agua *milli-Q* estéril. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C durante 18 h para luego transformar bacterias químicamente competentes.

**3.7. Transformación bacteriana.** Para la transformación bacteriana se utilizó el siguiente protocolo. Se utilizaron bacteria *E. coli* competentes por el método químico de  $Cl_2Ca$  preparadas según Sambrook *et al.*, (1989). Se adicionó 5  $\mu$ L del ADN plasmídico proveniente de la reacción de ligación a 50  $\mu$ L de células competentes y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se incubó en baño de agua a 42 °C por 1 min 30 seg para luego incubar durante 3 min en hielo. Luego se agregó 200  $\mu$ L de medio LB (sin antibiótico) y se incubó con agitación a 37 °C durante 30 min para recuperar las células.

**Selección de los transformantes.** Se plaquearon las células transformadas en placas de Petri con medio LB-agar conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL) o el antibiótico apropiado. Se utilizó adicionalmente cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) en el caso de utilizarse la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Para confirmar la presencia de clones recombinantes, se digirió el ADN plasmídico con las enzimas apropiadas o se amplificó el gen de interés por PCR, utilizando las condiciones descritas anteriormente en la Tabla 6.

**3.8. Minipreparaciones de ADN plasmídico.** Para la extracción del ADN plasmídico (ADNp), se utilizó el sistema comercial de columnas *GFX microplasmid prep* (Amersham Biosciences). Se procesó un volumen de cultivo no inferior a 3 mL, utilizándose el protocolo de centrifugación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Alternativamente se empleó el protocolo de extracción descrito en el manual de procedimientos de laboratorio *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.9. Expresión de proteínas recombinantes.

#### 3.9.1. Descripción del sistema de expresión pRSET y células empleadas para la expresión heteróloga.

Se utilizó el sistema pRSET (Invitrogen) como vector para la expresión de los genes. La presencia del promotor del fago T7, permite un alto nivel de expresión de los genes clonados en el vector. La secuencia de ADN queda posicionada río abajo y en fase con una secuencia que codifica para un péptido N-terminal, (esta secuencia contiene el ATG) y a una secuencia de poli-histidinas. De esta manera, la proteína fusionada a esta secuencia de poli-histidinas puede ser purificada por cromatografía de afinidad por unión a metales divalentes como níquel o cobalto. El vector contiene el gen *bla* que codifica para una enzima ( $\beta$ -lactamasa) que inactiva a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, permitiendo la selección de transformantes en presencia de ampicilina (Figura 7).

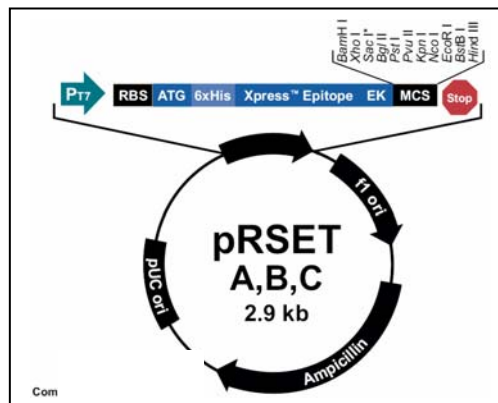


Figura 7. Mapa del vector pRSET A, B y C (Invitrogen).

Para la expresión de los genes regulados por el promotor T7 se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Esta cepa de genotipo F<sup>-</sup>, *ompT*, *hdsS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$  (DE3), codifica para el bacteriófago lisogénico  $\lambda$  DE3, que contiene el represor *lac* (gen *lacI*), el gen de la ARN polimerasa T7, bajo el control del promotor lacUV5 y el fragmento  $\alpha$  del gen *lacZ*. La expresión de la ARN polimerasa T7, se induce con la adición de IPTG. Debido a la alta actividad de la ARN polimerasa T7, puede ocurrir una inducción basal del gen de interés en células no inducidas con IPTG. Alternativamente, se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS de genotipo F<sup>-</sup>, *ompT*, *hdsS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*, *dcm* (DE3) pLysS (Cam<sup>r</sup>). Esta cepa posee el plásmido pLysS que produce la lisozima T7, un inhibidor natural de la polimerasa T7, de esta manera se reducen los niveles basales (en ausencia de inducción) del gen de interés. Esto resulta de particular importancia cuando se desean expresar genes tóxicos para las células, que pueden afectar la tasa de crecimiento, inducir inestabilidad del vector o incluso causar la muerte celular. Por otro lado, la enzima tiene la capacidad de romper la pared de peptidoglicano de *E. coli*, optimizando la lisis celular mediante el proceso de congelado-descongelado previo a la purificación de proteínas. El plásmido pLysS también confiere resistencia al cloranfenicol (Cam<sup>r</sup>). El uso de este antibiótico durante el cultivo previene la pérdida de dicho plásmido durante los sucesivos cultivos e inducción.

**3.9.2. Evaluación de las condiciones óptimas de expresión de las proteínas recombinantes.** Se inoculó una colonia recombinante en 5 mL de medio LB conteniendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (y 34  $\mu$ g/mL de cloranfenicol en caso de utilizar células *E. coli* BL21-pLys). Las bacterias se crecieron a 37 °C en agitación por 16 h. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1/50 en medio fresco suplementado con antibiótico y se creció hasta una DO<sub>600</sub> entre valores de 0,4-0,6. Se agregó IPTG 1 mM y se continuó creciendo el cultivo en agitación. Se tomaron fracciones del cultivo a intervalos de 1 h, para determinar el tiempo de inducción óptimo. Las células se cosecharon por centrifugación y se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento.

**Evaluación de la expresión de la proteína recombinante.** Las células inducidas con IPTG y conservadas a -80 °C fueron descongeladas y resuspendidas en el mismo volumen de *buffer* de muestra (SDS 2 %, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, 2-mercaptoetanol 1 %, azul de bromofenol 0,02 %, glicerol 10 %). Las células fueron lisadas por calor en baño de agua por 5 min. Se sembró un volumen de la muestra en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y las proteínas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE). Se evaluó la expresión de la proteína recombinante por tinción del gel con azul de *Coomassie* y separadamente se la identificó por *Western blot* (estos protocolos se describen más adelante).

**3.9.3. Purificación proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad a metales.** Luego de evaluar la correcta expresión de la proteína recombinante, se procedió a la purificación de la misma por cromatografía de afinidad a metales. Se partió de un volumen de cultivo de entre 200 mL y 900 mL, dependiendo de la expresión de la proteína, el cual fue inducido a una  $DO_{600}$  de 0,4 utilizando 1 mM de IPTG de concentración final, por un tiempo mínimo de 3 h. Luego de transcurrido el tiempo de inducción, se centrifugaron las células a 10.000 xg por 20 min a 4 °C. Se resuspendieron en 10 mL de *buffer* de unión (en el mismo *buffer* transcurre la lisis y la unión de la proteína a la resina), para disminuir las interacciones inespecíficas se agregó imidazol 5 mM. La lisis de las bacterias y la disrupción de los ácidos nucleicos se completó por sonicación, con 3 pulsos de 30 s en un sonicador Branson 250 (VWR Scientific), con intervalos de incubación de 1 min en hielo. Posteriormente a la lisis, se centrifugó a 5.000 xg por 25 min para remover los restos celulares insolubles y se procedió a purificar las proteínas a partir del sobrenadante recuperado. La proteína recombinante se purificó utilizando la resina Ni-NTA *ProBond* (Invitrogen). La secuencia *His-Tag* une los cationes Ni inmobilizados a la resina, que emplea el ácido nitriloacético (NTA) como quelante, ya que tiene 4 sitios disponibles para la interacción con iones metálicos. El protocolo estandarizado consistió en la utilización de 1 mL de resina, que se activó por sucesivos pasos de centrifugación y lavados en el *buffer* de unión (equilibración de la resina). Se agregó la resina al sobrenadante proveniente de la centrifugación del lisado bacteriano, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en un agitador orbital (sistema de unión *in batch*). Luego, se equilibró una columna cromatográfica de vidrio de 20 cm de longitud y se reguló el flujo óptimo de salida y posteriormente, se procedió a los lavados de la resina con 20 volúmenes del *buffer* de lavado (20 mL). Para disminuir la presencia de LPS, se realizó un lavado con isopropanol 60 %. Para la purificación en condiciones nativas, el *buffer* de unión consistió en Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, el *buffer* de lavado tiene la misma composición, pero incrementando la concentración de imidazol a 10 mM. La elución de la proteína se realizó por desplazamiento competitivo con imidazol. Como *buffer* de elusión se utilizó Tris-HCL 10 mM pH 8 con imidazol. Se evaluaron gradientes de concentración de imidazol de 50 mM a 1M o se eluyó con la máxima concentración de acuerdo a la proteína. También en algunos casos se implementó una elución por gradiente de pH, utilizando el mismo *buffer*, al cual se ajustó previamente al pH deseado. En caso de emplear condiciones desnaturizantes, se utilizó el *buffer* de unión de la siguiente composición:  $NaH_2PO_4$  100 mM, NaCl 300 mM, urea 6M (JT Backer), los lavados de la columna y la elución de la proteína se realizaron en condiciones nativas para eliminar las trazas de urea que pueden interferir en los ensayos biológicos posteriores.

**3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la separación de proteínas.** Se utilizó el método descrito por Laemmli (1970). Brevemente, fueron empleados salvo indicación, geles al 12 %. Para un volumen de 5 mL del gel separador se utilizaron 2 mL de 30 % de solución de acrilamida (acrilamida 29,2 % y N,N'-metil bisacrilamida 0,8 %), 1,3 mL de *buffer* Tris 1,5 M, pH 8,8, 0,05 mL SDS 10 %, 1,7 mL de agua milliQ, 0,05 mL de APS 10 % (persulfato de amonio) y 2  $\mu$ L de TEMED (N, N,N',N'-tetra-metiletilendiamina, Bio-Rad). Para 1 mL de gel concentrador se mezclaron 0,68 mL de agua, 0,17 mL de solución de acrilamida 30 %, 0,13 mL de *buffer* Tris 1M pH 6,8, 0,01 mL de SDS 10 %, 0,01 mL de persulfato de amonio 10 % (APS) y 0,001 mL de N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina (TEMED; Bio-Rad). Para 1 mL de gel concentrador se mezclaron 0,68 mL de agua destilada, 0,17 mL de solución de acrilamida 30 %, 0,13 mL de *buffer* Tris 1M pH6,8, 0,01 mL de SDS 10 %, 0,01 mL de APS 10 % y 0,001 mL de TEMED. Los geles fueron armados en el sistema MiniProtean 3 (Bio-Rad), luego de la polimerización, fueron sumergidos en una cuba de electroforesis con *buffer* de corrida Laemmli (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 250 mM, SDS 0,1%). Se sembraron las muestras y el marcador de peso molecular y luego se realizó la electroforesis en una fuente de poder a amperaje constante (35 mA) por un tiempo aproximado de 1 h.

**3.11. Detección de proteínas por tinción.** Luego de la separación electroforética de las proteínas, los geles de poliacrilamida fueron sumergidos en una solución de azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue* R250 0,25 % (Sigma), metanol 45 %, ácido acético glacial 10 %) durante 30 min en agitación. Luego, se trataron con la solución de desteñido (metanol 45 %, ácido acético 5 %) y se secaron sobre papel *Whatman* a 80 °C por 2 h utilizando un secador de geles (Bio-Rad).

### **3.12. Detección inmunológica de proteínas**

**Western blot.** Luego de la separación electroforética de las proteínas, se realizó una transferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa *Hybond-ECL* (Amersham Biosciences) en *buffer* de transferencia (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,037 %, metanol 20 %). La transferencia se realizó aplicando un amperaje constante de 100 mA por 16 h ó de 200 mA por 1 h a 4 °C. Se verificó la transferencia de las proteínas la tinción reversible de la membrana de nitrocelulosa con rojo *Ponceau* (rojo *Ponceau* 0,1 %, Sigma, en ácido acético glacial 5%). Luego de lavar la membrana con agua destilada, se incubó por 1 h en leche descremada 5% en *buffer* TBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario. Se realizaron dos lavados de 10 min y se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario anti-IgG anti-especie conjugado a fosfatasa alcalina. Luego de dos lavados finales y de una incubación de 10 min en el *buffer* de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), se agregó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) en combinación con *nitro blue tetrazolium* (NBT) (Promega). Se utilizó una solución de revelado consistente en 33  $\mu$ l de 50 mg/mL de NBT y 16,5 de 50 mg/mL de BCIP en 5

mL del *buffer* para fosfatasa alcalina. Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente y con agitación, empleando un agitador orbital. Para la detección de las proteínas recombinantes, se empleó el anticuerpo anti-histidina (Amersham) diluido 1/5.000 en TBS-leche descremada y se utilizó como anticuerpo secundario (o de detección) el monoclonal anti-IgG anti-ratón (*Western blot* anti-His). El mismo anticuerpo secundario se empleó cuando se utilizaron sueros murinos. Para el caso de evaluar sueros bovinos, o de conejo se emplearon los anticuerpos monoclonales anti-IgG anti-bovino o anti-IgG anti-conejo, respectivamente. Se empleó la dilución 1/3.000 en todos los casos y fueron adquiridos a la misma empresa (Sigma).

**3.13. Cuantificación de proteínas.** Se realizó utilizando el sistema colorimétrico comercial *BCA protein assay* (Pierce), basado en el ácido bicinconínico para la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales. Se cuantificó 10 µL de la muestra en microplaca de 96 pocillos, y se utilizó una curva patrón de albúmina bovina sérica (BSA) provista por el fabricante, en un rango de concentración de 0,02 mg/mL a 2 mg/mL. Se siguieron las instrucciones del fabricante para la preparación de los reactivos y se incubó a 37 °C por 30 min. Finalizado el tiempo de incubación, se realizó la medición espectrofotométrica a una longitud de onda de 600 nm.

**3.14. Técnicas de hibridación genómica: *Southern blot* y RFLP.** Se digirió 0,5 µg de ADN genómico (purificado como se menciona en la sección 3.4) con la enzima *BstEII*. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en *buffer* TBE (tris-borato-EDTA). Luego el gel fue tratado con HCl 0,25 M durante 8 min, y posteriormente con una solución NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M por 15 min, 2 veces y finalmente dos veces con Tris HCl 1M pH8, NaCl 1,5 M pH7 por 15 min. Se transfirieron los fragmentos de ADN por capilaridad a una membrana de *nylon Hybond-N+* (Amersham Biosciences) utilizando el *buffer* SSC 10x (citrato de sodio 150 mM, NaCl 1,5 mM). Luego de la transferencia, se fijó el ADN mediante *crosslinking*, exponiendo la membrana a luz UV a 0,12 J/cm y se pre-hibridó por 1h utilizando la solución PAES (ácido polianetol sulfónico-sal de sodio) en SSC 2,5x (citrato de sodio 37,5 mM, NaCl 0,37 M, pirofosfato de sodio 0,05 %, SDS 1% y ácido polianetol sulfónico 0,5 %). La hibridación con la sonda se realizó toda la noche a 65 °C. Luego se realizaron varios lavados con una solución de SSC 1x, SDS 0,1 % a 65 °C y se expuso en un film de rayos X (Kodak).

**Marcación de la sonda.** Para la preparación de la sonda, el producto de PCR fue purificado por mini-columnas (Amersham Biosciences). Se utilizó 25 ng del producto purificado para la reacción de marcación con dCTαP<sup>32</sup> (3.000 Ci/mmol) por el método de polimerización a partir de oligonucleótidos al azar *Random-prime-a-labelling* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la tipificación de aislamientos por RFLP se utilizó como sonda el producto de amplificación de la secuencia *IS900*, específica de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Collins *et al.*,

1993). Para el análisis de la presencia o ausencia de un gen en particular, se utilizó como sonda el producto de PCR de ese gen, amplificado con las condiciones descritas en la Tabla 6 de la sección 3.5.

### **3.15. Evaluación de proteínas micobacterianas**

**3.15.1. Obtención de proteínas del extracto celular o del sobrenadante de cultivo.** Los cultivos fueron centrifugados por 30 min a 10.000 xg. Para la preparación de los extractos celulares, las bacterias fueron resuspendidas y lavadas en *buffer* fosfato salino (PBS), para luego proceder a la disrupción mecánica de las mismas. Las células, resuspendidas en PBS, fueron transferidas a un tubo con esferas de vidrio. El tubo conteniendo las células es sometido a un proceso disrupción mecánica en un *Fast-Prep* FP120 (Savant) que consistió en 1 pulso de 45 seg a una velocidad de 6,5 rev/seg. Finalmente se centrifugó y se reservó el sobrenadante.

Para la obtención de las proteínas secretadas, se filtró el sobrenadante de cultivo, usando un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore) y luego, las proteínas fueron precipitadas utilizando ácido tricloroacético 10 % (TCA). Se homogeneizó y se dejó 15 min a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a máxima velocidad en centrífuga refrigerada por 30 min. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado del *pellet* con acetona 80 %, posteriormente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se evaporaron los restos de acetona en vacío (*speed-vac*). Alternativamente se empleó un protocolo de precipitación de proteínas con una solución saturada de sulfato de amonio (4,01 M), para lo cual se dejó precipitar toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de centrifugar como se menciona anteriormente, se resuspendió el *pellet* en el mínimo volumen de PBS y se dializó toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando una membrana de diálisis (tamaño de exclusión de 6-8 kDa) (Spectrapor).

**3.15.2. Fraccionamiento subcelular de proteínas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se partió de un volumen de cultivo de 500 mL en fase exponencial, se obtuvieron las células por centrifugación a 5.000 xg por 25 min. Para la obtención de proteínas secretadas, el sobrenadante fue procesado, como se describió anteriormente. El procesamiento para la obtención de las distintas fracciones de proteínas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Lee *et al.* (1992) con algunas modificaciones. Las células se lavaron 2 veces con PBS estéril y fueron inactivadas a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Las células fueron resuspendidas en el *buffer* de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 10 mM, leupeptina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y fluoruro de metil-fenil-sulfonilo, PMSF, 2mM), distribuidas en tubos con esferas de vidrio y sometidas a disrupción mecánica utilizando un disruptor de células *Fast Prep* (Savant). El material resultante fue centrifugado a 20.000 xg por 20 min para la remoción del material insoluble y células enteras. El sobrenadante, conteniendo las fracciones de citosol y de membrana, fue transferido a un tubo de ultracentrifuga y centrifugado a 100.000 xg por 3 h. El *pellet*, conteniendo la fracción insoluble de membranas fue lavado 2 veces con el mismo *buffer*. La



naturaleza de las proteínas contenidas en cada fracción, se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpos dirigidos contra proteínas características de las fracciones.

### **3.15.3. Separación de proteínas de membrana de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* utilizando Tritón X-114**

**Precondensación del Tritón X-114.** Una solución del detergente no iónico Tritón X-114 es homogénea a temperaturas cercanas a 0 °C, pero se separa en dos fases, una acuosa y otra conteniendo al detergente a temperaturas superiores a 20 °C. Con el objetivo de eliminar las moléculas más hidrofílicas del detergente, es necesario un paso previo de precondensación para lo cual se procedió de acuerdo al protocolo descrito por Bordier y recopilado en el sitio del NRC *Institute for Biological Sciences* ([http://www.bio.nrc.ca/ibs/facilities/spectrometry\\_condensation\\_e.html](http://www.bio.nrc.ca/ibs/facilities/spectrometry_condensation_e.html)). La solución de condensación consistió en tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM. Se agregó a esta solución 20 g/L de Tritón X-114 y 16 mg/L de hidroxitolueno butilado. Se incubó a 4 °C bajo agitación por un período no menor a 5 h (a esta temperatura ocurre la disolución completa y la solución se torna homogénea). Luego se colocó el recipiente conteniendo la solución a 30 °C en baño de agua durante toda la noche (a esta temperatura ocurre la condensación del detergente, con separación de fases). Al día siguiente se transfirió la fase acuosa a una probeta para la medición del volumen. Se agregó a la fase inferior de detergente, el mismo volumen descartado de la fase acuosa de la solución de condensación, se repitió el proceso antes descrito dos veces más. Luego de la tercer condensación, se toma la fase de detergente y se mide la DO<sub>280</sub> para la evaluación de la concentración teniendo en cuenta la relación  $2,28 \text{ DO}_{280} = 1 \text{ mg/mL} = 0,1\% \text{ Tritón X-114}$ .

**Extracción y particionamiento en fases de proteínas de membrana.** La totalidad de la fracción de membranas obtenida en el ítem anterior fue resuspendida en 2 mL de una solución de 4 % de Tritón X-114 v/v (precondensado) en Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM. Se incubó a 4 °C y luego se centrifugó a 37 °C para separar las fases. Se repitió el procesamiento para ambas fases. Finalmente se precipitaron las fases de detergente y acuosa con 10 volúmenes de acetona fría. Las muestras fueron incubadas a -20 °C toda la noche. Luego de ese período se centrifugó a 10.000 xg a 4 °C por 30 min, se descartó el sobrenadante, se evaporó la acetona residual y se resuspendió la muestra en *buffer* de siembra de electroforesis. Todas las fracciones obtenidas del fraccionamiento subcelular, junto a las proteínas de las fases acuosa y detergente resultantes del particionamiento, fueron separadas en un SDS-PAGE, electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con antisueros específicos para la detección de la proteína codificada por la secuencia en el clon pBluescript-24 por *Western blot*.

**3.16. Ensayo de unión a Concanavalina A (ConA).** Para la evaluación de la presencia de residuos de manosa en las proteínas, se utilizó la capacidad de las lectinas de unir estos residuos. Se empleó la técnica de electrotransferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa para luego detectar los residuos glicosídicos por incubación con la lectina. Primeramente se bloqueó la membrana con TBS-BSA 3%, luego se incubó por 1 h a temperatura ambiente con ConA conjugada a la enzima peroxidasa (Sigma). Luego se lavó la membrana y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el sistema *ECLplus-Protein detection* (Amersham Biosciences).

**3.17. Obtención de suero hiperinmune en ratón.** Se inmunizaron ratones hembra BALB/c de 2 meses de edad. Por cada dosis a administrar, se tomó una alícuota conteniendo 10 µg de proteína y se la emulsionó utilizando por agitación intensa, con el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Para el caso de la obtención de sueros anti-proteína recombinante, en aquellas muestras, en las que co-purificaron proteínas inespecíficas acompañando a la proteína, la fracción eluída de la purificación, se resolvió nuevamente en un SDS-PAGE. Se localizó la fracción correspondiente a la proteína específica, y se la cortó del gel. Luego, se procedió a disgregar el trozo de gel con un mortero, se resuspendió en PBS y se pasó por una jeringa para homogeneizar la muestra, después se emulsionó con un volumen de adyuvante incompleto de Freund. Por cada ensayo, se inyectaron tres ratones intraperitonealmente, repitiendo la inmunización al día 14, para finalmente sangrar al día 21. El día previo al de la primer inmunización, se tomó una muestra de sangre como control (suero pre-inmune). Los ratones fueron sangrados por la vena caudal ventral. Para la obtención del suero, la sangre se colocó a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 5.000 xg durante 5 min para la separación del suero.

### **3.18. Evaluación de la Respuesta inmunológica frente a los antígenos recombinantes.**

**3.18.1. Ensayo de  $\gamma$ IFN bovino.** La inmunidad mediada por células fue evaluada utilizando el enzimo-inmunoensayo comercial para la detección de  $\gamma$ -interferón bovino *Bovigam* (Commonwealth Serum Laboratories, CSL Veterinary). Los animales fueron sangrados por la vena yugular o por la vena coxígea, la sangre fue recolectada con heparina 20 U/mL(Rivero) y procesada dentro de las 4 h de realizada la toma de la muestra. El primer paso, consistió en la estimulación *ex-vivo* de la sangre con los antígenos recombinantes y los antígenos de referencia, diluídos en PBS. Se colocaron 200 µL de sangre en cada pocillo de placas de 96, fondo en “U” para optimizar el contacto célula-célula y la presentación antigénica y se incubó a 37 °C durante 16 h en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%. Luego de ese período las placas se centrifugaron a 6.000 xg durante 5 min, se retiró el plasma con pipeta multicanal, y se colocó en placas nuevas para congelar a -80 °C hasta su procesamiento. Fueron incorporados como controles por cada animal, el mismo volumen de PBS (control negativo) y *Pockweed mitogen* (Sigma), lectina aislada de *Phytolacca americana* e inductor inespecífico de la respuesta celular. Adicionalmente, por cada placa se agregó 50 µL de

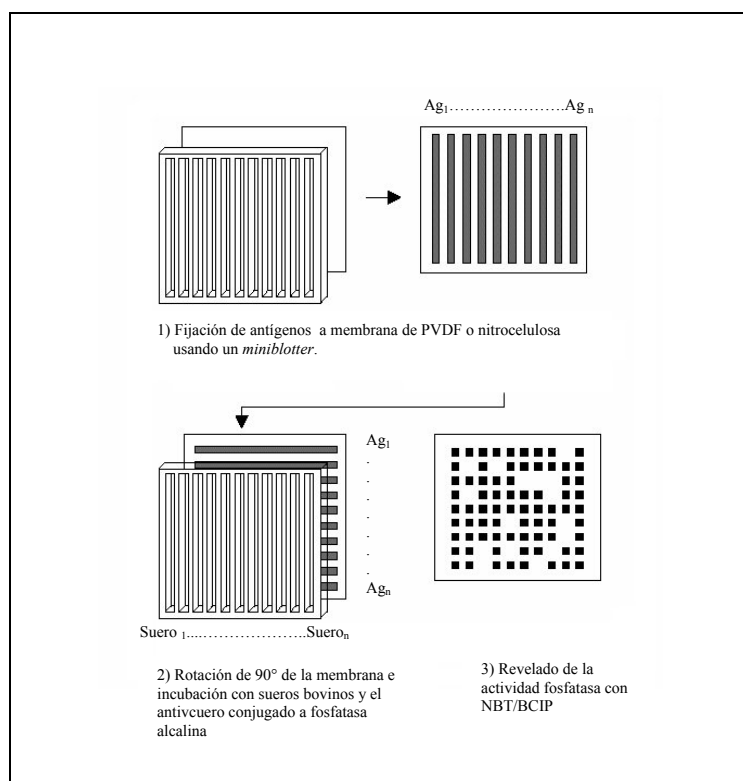
$\gamma$ IFN bovino como control positivo, y el control negativo del ensayo, ambos provistos por el fabricante. Asimismo, se evaluó la respuesta de los animales frente a los antígenos aviar y bovino, PPDa y PPDb (CSL). Para la cuantificación del  $\gamma$ -interferón producido, se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregó 50  $\mu$ L del *buffer* de dilución del plasma, *green diluent*, por cada placa a utilizar conteniendo el anticuerpo monoclonal, se agregó luego 50  $\mu$ L de la muestra a evaluar con sus respectivos controles, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Se retiró el contenido de la placa, se lavó 6 veces con la solución de lavado (*wash buffer*, provista por el fabricante). Luego se agregó 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-  $\gamma$ IFN conjugado a peroxidasa provisto por el fabricante y se incubó por 60 min a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos nuevamente 6 veces con el *wash buffer*. Se agregó 100  $\mu$ L de la solución conteniendo el sustrato de la enzima ( $H_2O_2$ ) y la solución cromogénica, se mezcló con vortex y se incubó protegiendo de la luz por 30 min. Se agregó 50  $\mu$ L de *stop solution* (provista por el fabricante) para detener la actividad enzimática. Se realizó una lectura en el espectrofotómetro usando un filtro de 450 nm. Se calculó el índice de densidad óptica (IDO) para cada muestra como el cociente entre la  $DO_{\text{antígeno}}/DO_{\text{PBS}}$ . Fueron estimados los puntos de corte de los ensayos con cada antígeno, en base a los valores obtenidos para los animales provenientes de los tambos libres de la enfermedad según el método *gaussiano*, empleado anteriormente en otros trabajos (Jungersen *et al.*, 2002; Huda *et al.*, 2004). Se calculó el límite de confianza del 95 %, para el valor de respuesta media sumados 1,96 veces el desvío estándar de la muestra. En el caso de no existir una distribución normal de los datos, se realizó un análisis de frecuencia de animales para cada intervalo de IDO450nm, tanto para los animales de los tambos infectados como para los animales de los tambos libres de la enfermedad, y se seleccionó el valor de IDO450 que contemple la relación de sensibilidad y especificidad adecuada. Se estimó la sensibilidad de cada ensayo como la proporción de animales del rodeo infectado que resultó positiva a la prueba en el punto de corte seleccionado. La especificidad se estimó en base a la proporción de animales de los rodeos no infectados que resultaron negativos en el punto de corte seleccionado.

### **3.18.2. Immunoblotting**

Para evaluar la respuesta humoral de los animales, se empleó la técnica de *Western blot*, en el formato convencional, descrito con anterioridad. También se emplearon macroarreglos de proteínas (MAPIA).

**Inmunoensayo multi-antigénico: MAPIA (*Multi Antigen Printed Assay*).** Para la implementación de esta técnica, se utilizó un *mini-blotter* que permite la deposición de 40 antígenos, para luego analizar la misma cantidad de sueros por vez (Figura 8). Se evaluó la concentración óptima para aplicar de cada antígeno a una membrana Immobilon-P (Millipore). Se activó previamente esta membrana, sumergiéndola en metanol por 15 s. Se diluyó cada antígeno en *buffer* TBS y se incorporó en cada pocillo 180  $\mu$ L de la solución. Se dejó 1h a temperatura

ambiente y luego se bloqueó la membrana en TBS-leche. Posteriormente, se giró 90° la membrana respecto de la posición original en el *blotter* y se incubó con el suero bovino por 1 h. Luego de dos lavados, se realizó la incubación por 1 h con el anticuerpo anti-IgG anti-bovino conjugado a fosfatasa alcalina. Se procedió a lavar la membrana 3 veces en TBS-tween 20 0,5 % y se equilibró en *buffer* fosfatasa. Finalmente, se reveló con los reactivos NBT/BCIP (Promega) tal como se describió anteriormente.



**Figura 8. Técnica de MAPIA para la detección de la respuesta humoral en bovinos.**

### 3.18.3. Enzimo-inmuno ensayo.

**ELISA-ModD recombinante.** Se sensibilizaron placas Polysorp (Nunc) con 100 µL por pocillo de una dilución 1/1.600 del antígeno recombinante (0,7 mg/mL) en *buffer* bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Se incubó toda la noche a T ambiente y se bloqueó con 100 µl por pocillo de la solución de bloqueo (leche descremada 3 %, PBS-tween 20, 0,05 %). Se lavó una vez con solución de lavado (PBS-Tween 20 0,05 %) y se agregó 100 µL del suero problema diluído 1/200 en la solución de bloqueo, se incubó por un período de 1 h a 37 °C. Se lavó 6 veces con la solución de lavado (PBS-tween 20, 0,05 %) y se agregó 100 µl /pocillo del anticuerpo, conjugado a peroxidasa anti-bovino (Accurate), diluído 1/1.500. Las incubaciones se realizaron a 37 °C por 1 h. Se lavó nuevamente con la solución de lavado y se reveló con 100 µL de solución de revelado que consistió en 280 µL de

ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico] (ABTS) 10 µg/ml (Sigma) y 12 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, preparado en 10 mL de *buffer* citrato pH 5. Se realizaron lecturas a una λ de 405 nm.

**ELISA-PPA.** Este ensayo emplea el antígeno protoplasmático de *M. avium* subsp. *avium* (Allied) y fue realizado de acuerdo al protocolo descrito por Paolicchi *et al.*, (2003), sin modificaciones. Esta prueba tiene una sensibilidad del 66 % y una especificidad del 99 % determinadas por análisis de curvas ROC (Paolicchi *et al.*, 2003).

### **3.19. Técnicas histológicas.**

**3.19.1. Inmunohistoquímica.** Las muestras fueron fijadas en formol y embebidas en parafina de acuerdo a las técnicas histológicas habituales. Los tejidos desparafinados y rehidratados fueron sometidos a la inactivación de la peroxidasa endógena por tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 % en metanol por 15 min. Después del lavado, se sumergió los cortes en *buffer* citrato y se los calentó a 121 °C por 15 min. Se los dejó enfriar (10 minutos a temperatura ambiente) y posteriormente se los sumergió en *buffer* TBS-Tween 20 0,1 % pH 7,6 (TBS-Tween) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cortes fueron tratados con una solución de BSA 1 % (Sigma) en el mismo *buffer* por 5 min. Posteriormente, se incubaron las muestras con 30 µL del anticuerpo primario anti-Lpp34, durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Luego de realizar varios lavados con abundante TBS-Tween, se incubó por 20 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotilado (anti- ratón y anti- conejo) (DAKO). Se realizaron nuevamente lavados y se procedió a la incubación con streptavidina conjugada a peroxidasa durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, luego de realizar nuevos lavados, se incubó con el sustrato cromogénico. Se utilizó 3-amino 9-etilcarbazol (AEC), listo para usar (DAKO), se cubrió con una gota y se incubó por 20 min. Se realizaron lavados con abundante *buffer* TBS-Tween y se procedió a realizar la coloración de contraste con Hematoxilina de Mayer. Se montaron los preparados en medio de montaje hidrosoluble (Vectamount AQ) o bálsamo sintético para la examinación histológica.

**3.19.2. Coloración con Hematoxilina y Eosina.** Se deparafinaron los cortes, y fueron sumergidos en hematoxilina de Mayer durante 2-3 min. Se lavó en agua corriente, para luego sumergir los cortes en eosina alcohólica 1 %, durante 2-3 min. Se deshidrató los preparados para el posterior montaje en bálsamo sintético (Lipshaw).

**3.20. Elaboración de un Derivado Proteico Purificado de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (PPDj).** Para evaluar la respuesta de los animales frente a una PPDj (PPD johnina) se procedió a procesar un cultivo del aislamiento salvaje local Malele 505. Se creció un cultivo en medio sintético 7H9 (Difco) (250 mL) suplementado con micobactina J (Allied). El cultivo se realizó a 37 C en agitación (100 rpm), hasta llegar a la fase estacionaria. Se autoclavó a 121°C durante 3h y se filtró el lisado resultante con una unidad filtrante (Millipore). Se realizó una precipitación ácida de

proteínas con TCA 4 % (JT Backer), se resuspendió el precipitado en PBS y se lo dializó contra PBS. Se cuantificó la concentración de proteínas y se ajustó a una concentración de 0,3 mg/mL con PBS.

**3.21. Condiciones para el cultivo de las micobacterias utilizadas en el presente trabajo.** Para crecer en medio líquido los aislamientos de MPTB, se inoculó una anizada tomada a partir de un cultivo en medio Herrold con micobactina, en medio 7H9-Middlebrook (Beckton & Dickinson) adicionado con piruvato de sodio 0,4 % (Sigma) y micobactina 0,2 % (Allied). El cultivo se realizó en forma estática a 37 °C y se prolongó por un período de 3-5 meses. Los cultivos fueron enriquecidos con OADC 10 % (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa; Difco), sólo en el caso de los cultivos destinados a la extracción de ADN. Los cultivos fueron realizados en frascos de cultivo de vidrio tipo *shot* o en botellas de cultivo para células de poliestireno (Orange).

Las condiciones para el cultivo de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. phlei* y *M. bovis* fueron las mismas, pero sin adicionar micobactina. Para el cultivo de *M. tuberculosis* H37:Rv, se adicionó glicerol 10 %. El tiempo de cultivo empleado para alcanzar la fase exponencial fue de 48 h para *M. smegmatis* y *M. phlei*, mientras que el tiempo de cultivo para las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se realizó por un período de entre 2-3 semanas.

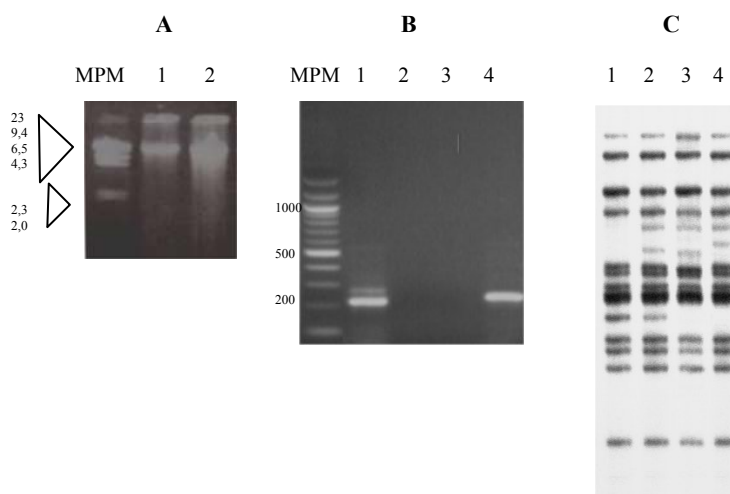
**3.22. Análisis estadísticos.** Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando en programa MedCalc 9.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación y caracterización de antígenos a partir de la construcción y análisis de una genoteca de expresión.

#### 4.1.1. Aislamiento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* seleccionado y extracción de ADN genómico.

El aislamiento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* empleado para la construcción de la genoteca, provino de un bovino paratuberculoso de la raza Aberdeen Angus de la localidad de Dolores (Pcia. de Buenos Aires). Su identidad fue confirmada amplificando la secuencia de inserción *IS900* por PCR, visualizándose un producto de amplificación del tamaño esperado (218 pb) (Figura 9). Asimismo, el aislamiento fue tipificado previamente en nuestro laboratorio por la técnica de RFLP (Moreira *et al.*, 1999), empleando la enzima *BstEII* y la misma secuencia de inserción como sonda. El aislamiento, denominado Malele-505, fue clasificado según el perfil obtenido como “A”. Su crecimiento es dependiente de micobactina, fue sub-cultivado en pocas oportunidades luego de su aislamiento primario, reteniendo la virulencia en ovinos (Tesis doctoral de Andrea Verna). La selección de este aislamiento se realizó en base a que su perfil de RFLP es el más frecuente entre los aislamientos tipificados de Argentina por nuestro laboratorio y a su capacidad adecuada para el crecimiento *in vitro*.

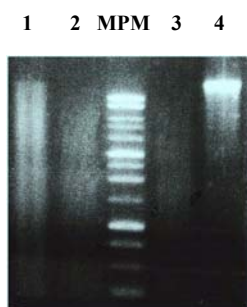


**Figura 9: Extracción de ADN y Genotipificación del aislamiento Malele-505.** A. Extracción de ADN. Se obtuvo el ADN genómico por lisis enzimática y por precipitación con cloroformo-alcohol-isoamílico. Calles 1 y 2, se sembró 1  $\mu$ L de dos cultivos del mismo aislamiento en un gel de agarosa 0,8 %; MPM: marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Hind* III (Promega), se muestran los tamaños de los fragmentos en kb. B. PCR-*IS900*. Se sembró el producto de la reacción en un gel de agarosa 2 %. Calle 1, ADN de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Malele-505; calles 2 y 3, controles negativos de reactivos de PCR y extracción de ADN respectivamente; calle 4, ADN del aislamiento Malele-505. MPM. Marcador de peso molecular, 100pb (Promega) se indican los tamaños de los fragmentos en pb. C. RFLP. Se muestran los perfiles de RFLP-*IS900* de los distintos aislamientos de nuestro país. Calle 1, perfil “B”; calle 2, perfil “E”; calle 3, perfil “A”; calle 4, perfil “C”. El aislamiento Malele-505 pertenece al grupo de aislamientos con perfil “A” de RFLP.

Se cultivó la bacteria en 4 frascos de 250 mL tipo *Schot*. La bacteria fue crecida en medio Middlebrook 7H9 adicionado con ácido pirúvico, OADC y micobactina J en las concentraciones descriptas en Materiales y Métodos. El cultivo se realizó en forma estática a 37 °C hasta obtener a una fase de crecimiento exponencial. Se centrifugó la totalidad del cultivo y se fraccionó. Se extrajo el ADN genómico tal como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose entre 1mg-2mg de ADN por reacción de extracción (Figura 9). Las fracciones más concentradas fueron utilizadas para la puesta a punto del ensayo de digestión enzimática y para la obtención de los fragmentos a clonar en el vector  $\lambda$ -Zap.

#### 4.1.2. Construcción y evaluación de la genoteca

**Digestión del ADN, preparación del vector  $\lambda$ -ZapII y clonado.** Luego de evaluar la digestión del ADN genómico de MPTB con las enzimas *PvuII* y *EaeI* (Figura 10), se seleccionó esta última. El sitio de restricción de la enzima es Py<sup>^</sup>GGCCPu y genera extremos compatibles con el sitio *NotI* (GC<sup>^</sup> GGCC GC) del sitio múltiple de clonado del vector. Se realizó una digestión parcial por 1 h a 37 °C con 1,5 U de la enzima y 20 ng de ADN por reacción, luego se inactivó la enzima por 30 min a 75 °C y se unificaron las muestras de distintas reacciones para concentrar los fragmentos sub-genómicos por precipitación con etanol.



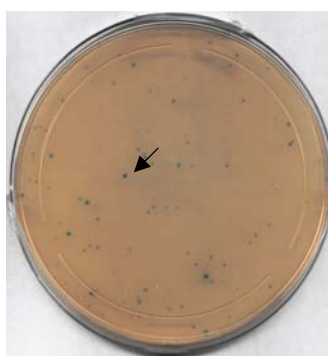
**Figura 10. Digestión parcial del ADN genómico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Calle 1, ADN digerido con *PvuII* (1h, 37°C); calle 2, ADN digerido con *EaeI* (1h, 37°C); calle 3, Digestión con *EaeI*, *post*-inactivación; calle 4: ADN sin digerir. MPM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega).

La inactivación de la enzima empleando las condiciones recomendadas por el fabricante (65 °C, 20 min) resultó poco efectiva, siendo necesario incrementar la temperatura a 75 °C y el tiempo a 1 h, para asegurar el grado de restricción obtenido y conservar el rango de tamaño de inserto deseado. Luego de la ligación de los sitios *Cos* del vector y de la generación del sitio de clonado por digestión con la enzima *NotI*, se ligaron la totalidad de los fragmentos derivados de la digestión total del ADN genómico de la bacteria con la enzima *Eae I*. Luego se empaquetó la reacción de ligación y se transfectaron células *E. coli* XL-Blue.



### Evaluación de la eficiencia

Se procedió a la evaluación del título de la genoteca cuantificando las unidades formadoras de placas (UFP). Este proceso se repitió post-amplificación de la genoteca. Adicionalmente, se calculó el porcentaje de UFP recombinantes formadas en medio de cultivo conteniendo X-gal/IPTG, cuantificando las placas incoloras respecto de las totales (Figura 11). Los títulos de la genoteca pre y post-amplificación fueron  $7,6 \times 10^5$  y  $5 \times 10^{10}$  UFP/mL respectivamente, mientras que el porcentaje de recombinantes fue semejante, 77 % contra 86 %.



**Figura 11. Genoteca de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se transfectó *E. coli* XL-Blue con una alícuota de la genoteca y se plaquéó en *top-agar* conteniendo X-gal/IPTG. Se indica con una flecha, una UFP de coloración azul (no-recombinante).

### Análisis del tamaño de inserto de la genoteca

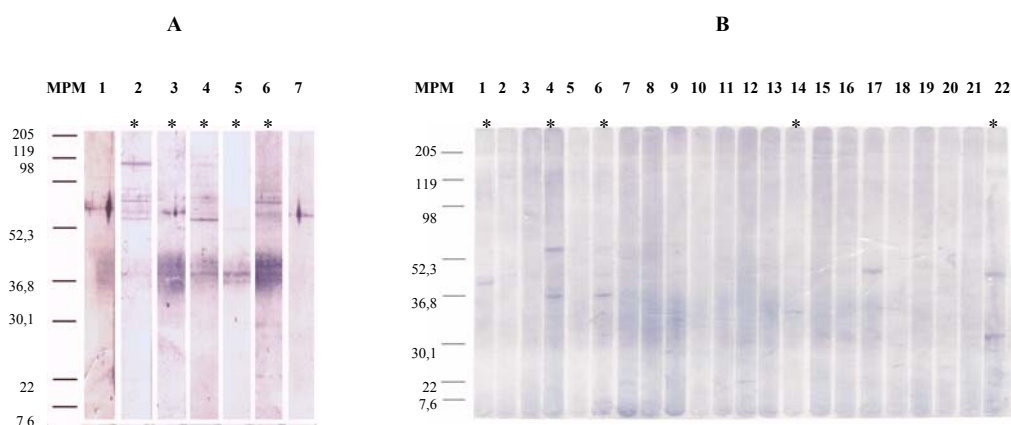
Se seleccionaron 10 UFP recombinantes al azar, se recuperaron los fagos y se procesó cada clon de acuerdo a las instrucciones del fabricante para obtener por escisión automática, el *fagémido* pBluescript. Luego de la infección de *E. coli* XL-Blue, se realizaron las extracciones de ADN plasmídico. Posteriormente, se procedió a liberar el inserto de cada clon con la doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, estas enzimas reconocen sitios de restricción externos al sitio de clonado utilizado en el vector. Las digestiones se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa junto a un marcador de peso molecular para calcular el tamaño de inserto en cada clon. Algunos clones liberaron más de un fragmento de distinto tamaño como consecuencia de la existencia de sitios de restricción dentro del inserto. El tamaño promedio de inserto de los clones analizados fue de 1,08 kb.

## Inmuno-análisis de la genoteca de expresión

### Evaluación de los sueros para el *inmuno-screening*

#### a-Sueros bovinos

Fueron evaluados distintos sueros provenientes de bovinos con infección subclínica y clínica, con aislamiento confirmatorio de la bacteria a partir de materia fecal, en la mayoría de los casos. Se priorizó el análisis de aquellos sueros con serología positiva, evaluados por la técnica de ELISA empleando el antígeno protoplasmático de *M. avium* (PPA) (Allied, Monitor). Se realizaron ensayos de *Western blot* para evaluar el reconocimiento de las proteínas de un extracto de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* por parte de esos sueros (Figura 12). El comportamiento de los sueros ELISA-PPA+, analizado por *Western blot* fue heterogéneo, no todos los sueros ELISA-PPA+ reconocieron proteínas del extracto de la bacteria. El animal cuyo suero se utilizó en la calle 17, con serología negativa, mostró el reconocimiento de una banda cercana a los 50 kDa, que también fue reconocida por el suero del animal de las calle 22. Se puede observar en la Figura 12A, que los sueros empleados en las calles 1, 3, 4 y 6 reconocieron con intensidad una banda difusa en la región de 35 kDa a 50 kDa, esta reacción puede atribuirse al reconocimiento de las moléculas de LAM, que es un componente abundante de la pared micobacteriana.

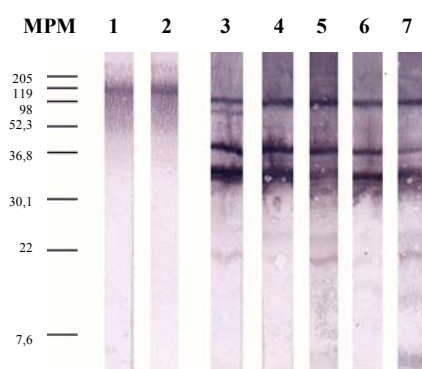


**Figura 12. Evaluación del reconocimiento de proteínas totales de la bacteria por *Western blot* empleando sueros bovinos.** **A.** *Western blot* a partir de un gel preparativo SDS-PAGE de 10cm. Calles 1 a 6, sueros de animales PTB+ (ELISA PPA+; cultivo +) pertenecientes a un mismo tambo; calle 7, suero de animal PTB-. **B.** *Western blot* a partir de la transferencia de un gel preparativo SDS-PAGE de 20 cm. Se emplearon sueros de dos establecimientos con PTB. Calles 1 a 10, 13 a 16, 21 y 22, sueros de animales ELISA PPA+; calles 11, 12, 17 a 20, sueros bovinos ELISA PPA-. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/100, y el anticuerpo de detección se empleó según las indicaciones del fabricante. MPM: marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

Se seleccionaron para el análisis de la genoteca los sueros que presentaron mayor reactividad (se indican en la Figura 12 con “\*”) y se realizó un *pool* con los mismos.

### b-Sueros murinos

Se inmunizaron ratones BALB/c hembra y se realizó el seguimiento de la inmunización de los ratones evaluando el reconocimiento de las proteínas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* por *Western blot*. Los ratones fueron inmunizados con bacterias enteras inactivadas o con un lisado de las mismas junto a proteínas del sobrenadante y adyuvante incompleto de Freund. La Figura 13, muestra un patrón de reconocimiento similar tanto en los ratones inmunizados con las bacterias enteras, como en los inmunizados con el lisado de las mismas. Se seleccionaron como sueros representativos para realizar el análisis de la genoteca los sueros de los animales 3, 5 y 7.

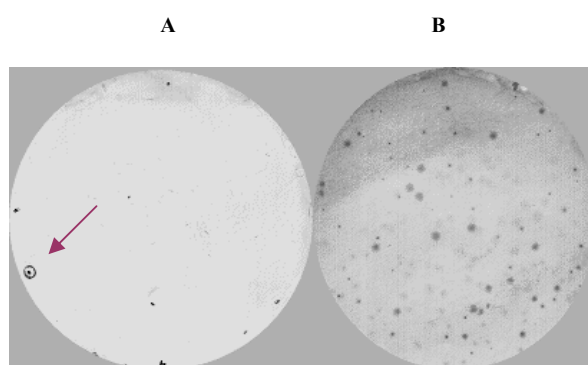


**Figura 13. Sueros murinos hiperinmunes anti-proteínas totales de la bacteria.** *Western blot* utilizando los sueros de ratones sangrados al día 20 *post*-inmunización. Se utilizó una dilución 1/50 para los sueros murinos y una dilución 1/3.000 para el anticuerpo de detección conjugado a fosfatasa alcalina. Calles 1 y 2, sueros *pre*-inmunes; calles 3 y 4, ratones inmunizados con bacterias enteras; calles 5 a 7, ratones inmunizados con un lisado de bacterias y proteínas del sobrenadante de cultivo obtenidas por precipitación con TCA 10 %. MPM: marcador de peso molecular (Bio-Rad), se indican los tamaños en kDa.

Con el objetivo de eliminar o disminuir la interferencia de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada reconociendo proteínas de *E. coli*, en los sueros bovinos y murinos, se absorbieron los sueros de acuerdo a los protocolos descritos en Materiales y Métodos. Este paso de *pre*-absorción permitió disminuir el *background* de las membranas procesadas por *Western blot* y de esta manera se pudieron detectar las UFP inmunoreactivas mediante el revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina en presencia de su sustrato.

### **Análisis por inmunobloting de la genoteca de *M. avium* subsp. *paratuberculosis***

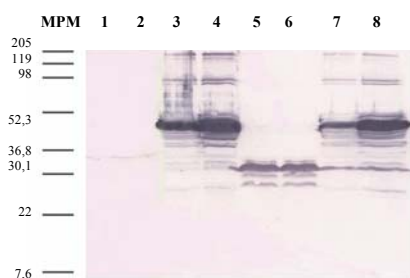
Luego de embeber una membrana de nitrocelulosa de 15 cm de diámetro con IPTG, fue depositada sobre un césped de *E. coli* transfectado con la genoteca de  $\lambda$ -ZapII:MPTB. Luego de incubar a 37°C hasta la formación y transferencia de las placas de lisis a la membrana, se marcaron puntos referenciales y se la procesó por inmunoblot con los sueros seleccionados, de acuerdo a la descripción de la técnica de *Western blot*, en Materiales y Métodos. Los sueros seleccionados para el inmunoanálisis, tanto bovinos como murinos, fueron *pool*eados y posteriormente diluídos 1/200. Por el análisis de la genoteca con los sueros bovinos, se detectaron 6 placas de lisis inmunoreactivas (Figura 14). Se escindieron del agar las UFP reactivas para recuperar los fagos y se volvió a transfectar *E. coli* XL-Blue para realizar nuevamente un *inmunoblot* con el mismo suero empleado para el análisis. Se repitió el protocolo hasta obtener el clon aislado. De las 6 placas de lisis que se detectaron originalmente como positivas (*screening* primario), se pudo confirmar una UFP reactiva. Del análisis de la genoteca con los sueros murinos, se detectaron 12 UFP inmunoreactivas en primera instancia. De estas UFP, se recuperaron fagos recombinantes reactivos en 9 de los casos.



**Figura 14. Inmunoanálisis de la genoteca de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* con sueros bovinos.** Se muestran filtros de nitrocelulosa donde se transfirieron por capilaridad los clones de la genoteca de fago  $\lambda$ ::MPTB y posteriormente fueron evaluados con el *pool* de sueros (1/200). **A.** *Inmunobloting*: primer *screening*. Se muestra con una flecha la señal positiva en el filtro de una UFP inmunoreactiva. **B.** Aislamiento y enriquecimiento de fagos provenientes de la UFP inmunoreactiva originada del primer *screening*, se muestran las múltiples UFP, clones de la observada en A.

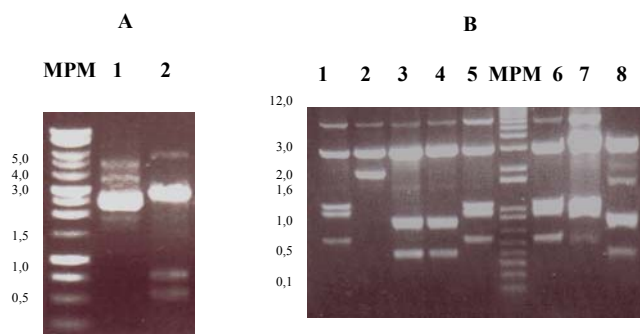
El sistema de escisión automática del vector, permite realizar el análisis de expresión de la secuencia clonada, como también realizar estudios de secuenciación sin necesidad de sub-clonar el inserto. Se obtuvieron los *fagémidos* por escisión automática del vector  $\lambda$ -Zap, y luego de transfectar *E. coli* XL-Blue, se obtuvieron los clones pBluescript recombinantes (pBL). Se realizaron con estos clones, ensayos de inducción de expresión de proteínas con IPTG 5mM y se

realizó el reconocimiento de las proteínas de fusión a  $\beta$ -gal expresadas por *Western blot*. Se muestran en la Figura 15, un ensayo de *Western blot* representativo, utilizando los extractos proteicos de 3 clones pBL inmunoreactivos. Se emplearon para este ensayo, los mismos sueros utilizados para el análisis de la genoteca. Se pudo observar que los clones pBL-28 y pBL-21 expresaron una proteína de un tamaño aproximado de 45 kDa, mientras que el producto del clon pBL-24 presentó un tamaño aproximado a 35 kDa. También se observó que, los clones pBL-21 y pBL-28, presentaron niveles mayores de expresión de la proteína luego de la inducción con IPTG, sin embargo, el clon pBL-24 mostró niveles de expresión comparables en ambas condiciones. La inducción en ausencia de IPTG puede indicar que la expresión del antígeno, podría estar controlada por el promotor micobacteriano. En la Tabla 7, se indican los tamaños de las proteínas expresadas por el resto de los clones seleccionados de la genoteca.



**Figura 15. Reconocimiento del antígeno potencial fusionado a  $\beta$ -gal expresado en *E.coli* XL-Blue.** Se muestran en el *Western blot*, 3 ensayos representativos. Calles 1 y 2, controles (vector sin inserto de ADN); calles 3 y 4, clon pBL 28; calles 5 y 6, clon pBL24; calles 7 y 8, clon pBL21. Calles 2, 4, 6 y 8, inducción con IPTG 5 mM. Se utilizó como anticuerpo primario, el suero murino (*pool*) utilizado para el análisis de la genoteca, diluido 1/200, y como anticuerpo de detección, el monoclonal anti-IgGmurino conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), diluido 1/3000. MPM: marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

Con el objetivo de corroborar la presencia e identidad del inserto, se realizaron las extracciones de ADN plasmídico, y posteriormente se realizó una digestión doble con las enzimas *EcoRI* y *SacI* como se indica en Materiales y Métodos. La elección de estas enzimas se basó en el reconocimiento de secuencias localizadas por fuera del sitio de clonado seleccionado en el vector (Figura 5). El producto de la digestión se separó electroforéticamente en un gel de agarosa 1 %. Como puede observarse en la Figura 16, los clones de las calles 1, 5, 6 y 7 (Figura 16B), compartían el mismo patrón de digestión, al igual que los clones de las calles 3, 4 y 8, sugiriendo la posibilidad que sean el mismo clon.



**Figura 16. Digestión de los clones recombinantes pBluescript (pBL) con las enzimas *EcoRI-SacI*.** **A.** Clon derivado del análisis de la genoteca con sueros bovinos. Calle 1, ADN plasmídico del clon pBL-1 sin digerir; calle 2, digestión doble del clon pBL-1 con las enzimas *EcoRI-SacI*; MPM: marcador de peso molecular, 1 kb (Promega). **B.** Clones derivados del análisis con sueros murinos. Digestiones de ADN plasmídico de los distintos clones con las enzimas *EcoRI-SacI*. Calle 1, pBL-19; calle 2, pBL-20; calle 3, pBL-21; calle 4, pBL-22; calle 5, pBL-23; calle 6, pBL-24; calle 7, pBL-25; calle 8, pBL-28. MPM: marcador de peso molecular, 1 kb Plus (Invitrogen), se indican los tamaños en pb.

De acuerdo al análisis de los resultados de expresión y digestión de los clones pBL, se clasificaron de acuerdo a sus características en distintos fenotipos que se muestran en la Tabla 7. Estos resultados mostraron nuevamente la posibilidad de haber identificado el mismo clon en distintas oportunidades.

Clon	Suero de detección	PM de la proteína de fusión	Tamaño del fragmento <i>EcoRI-SacI</i>	Fenotipo
pBL-1	bovino	30-40 kDa	2,5 kb	A
pBL-20	murino	34 kDa	2 kb	B
pBL-21-22	murino	45 kDa	2,5 kb	C
pBL-24-23-19 y 25	murino	35 kDa	2,5 kb-2,8 kb	D
pBL-28	murino	45 kDa	<2,5 kb	E

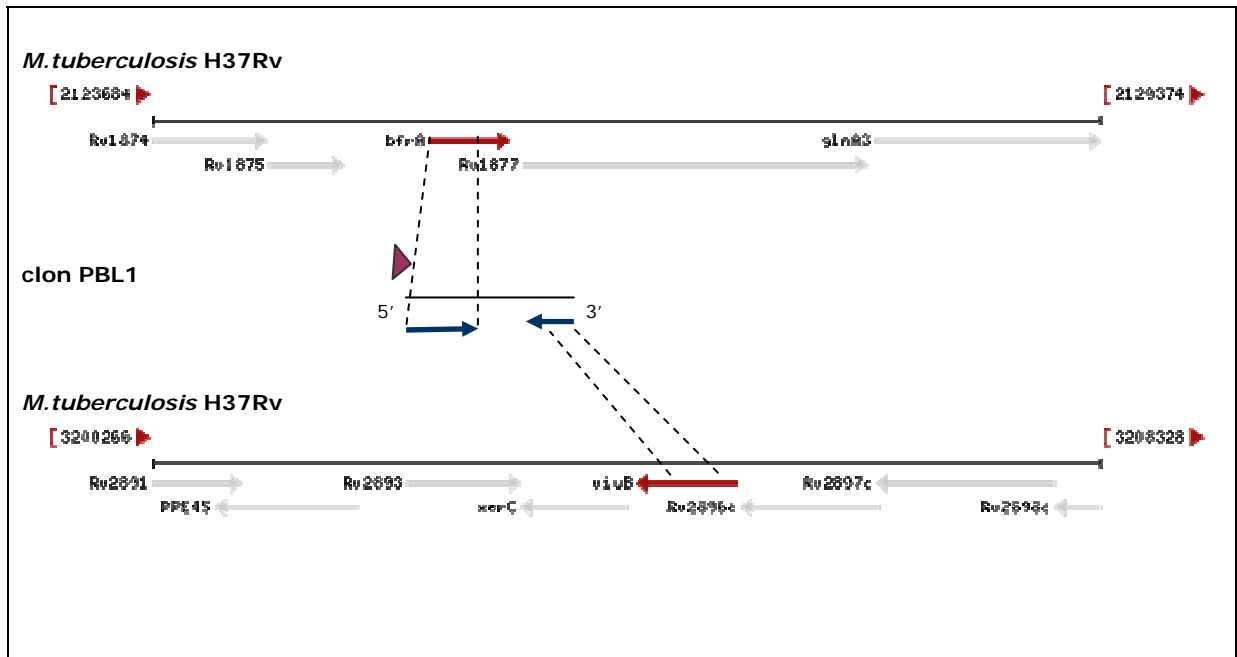
**Tabla 7. Características de los clones pBluescript recombinantes identificados en la genoteca.** Los distintos clones aislados fueron clasificados en fenotipos según el tamaño de la proteína de fusión expresada en *E. coli* XLblue y el tamaño del inserto clonado. Se indica el origen del suero empleado para la detección de los mismos en la genoteca. PM, peso molecular.

#### **4.1.3 Análisis de las secuencias codificadas por los clones pBluescript recombinantes.**

La totalidad de los clones pBL confirmados por digestión, fueron remitidos para su secuenciación. Para la reacción de secuenciación se usaron los oligonucleótidos universales T7 y T3. Una vez obtenida la secuencia del inserto de ADN en los clones seleccionados, se procedió al análisis de las mismas. Al momento de iniciado este estudio, la secuenciación del genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* estaba inconclusa y no estaban disponibles las secuencias parciales. Por este motivo, las búsquedas de identidad se realizaron inicialmente en el genoma de la cepa de referencia H37Rv de *M. tuberculosis*. Se utilizó el algoritmo BLAST v2 en el sitio <http://genolist.pasteur.fr/tuberculist/>. Las secuencias nucleotídicas parciales o totales del inserto de cada clon, fueron analizadas utilizando el algoritmo BLAST en el sitio de TIGR para los genomas incompletos escogiendo el genoma de *M. avium* subsp. *avium* 104 ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) y en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

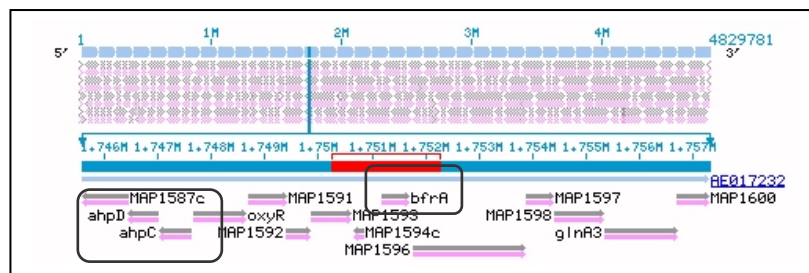
##### **4.1.3.1. Análisis del clon pBL-1**

La escisión de la única UFP reactiva identificada con los sueros bovinos generó el clon pBluescript-1 (pBL-1). Denominamos A al patrón de digestión del clon con las enzimas *SacI*-*EcoRI* y al producto de fusión expresado de entre 30-40 kDa. El tamaño del inserto es de 2,5 kb. El análisis de alineamiento de la secuencia nucleotídica por BLAST con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, mostró una identidad significativa con los genes *viuB* (81 %) y *bfrA* (83 %). Estos genes se encuentran en regiones genómicas distantes en el genoma de *M. tuberculosis* (Figura 17). De la misma manera, se realizó una búsqueda de identidad por alineamiento con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI, y se encontró una identidad del 98 % a nivel de secuencia nucleotídica con el gen *bfrA* de *M. avium* subsp. *silvaticum*. El gen *bfrA* codifica para la subunidad A de la bacterioferritina y la secuencia del inserto, abarca los 97 aminoácidos del extremo amino- terminal (N-terminal) de la proteína. Como la fusión a  $\beta$ -galactosidasa aporta a la proteína 23 kDa en el N-terminal, adicionando 11 kDa que corresponden a los 97 aminoácidos de la BfrA, se obtuvo aproximadamente, en el tamaño de la proteína de fusión observado por *Western blot*. Por este motivo, fue seleccionado el producto de este gen para su estudio.



**Figura 17. Análisis de secuencia del clon pBL-1.** Se muestran dos segmentos genómicos (2123684-2129374 y 3200266-3208328) de *M. tuberculosis* H37Rv. En el segmento representado en la parte superior de la figura, se encuentra el gen *bfrA* y en el de la parte inferior, el gen *viuB*. Estos genes presentaron una identidad de 83 % y 81 % respectivamente con dos secuencias de 291pb y 423 pb del inserto pBL-1.

En la Figura 18 se muestra la región genómica que codifica el gen *bfrA* en el genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10, actualmente secuenciado en su totalidad. Este gen está anotado como *MAP1595* y se encuentra en la misma región genómica que los genes *ahpC* (*MAP1589c*) y *ahpD* (*MAP1588c*), que cumplirían un rol protectorio en la célula a partir de su actividad peroxidasa y descriptos previamente como antígenos de MPTB.



**Figura 18. Representación de la región que codifica el gen *bfrA* en el genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10.** Se muestra en rojo, la región genómica detallada más abajo, mostrando el entorno genético de *bfrA*. Se resaltan con negro la secuencia de *bfrA* y la de los genes de los antígenos AhpC y D (Olsen *et al.*, 2000). (figura tomada de la anotación del genoma de MPTB).



Asimismo, la secuenciación del genoma permitió conocer que el segundo gen presente en el inserto del clon pBI-1, *viuB* (*MAP2960*), se encuentra en una región genómica distinta, tal como ocurre en *M. tuberculosis* H37Rv y que en MPTB, este gen está a 1,54 Mb de distancia de *bfrA*. Por lo tanto, la presencia de estos genes en el mismo inserto, se debe a un artefacto producido durante la construcción de la genoteca.

**Análisis de la secuencia primaria de BfrA.** La bacterioferritina es una proteína multimérica, constituida por subunidades idénticas. La secuencia del gen *bfrA* codifica para un producto (subunidad) de un peso molecular estimado de 18 kDa, que tiene un dominio conservado, clasificado dentro del grupo de ortólogos COG2193 de la base de datos CDC, (*Conserved Domain Database*; Marchler-Bauer *et al.*, 2005) del NCBI. Este dominio se encuentra conservado en Bacteria, como se muestra en la Figura 19, donde se puede evaluar la presencia de bacterioferritina en distintas especies.

<a href="#">1BCF_A</a>	1	MKGD	TKVINYLNKLIGNELVAIQYFLHARMFKNWGLKRLNDVEYHESIDEMKHADRYIERILFLEGLPNLQDLG	75				
<a href="#">qi_1705456</a>	1	MKGE	PKVIERLNDALFLELGAQNQYWLHYRLLNDWGYTRLAKKERBESIEEMHADKLNRIIFFEQFPNLQTVS	75				
<a href="#">qi_1168652</a>	1	MQGD	PDVLRLLNEQLTSELTAIQYPLHAKMQENWGFTELAERTRVESPDEMRHAEAITDRILLDGLPNYQIRIG	75				
<a href="#">qi_9910627</a>	1	MKGD	RLVIRRELNKNLGLLVFIQYPLHARILKNWGFEEELGEHFFKQSIEMKAADDLIERILFLEGLPNLQELG	75				
<a href="#">qi_9910626</a>	1	MQGN	QAVVDYMNELLSGELAARDQYFIHSRLYSEWGYTKLPERLNHEMEEETTHAEDFIRIRILMGGTPKMARAE	75				
<a href="#">qi_15599431</a>	1	MQGH	PEVIDYLNLTGELAARDQYFIHSRMVEDWGFSLYERLNHEMEEETQHADALLRRILLLEGTPRMRPDD	75				
<a href="#">qi_15600073</a>	26	TEGY	[4]. QTVLRLLNEALATELVCFLYRKRHYFMATGLKASIAAEFLEHANOEMQHADQLAERIMQLGGEPDFNPRG	104				
<a href="#">qi_17231432</a>	1	MQEL	[2]. NKAIDLNAIMEFELAGVVRVYTHSLMVTGPNRIPIVAFKQAQSESLHAQQVGEIITGLDGHPTLRAP	77				
<a href="#">qi_13474607</a>	1	MKGE	SLTIERLNEALFLELGAQNQYVWHPRLEEDWGYTKLAKKERBESIEEMHADRLIARIIFLEGHPNLQSVVA	75				
<a href="#">qi_2506220</a>	1	MKOK	PAVLAQLHKLIRGELAARDQYFIHSRMVDWGLEKLYSRIDHEMQDETAHASLLIERILFLEETPDLSQQD	75				
<a href="#">1BCF_A</a>	76	[1].	LNIGEDVEEMLRSDLALELDGAKNLRREAIQYADS	[2].	DYVSRDMMIEILRDEEG	HIDWLETQLDLIQ	142	
<a href="#">qi_1705456</a>	76	[1].	LRIGQNVKEVLEADLKGEYDARASYKESREICDK	[2].	DYVSKQLFDELLADEEG	HIDFLETQLDLIA	142	
<a href="#">qi_1168652</a>	76	[1].	LRVGQTLREQFEADLAIYEYVMSRLKPGIIMCRE	[2].	DSTSAVLEKIIVADEEE	HIDYLETQLALMG	142	
<a href="#">qi_9910627</a>	76	[1].	LLIGESTEEIITACDLTKEQEKHEALLAATAEA	[2].	DYVSRDLLEKQKDTNEE	HIDWLETQQLLIG	142	
<a href="#">qi_9910626</a>	76		LNIGTDVVSCLKADLQTEYEVKRDALKKGIKLCCE	[2].	DYVSRDLMVAQLKDTTE	[1].	HAHWLEQQLRLIE	142
<a href="#">qi_15599431</a>	76		IHPGTTVPEMLEADLKLERHVRRAALAKGIALCEQ	[2].	DFVSRDILKAQLADTTE	[1].	HAYWLEQQLGLIA	142
<a href="#">qi_15600073</a>	105	[8].	YVEGKTLKDMVTENLIAERIAIDSYREIITYLGN	[1].	DPPTTRIFEEILAQEEE	HADMADILDLLA	177	
<a href="#">qi_17231432</a>	78	[2].	ETVKHTVKDIIQESLNHERKALEMYKSLDITVAN		ASYLLEEFARSMIGQEE	[1].	HNLELKKMLRDFI	144
<a href="#">qi_13474607</a>	76	[1].	LRIGQNVKEVLESDLAGEYDARTAYKRSREICHE	[2].	DYVTMKLFEDLLADEEG	HIDFLETQLDLIA	142	
<a href="#">qi_2506220</a>	76	[1].	IRVGKTVPEMLQYDLDEYEVIANLKEAMVCEQ	[2].	DYQSRDLLLKITADTTE	[1].	HAYWLEKQLGLIE	143
<a href="#">1BCF_A</a>	143	[15].	157	<a href="#">1BCF_A</a>		<i>E. coli</i> (158 aa)		
<a href="#">qi_1705456</a>	143	[15].	157	<a href="#">qi_1705456</a>		<i>Brucella melitensis</i> (161aa)		
<a href="#">qi_1168652</a>	143	[15].	157	<a href="#">qi_1168652</a>		<i>Mycobacterium leprae</i> (159aa)		
<a href="#">qi_9910627</a>	143	[15].	157	<a href="#">qi_9910627</a>		<i>Neisseriam meningitidis</i> serogrupo A (BrfrB 157aa)		
<a href="#">qi_9910626</a>	143	[12].	154	<a href="#">qi_9910626</a>		<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A (BrfrB 154aa)		
<a href="#">qi_15599431</a>	143	[12].	154	<a href="#">qi_15599431</a>		<i>Pseudomona aeruginosa</i> PAO1 (154aa)		
<a href="#">qi_15600073</a>				<a href="#">qi_15600073</a>		<i>Pseudomona aeruginosa</i> (177aa)		
<a href="#">qi_17231432</a>				<a href="#">qi_17231432</a>		<i>Nostoc</i> sp. PCC7120		
<a href="#">qi_13474607</a>	143	[15].	157	<a href="#">qi_13474607</a>		<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099(161 aa)		
<a href="#">qi_2506220</a>	144	[13].	156	<a href="#">qi_2506220</a>		<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803		

**Figura 19.** Alineamiento de secuencias del *cluster* de ortólogos [COG2193](#) empleando el CDD (*Conserved Domain Database*) del NCBI. Se muestra la presencia de homólogos en bacterias pertenecientes a distintos géneros

Como se mencionó en Introducción, en la actualidad, además de contar con la secuencia genómica completa de MPTB, se cuenta con las secuencias completas de numerosas micobacterias y aunque resta la anotación de muchas, constituye una fuente valiosa de información. Con el objetivo de evaluar el grado de conservación de la proteína dentro del género *Mycobacterium* fueron

seleccionadas de la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>), las secuencias de las proteínas de interés de distintas especies representativas del género. Se obtuvieron las secuencias correspondientes a las micobacterias ambientales *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (código de acceso, CP000511), *Mycobacterium* sp. KMS (CP000518), *Mycobacterium* sp. JLS (CP000580); la cepa MC<sup>2</sup> 155 de *Mycobacterium smegmatis*, una micobacteria patógena oportunista (CP000480); las micobacterias patógenas *Mycobacterium ulcerans* Agy99(CP000325), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 (AE016958), *Mycobacterium leprae* TN (AL450380), *Mycobacterium avium* subsp. *avium* 104 (CP000479), *Mycobacterium bovis* AF2122/97 (BX248333) y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (AL123456). Estas secuencias se alinearon con el programa ClustalW disponible en el sitio del *European Bioinformatics Institute*, (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). En la Figura 20, se muestra el alineamiento global de las secuencias.

M.paratuberculosis	MQGDPEVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAEHTRAESFDEMRHAEAITD	60
M.avium	MQGDPEVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAEHTRAESFDEMRHAEAITD	60
M.sp KMS	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQENWGFTELAHTRDESFDEMRHAEAITD	60
M.sp JLS	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQENWGFTELAHTRDESFDEMRHAEAITD	60
M.vanbaalenii	MQGDPEVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAHTRKESFEEMVHAEIITD	60
M.smegmatis	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAHTRAESFEEMRHAETITD	60
M.tuberculosis	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAHTRAESFDEMRHAEIITD	60
M.bovis	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQDNWGFTELAHTRAESFDEMRHAEIITD	60
M.ulcerans	MQGDLDVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQENWGFTELAHTRDESFDEMRHAEAITD	60
M.leprae	MQGDPPVLRLLNEQLTSELTAIQYFLHSMQENWGFTELAERTRVESFDEMRHAEAITD	60
	**** :*:*****:***** :** ***:** **	
M.paratuberculosis	RILLDDGLPNYQRLFSLRIGQTLREQFEADLAIEYEVMDRLKPAIILCREKQDSTTATLF	120
M.avium	RILLDDGLPNYQRLFSLRIGQTLREQFEADLAIEYEVMDRLKPAIILCREKQDSTTATLF	120
M.sp KMS	RILLDDGLPNYQRLFSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVVGRLLKPGIIMCREKGDATSANLF	120
M.sp JLS	RILLDDGLPNYQRLFSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVVGRLLKPGIIMCREKGDATSANLF	120
M.vanbaalenii	RILLDDGLPNYQRLFSLRVGQTVREQFEADLAIEYEVVRLKPGIILCREKGDATSANLF	120
M.smegmatis	RILLDDGLPNYQRLFSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVLERLKPPIVLCREKQDSTAVLL	120
M.tuberculosis	RILLDDGLPNYQRIQSLRIGQTLREQFEADLAIEYDVLNRLKPGIIMCREKQDSTAVLL	120
M.bovis	RILLDDGLPNYQRIQSLRIGQTLREQFEADLAIEYDVLNRLKPGIIMCREKQDSTAVLL	120
M.ulcerans	RILLDDGLPNYQRIQSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVVNRLLKPGIIMCREKQDSTAVLF	120
M.leprae	RILLDDGLPNYQRIQSLRVGQTLREQFEADLAIEYEVMSRLKPGIIMCREKQDSTAVLL	120
	*****: :*:***:*****:*. ****. *:***** *:* *:	
M.paratuberculosis	EQIVADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPS--	159
M.avium	EQIVADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPS--	159
M.sp KMS	ETILADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPH--	159
M.sp JLS	ETILADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPH--	159
M.vanbaalenii	EKILADEEQHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPS--	159
M.smegmatis	EQILADEETHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPGSA	161
M.tuberculosis	EKIVADEEEHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPPT--	159
M.bovis	EKIVADEEEHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPPT--	159
M.ulcerans	ESIVADEEKHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRSHPPS--	159
M.leprae	EKIVADEEEHIDYLETQLELMDKLGVELYSAQCVRPPS--	159
	* *:**** ***** ** :** ** *****:**	

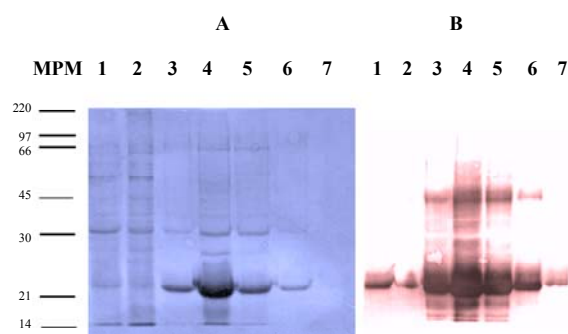
**Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias BfrA.** La figura muestra el alineamiento global de secuencias de la proteína codificada por el gen *bfrA* en las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*, *M. smegmatis*, las subespecies *avium* y *paratuberculosis* del complejo *M. avium* y las cepas micobacterianas KMS y JLS de especie aún no determinada. Se alinearon las secuencias obtenidas de las bases de datos del NCBI con el programa ClustalW. El asterisco "\*", indica que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los dos puntos ":" indican una sustitución conservada; y el punto ".", indica una sustitución semiconservada en esa posición.

Se pudo observar que la identidad entre los homólogos se conserva a lo largo de toda la proteína. La longitud de la secuencia primaria es constante en los distintos miembros (159 aa), con la excepción del homólogo de *M. smegmatis* (161aa). La matriz de similitud muestra una alta identidad entre los distintos miembros del género, siendo superior al 80 % en todos los casos (Figura 21).

micobacteria	Long. (aa)	Identidad de aa entre secuencias (%)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1- <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	159	100										
2- <i>M. bovis</i> . AF2122/97	159	100	100									
3- <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	159	88	88	100								
4- <i>M. avium</i> subsp <i>avium</i> 104	159	88	88	100	100							
5- <i>M. leprae</i> TN	159	90	90	88	88	100						
6- <i>M. ulcerans</i> Agy99	159	89	89	88	88	91	100					
7- <i>M. smegmatis</i> MC <sup>2</sup> 155	161	87	87	87	87	84	83	100				
8- <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	159	84	84	87	87	85	84	88	100			
9- <i>M. sp</i> JLS	159	86	86	87	87	86	89	88	89	100		
10- <i>M. sp</i> KMS	159	86	86	87	87	86	89	88	89	100	100	

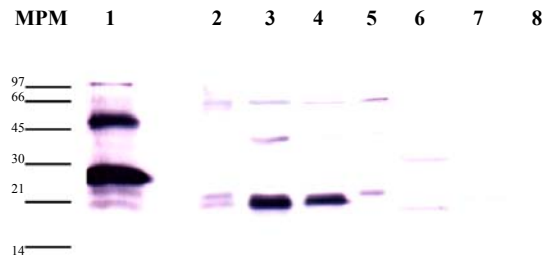
**Figura 21. Matriz de similitud de secuencias BfrA.** La identidad de la secuencia completa entre los homólogos micobacterianos fue calculada utilizando el programa CLUSTAL W (1.83).

**Clonado y expresión de la subunidad BfrA.** Luego de obtener la secuencia del gen *bfrA* por análisis de alineamiento entre la secuencia parcial del clon y la secuencia parcial del genoma de *M. avium* subsp. *avium*, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la totalidad del gen por PCR. Se realizó un clonado direccional empleando los sitios *Pst*I y *Eco*RI del vector de expresión pRSET, se verificó la secuencia clonada por secuenciación y se transformaron *E. coli* BL21(DE). Se evaluó la expresión de la proteína y luego se realizó la inducción de un cultivo de 300 mL con IPTG 1 mM por 3h a 37 °C. Se purificó la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metales, utilizando una matriz de níquel-nitriloacético (Invitrogen). La elución de la proteína se realizó con concentraciones crecientes de imidazol. Como puede observarse en la Figura 22, la proteína eluyó principalmente con una concentración de imidazol de 100 mM.



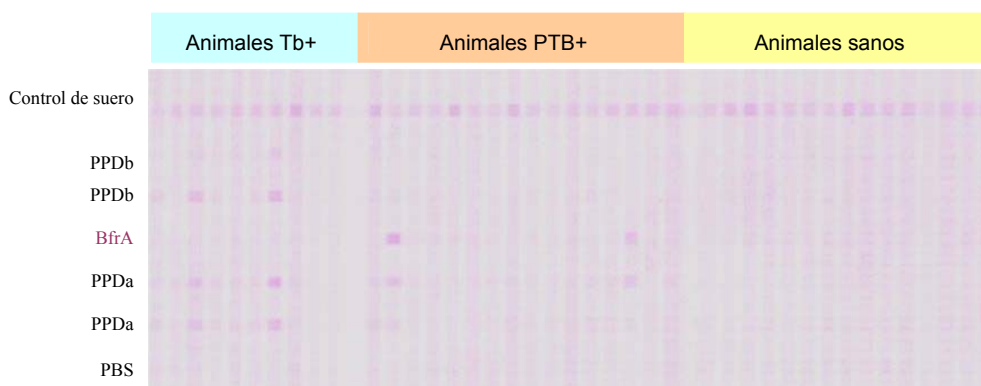
**Figura 22. Purificación de BfrA por cromatografía de afinidad.** Se indujeron bacterias *E. coli* BL21(DE3)-pLys (pRSETB:*bfrA*) con IPTG 1 mM por 3 h. Se muestran las distintas fracciones de la purificación de la proteína recombinante. **A.** gel de poliacrilamida teñido con azul de *Coomassie*. **B.** *Western blot* con anticuerpo anti-histidina. Calle 1, eluato; calle 2, lavado de la columna; calle 3, elución con imidazol 50 mM; calle 4, elución con imidazol 100 mM, calle 5, elución con imidazol 175 mM; calle 6, elución con imidazol 250 mM; calle 7, elución con imidazol 500 mM. MPM: marcador de peso molecular (Amersham), se indican los tamaños en kDa.

**Evaluación de la reactividad cruzada con los homólogos micobacterianos.** Para evaluar la expresión y el reconocimiento de proteínas homólogas en otras micobacterias, se obtuvo un suero hiperinmune específico contra la subunidad de BfrA recombinante de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se inmunizaron ratones BALB/c con 10 µg de la proteína recombinante en PBS, se preparó la dosis de inmunización, formando una emulsión con el mismo volumen de adyuvante incompleto de Freund, tal como se indica en Materiales y Métodos. Una vez completado el esquema de inmunización, se obtuvo el suero y se evaluó su capacidad de reconocer a la proteína recombinante. Se separaron las distintas fracciones proteicas de las micobacterias estudiadas por SDS-PAGE 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar un *Western blot*. Como puede observarse en la Figura 23, se detectó reactividad en los extractos proteicos de *M. avium* (aislamiento de campo), *M. bovis* AN5, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155y *M. phlei* (aislamiento de campo). Se detectaron bandas de mayor tamaño, tanto en la proteína recombinante como en las proteínas nativas, probablemente consecuencia de la multimerización de la proteína. La diferencia de tamaño que se observó entre la forma recombinante y la forma nativa, puede ser consecuencia de la presencia de la secuencia poli-histidina y los aminoácidos adicionales del vector (32aa) que se incorporan en el amino terminal de acuerdo al sitio de clonado seleccionado (en este caso, *PstI*). La proteína se detectó en mayor proporción en el extracto soluble de proteínas de MPTB, aunque también se detectaron trazas en la fracción de proteínas del sobrenadante. Se observó una reacción débil en el extracto de *E. coli*, reconociendo en este proteínas de un peso molecular superior al de la subunidad A de Bfr.



**Figura 23. Detección de BfrA (18kDa) en otras bacterias por *Western blot*.** Se evaluó la reacción del suero específico murino anti-BfrA frente a extractos proteicos de distintas bacterias. Calle 1, BfrA recombinante; calle 2, sobrenadante de MPTB; calle 3, extracto de MPTB; calle 4, extracto de *M. avium* subsp. *avium*; calle 5, extracto de *M. bovis*; calle 6, extracto de *M. smegmatis* (se indica con “\*”); calle 7, extracto de *M. phlei* (se indica con “\*”); calle 8, extracto de *E. coli* K12. El suero hiperinmune se utilizó en una dilución 1/50, el anticuerpo de detección anit-IgG anti-ratón fue empleado en una dilución 1/3.000 MPM: Marcador de peso molecular (Amersham), se indican los tamaños en kDa.

**Evaluación de la respuesta humoral contra la proteína recombinante.** Se enfrentó la subunidad A de la bacterioferritina a un panel de sueros bovinos de la colección de nuestro laboratorio. Se empleó la técnica de análisis multiantigenico MAPIA, tal cual se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron 16 sueros de animales provenientes de tambos con paratuberculosis, estos animales eran excretores de la bacteria por materia fecal, por eso se los considera infectados con la micobacteria y se los denominó PTB+. Adicionalmente se analizaron 10 sueros de animales provenientes de un rodeo con animales positivos a la prueba intradérmica de tuberculina y 15 animales provenientes de rodeos sanos, libres de tuberculosis y paratuberculosis.



**Figura 24. MAPIA: Evaluación de la respuesta humoral frente al antígeno BfrA.** Se muestra el reconocimiento de la proteína recombinante frente a un panel de sueros de animales con tuberculosis bovina (TB+), paratuberculosis (PTB+) o sanos. Se fijaron los antígenos a una membrana (Millipore), se utilizaron 180  $\mu$ L de los antígenos por calle, en una concentración de 50  $\mu$ g/mL (BfrA), 100  $\mu$ g/mL o 50  $\mu$ g/mL (PPDa y PPDb); los sueros bovinos se emplearon en una dilución 1/100, el anticuerpo monoclonal anti-IgG anti-bovino conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), se utilizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se pudo observar que dos animales con PTB reconocieron el antígeno de forma intensa, mientras que ninguno de los animales negativos reaccionó frente a BfrA (Figura 24). Resultó notorio el reconocimiento de las mezclas antigénicas PPDa y PPDb de dos animales pertenecientes al rodeo con tuberculosis bovina (TB), sin embargo, ninguno reconoció el antígeno BfrA recombinante.

#### 4.1.3.2. Análisis del clon pBL-20

Este clon proviene del análisis de la genoteca empleando los sueros de origen murino. Por secuenciación del clon pBluescript-20 con los oligonucleótidos universales T7 y T3, se obtuvo la totalidad de la secuencia del inserto de 2 kb. La búsqueda de homología de las secuencias del extremo 5' y 3' arrojaron una identidad significativa con el gen que codifica para la enzima serina/treonina quinasa, PknB, de *M. leprae* (ML0016) y *M. tuberculosis* (Rv0014). La secuencia completa del gen es de 1881 pb y la proteína de *M. tuberculosis* tiene un peso molecular de 66, 5 kDa.

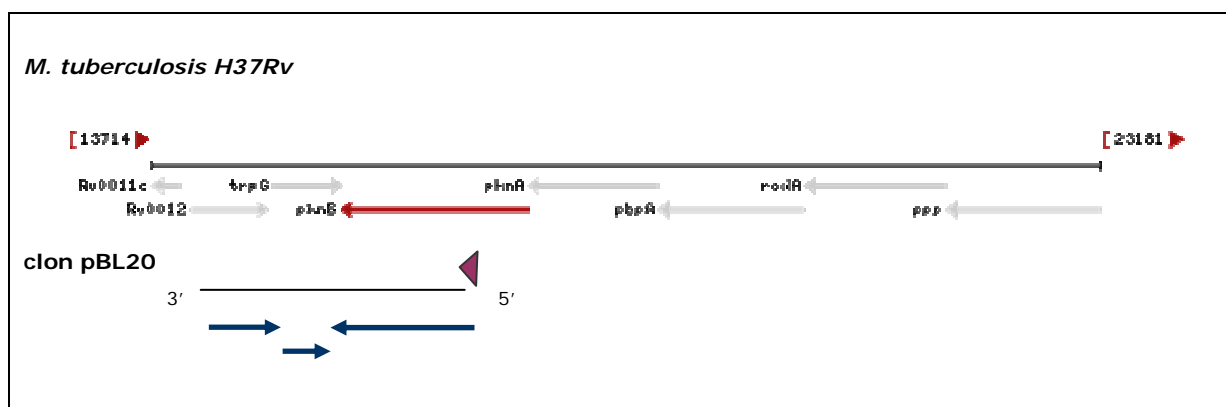
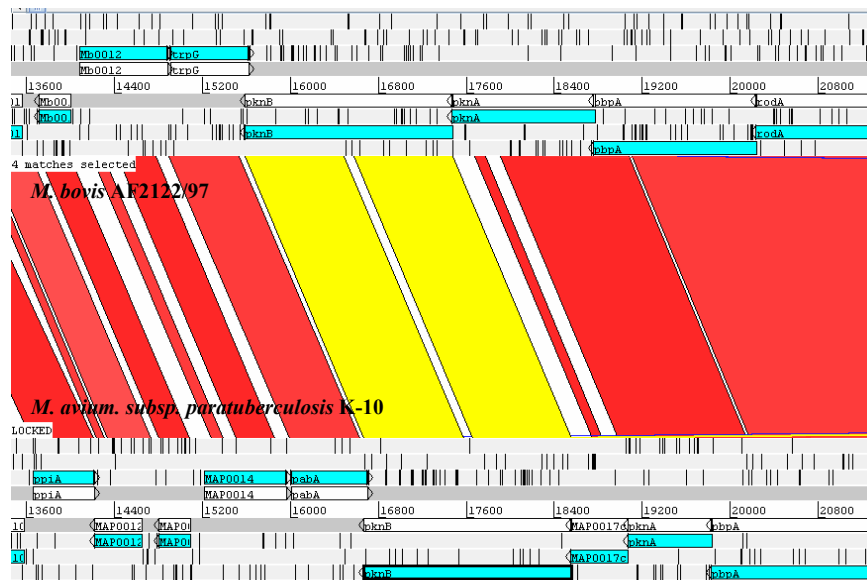


Figura 25. Representación del inserto del clon pBL20 a partir del análisis de alineamiento de secuencias por BLAST con el genoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37RV.

La secuencia completa del gen en *M. tuberculosis* abarca las bases de 15590 a 17470, mientras que el inserto abarca los nucleótidos 16291 a 15589, y esa región tiene un 82 % de identidad. El inserto contiene la secuencia completa del gen *trpG* que codifica para una para-aminobenzoato sintasa y parte de la secuencia del gen *Rv0012* que codifica para una probable proteína de membrana (Figura 25).

**Análisis genómico comparativo *in silico*.** En la actualidad, contando con la secuencia completa de los genomas se puede confirmar que están representados todos los genes presentes en la región genómica de *M. tuberculosis* y que existe en esta región genómica un mismo ordenamiento de los genes (sintenia). Para los análisis genómicos, se utilizó el programa, ACT versión 5 (Artemis Comparison Tool), que permite comparar 2 o más genomas, herramienta del Instituto Sanger, disponible en <http://sanger.ac.uk/Software/ACT/>. Dado el 99 % de homología entre los genomas de

*M. bovis* y *M. tuberculosis*, y la disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *M. bovis*, se utilizó la secuencia de esta bacteria y la secuencia del genoma de MPTB para la comparación genómica. Del análisis se puede observar que el gen está localizado río abajo del gen *pknA* en *M. bovis*, en MPTB existe una secuencia intergénica que contiene una ORF hipotética denominada MAP0017c (Figura 26).

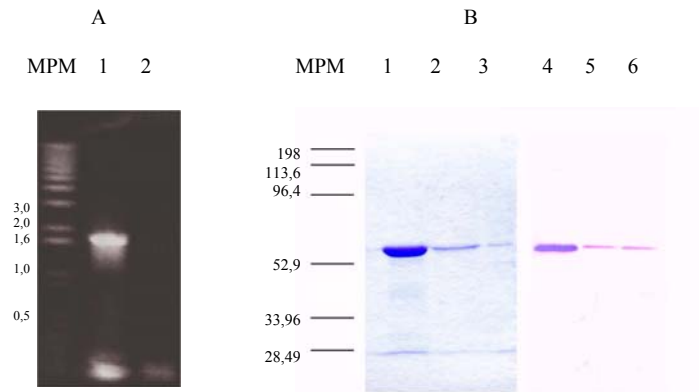


**Figura 26.** Análisis genómico de secuencias entre *M. bovis* AF2122/97 y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10. Se utilizó el visor ACT para mostrar la homología presente en los genes de la región genómica de *pknB*.

#### **Análisis de la secuencia primaria de PknB.**

Esta quinasa pertenece a la familia de proteínas PF00069, en la base de datos PFAM, que agrupa a las proteínas quinasas que fosforilan los residuos serina y treonina. En la base de datos PROSITE, está depositado el consenso que las caracteriza, PS: 00108.

**Clonado y expresión del gen *pknB*.** El gen más cercano al promotor del vector es *pknB*; por lo que se decidió clonar esta secuencia. El peso molecular teórico es de 66 kDa. El primer ensayo de clonado y expresión de la secuencia completa del gen resultó infructuoso. La expresión del gen causaba citotoxicidad en el cultivo de *E. coli*. Por este motivo, se truncó el segmento N-terminal de la proteína. La proteína recombinante expresada en pRSET, se purificó por cromatografía de afinidad a metales. Se realizó la elución de la proteína de la columna utilizando un gradiente de pH (Figura 27). Luego de verificar las fracciones que contenían la proteína recombinante, se dializaron contra PBS.



**Figura 27. Amplificación del gen *pknB* y purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante.** A. Se muestra el producto de amplificación por PCR del gen separado por electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. MPM, marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen), se indican los tamaños en kb. Calle 1, ADN de MPTB; calle 2, control negativo. B. Se clonó la secuencia en el vector pRSET, se expresó la forma recombinante en *E. coli* BL21 y se purificó por cromatografía de afinidad. Calles 1 y 4; 2 y 5, fracciones eluidas con Tris-HCl 20 mM pH2; calles 3 y 6, fracción eluida con Tris-HCl 20 mM pH4. Se muestra el análisis de las mismas por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie y por Western blot-anti-His. MPM, marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

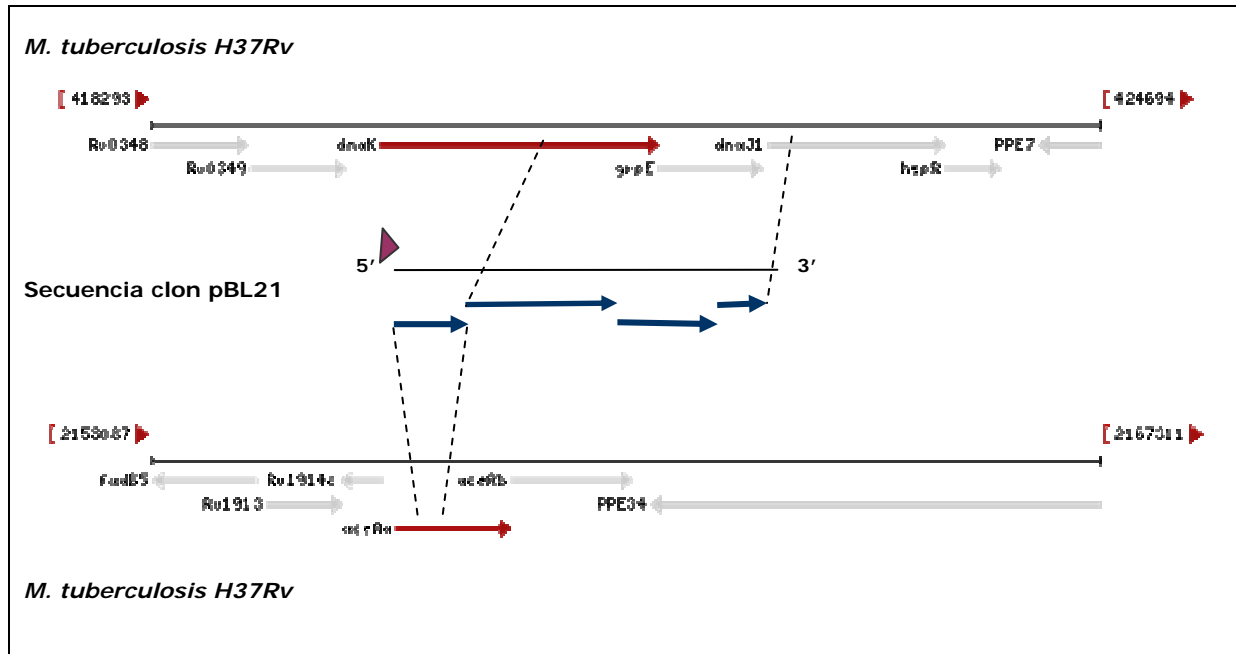
Se evaluó la reactividad de estos sueros frente a la proteína, estos no mostraron reconocimiento alguno de la proteína (no mostrado).

#### 4.1.3.3. Análisis del clon pBL-21

Este clon proviene del análisis de la genoteca empleando los sueros de origen murino. Se secuenciaron un total de 1760 pb con los oligonucleótidos universales T7 y T3. La búsqueda de homólogos por BLAST en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv mostró que 237 pb de la secuencia contenida en el extremo 5' del inserto presentan una identidad del 88 % con el gen *aceAa* (*Rv1915*) que codifica para la enzima isocitrato liasa. La secuencia completa del gen es de 1104 pb que codifican para una proteína de 367 aminoácidos. Este gen se describió por homología del extremo N-terminal con la secuencia del gen *icl* de *M. leprae*. Esta enzima es responsable de la conversión de isocitrato en succinato y glioxilato. Contiene el motivo de Prosite Isocitrato liasa PS00161. Róo abajo de esta secuencia, se encuentra presente un fragmento con homología a una región genómica alejada del gen *Rv1915* (Figura 28). Este fragmento contiene un gen con un 84 % de identidad con el gen *grpE* (*Rv0351*), un fragmento del gen *dnaJ* y 711 pb presentan una identidad del 85 % con el extremo C-terminal del gen *dnaK* de 1878 pb (*Rv0350*). Este gen codifica para una chaperona probable (Hsp70) de 625 aa y una masa molecular estimada de 67 kDa, GrpE es un cofactor de Hsp70 de 235 aminoácidos y una masa estimada de 24,5 kDa y DnaJ es una chaperona de 395 aminoácidos.



En *M. tuberculosis*, *dnaK* está organizado en un operón (operón *dnaK*), este consiste en el ordenamiento de los genes *dnaK*, *grpE*, *dnaJ*, y el gen *hspR*, un regulador transcripcional (Cole *et al.*, 1998).

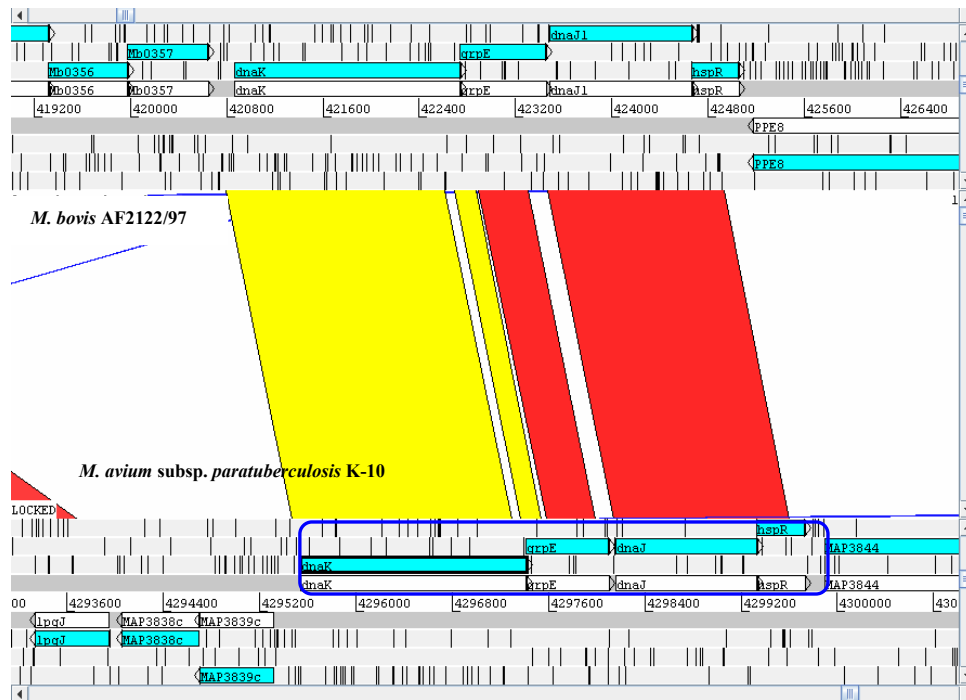


**Figura 28. Secuencia del clon pBL21.** Se obtuvo la secuencia del inserto por secuenciación a partir de los oligonucleótidos universales T3 y T7 y análisis por BLAST del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Este clon contiene 237 pb de la secuencia correspondiente al gen *aceAa*, 711 pb del gen *dnaK*, el gen completo *grpE* y un fragmento del gen *dnaJ*,

Este clon pBL21, se presentó el fenotipo C, según el tamaño de proteína recombinante expresada y según su patrón de digestión. El análisis de las secuencias génicas de los clones pBL22, pBL27 y pBL28, demostró que estos clones eran idénticos al clon pBL21.

Como consecuencia de la presencia del extremo carboxilo-terminal de *dnaK* en estos clones, y que ha sido descrita la inmunogenicidad de la proteína DnaK en distintas especies, se seleccionó este gen para su clonado y análisis.

**Análisis comparativo de las regiones genómicas de *M. bovis* y MPTB, correspondientes al gen *dnaK*.** Para analizar el entorno genético del gen *dnaK* en MPTB, comparativamente al genoma de *M. bovis* AF2122/97, se utilizó el programa ACT. La Figura 29, muestra la conservación de los genes que constituyen el operón DnaK, sin embargo las regiones que se encuentran río arriba de *dnaK* y río abajo de *hspR*, presentan genes sin identidad.



**Figura 29. Análisis comparativo de la región genómica que contiene el operón *dnaK* en *M. bovis* AF2122/97 y *M. avium subsp. paratuberculosis* K-10.** El programa muestra una vista comparativa de los genomas basados en homología. En la parte superior del visor se encuentra la secuencia genómica de *M. bovis*, en la parte inferior, el genoma de MPTB. Las regiones homólogas se muestran en rojo y en amarillo. El operón *dnaK* se encuentra presente en las dos especies. Se resalta en azul, la región genómica que incluye al gen *dnaK* en MPTB.

**Búsqueda de dominios conservados a partir del análisis de la secuencia primaria.** Las proteínas Hsp70 pertenecen a la familia de chaperonas clasificada como Pfam00012. Las chaperonas asisten al plegamiento de proteínas y su actividad es dependiente de ATP. Las Hsp70 están constituidas por dos regiones: el amino terminal, que es el dominio con actividad ATPasa y el carboxilo-terminal, que es el sitio de unión al sustrato. Los miembros de esta familia tienen un peso molecular aproximado de 70 kDa. Asimismo, están clasificados dentro del agrupamiento de ortólogos COG0443. En procariontes, esta proteína es denominada como DnaK, por el nombre de su homólogo eucariota Hsp70, aunque también es conocida por su tamaño como antígeno o proteína de 70 kDa.

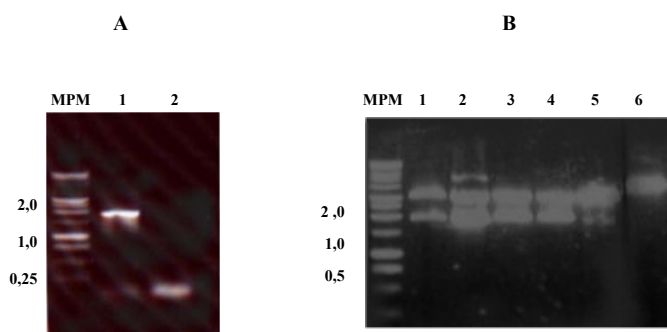
**Análisis de la identidad de secuencias entre los homólogos micobacterianos.** DnaK es una proteína altamente conservada tanto en eucariotas como en procariotas. Para analizar el grado de identidad entre los homólogos micobacterianos, se obtuvieron las secuencias completas de los distintos homólogos, disponibles en las secuencias genómicas de la base de datos NCBI. Posteriormente se realizó un análisis de alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTAL W (1.83). Junto al alineamiento de las secuencias (no mostrado), el programa muestra los distintos *score* de similitud entre las secuencias, que se muestran en la Tabla 8.

micobacteria	Long. (aa)	Identidad de aa entre secuencias (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	625	100									
2- <i>M. bovis</i> AF2122/97	625	100	100								
3- <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	623	92	92	100							
4- <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 104	623	93	92	99	100						
5- <i>M. leprae</i> TN	620	92	92	94	94	100					
6- <i>M. ulcerans</i> Agy99	622	94	94	93	93	90	100				
7- <i>M. smegmatis</i> MC <sup>2</sup> 155	622	89	89	92	92	90	90	100			
8- <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	622	90	90	93	93	90	92	92	100		
9- <i>M. sp</i> JLS	622	90	90	92	92	91	91	91	93	100	
10- <i>M. sp</i> KMS	622	90	90	92	92	91	91	91	93	100	100

**Tabla 8. Matriz de similitud de secuencias DnaK/Hsp70.** La identidad de la secuencia completa entre los homólogos micobacterianos fue calculada utilizando el programa CLUSTAL W (1.83).

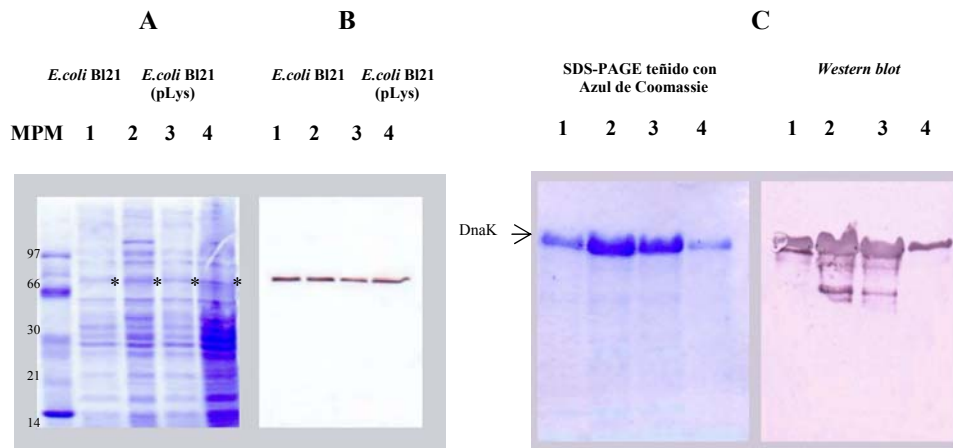
La secuencia de Hsp70 está altamente conservada a lo largo de toda la proteína en los distintos homólogos. La longitud de la secuencia aminoacídica varía entre 620 (*M. leprae*) y 625 aminoácidos (*M. tuberculosis* y *M. bovis*) entre los distintos miembros del género *Mycobacterium*. De los análisis comparativos globales de secuencias entre las distintas micobacterias se puede ver reflejado un alto grado de conservación, superior al 90 % en todos los casos. Siendo secuencias casi idénticas que representan una alta identidad de 99 %-100 % para los miembros más relacionados pertenecientes a un mismo complejo (Tabla 8).

**Clonado y expresión de DnaK.** Se diseñaron los oligonucleótidos para clonar la secuencia completa de 1878 pb correspondientes al gen. Se adicionaron las secuencias *KpnI* y *HindIII* para el clonado direccional de la misma en el vector pRSET (Figura 30).



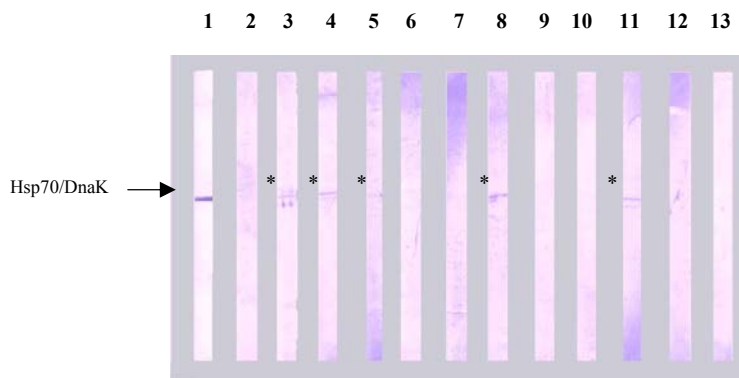
**Figura 30. Clonado del antígeno de 70 kDa. Electroforesis en geles de agarosa.** Se amplificó por PCR el gen *hsp70* de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y se clonó utilizando el vector pGEM-T (Promega). **A.** Se muestra el producto de la reacción de amplificación del tamaño esperado. Calle 1, ADN genómico de MPTB; calle 2, control negativo. **B.** Se muestra el producto de la doble digestión *KpnI-HindIII* utilizando el ADNp de los distintos clones pGEM-T::*dnaK* seleccionados, como se puede observar, todos los clones liberaron el inserto del tamaño adecuado. Calles 1 a 5, ADNp digerido con las enzimas *KpnI-HindIII*; Calle 6, ADNp sin digerir de uno de los clones analizados. MPM: marcador de peso molecular, 1kb (Promega), se indican los tamaños de algunos fragmentos representativos en kb.

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21pLys, y se evaluaron distintas condiciones de inducción de la expresión de proteínas. En todos los casos se obtuvo un nivel de expresión bajo, como muestra la Figura 31 A y B. Sin embargo, luego de la inducción de 900 mL de un cultivo de *E. coli* BL21pLys, se pudo purificar exitosamente la proteína recombinante, como se observa en la Figura 31 C, obteniéndose cerca 1,5 mg del homólogo DnaK recombinante de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.



**Figura 31. Expresión de DnaK recombinante.** Se evaluó la expresión de la proteína empleando las células *E. coli* BI21 y *E. coli* BI21 (pLys). Se indujeron los cultivos a una DO de 0,4 en presencia de IPTG 1 mM por un período de 4 h a 37 °C. Como muestra la figura, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión. **A.** SDS-PAGE 10 % teñido con azul de *Coomassie*. **B.** *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal anti-histidina (1/3000). Calles 1 y 3, células sin inducir; calles 2 y 4, células inducidas con IPTG. Se indica con “\*”, la posición de la proteína recombinante en el gel. **C.** Se indujeron 900 mL de un cultivo de *E. coli* BL(pLys)::DnaK y se purificó la proteína por columna de afinidad Ni-NTA. Se muestran las distintas fracciones eluidas con Tris-HCl 30mM pH 2, evaluadas por tinción con azul de *Coomassie* y por *Western blot* anti-histidina. MPM: marcador de peso molecular (Amersham Biosciences), se indican los tamaños en kDa.

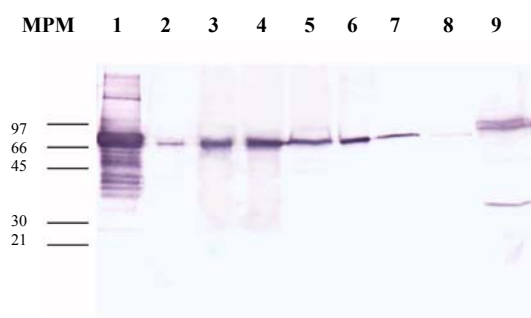
**Evaluación de la respuesta humoral.** Para evaluar la respuesta humoral de los animales infectados con la micobacteria, se enfrentó la proteína purificada a un panel reducido de sueros. Se seleccionaron 6 sueros de animales eliminadores de la bacteria por materia fecal y 6 animales provenientes de un establecimiento libre de la enfermedad. Estos últimos animales resultaron negativos cuando se evaluaron por la técnica de ELISA utilizando como antígeno LAM y el antígeno derivado del extracto protoplasmático de MPTB (Institut Pourquier).



**Figura 32. Respuesta humoral frente al antígeno DnaK de MPTB.** Se evaluó por *Western blot* el reconocimiento de DnaK por parte de bovinos sanos e infectados con MPTB. Se separó la proteína recombinante en un gel preparativo, se transfirió a una membrana, se fraccionó para analizar por *W. blot*. Se emplearon los sueros bovinos diluidos 1/100, y el anti IgG anti-bovino conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), en una dilución 1/3000. Calle 1, control anti-His; calles 2 a 7, sueros de animales PTB+, calles 9 a 13, sueros PTB-. Se indica con “\*”, los animales que presentaron señal positiva.

Se pudo observar que 3/6 animales con diagnóstico de paratuberculosis por cultivo de materia fecal reconocieron débilmente a la proteína recombinante (Figura 32). Sin embargo este reconocimiento no resultó específico de estos animales, dado que 2/3 animales provenientes de rodeos libres de la enfermedad también reaccionaron de forma positiva reconociendo a DnaK.

**Detección de los homólogos de DnaK en otras micobacterias y *E. coli* K12.** Con el objetivo de demostrar la reactividad cruzada entre los distintos homólogos, consecuencia de la alta identidad de secuencias entre las distintas especies, se procedió a obtener anticuerpos específicos contra la proteína recombinante. Se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína recombinante purificada, luego de obtener el suero hiperinmune, se lo utilizó para detectar la presencia de los homólogos en otras especies micobacterianas y en *E. coli* por *Western blot*. Como se muestra en la Figura 33, se pudo detectar la proteína correspondiente con peso molecular esperado en todas las especies evaluadas, demostrando además la reacción cruzada entre ellas. DnaK es una proteína citoplásmica esperándose encontrarla en la fracción de extracto de proteínas de la bacteria, sin embargo, se detectó también la proteína en el sobrenadante de cultivo de MPTB, aunque en menor proporción.



**Figura 33. Reconocimiento de DnaK en otras bacterias empleando sueros murinos anti-DnaK de MPTB.** Se separaron por SDS-PAGE fracciones de proteínas provenientes de distintas bacterias. Luego de transferirse a membrana de nitrocelulosa se realizó un *Western blot* utilizando como anticuerpo primario un suero hiperinmune murino anti-DnaK (1/50), se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG-anti murino conjugado a fosfatasa alcalina(1/3000) (Sigma). Calle 1, DnaK recombinante; calle 2, sobrenadante de MPTB; calle 3, extracto de MPTB; calle 4, extracto de *M. avium*. subsp. *avium*; calle 5, extracto de *M. bovis*; calle 6, extracto de *M. tuberculosis* H37Rv; calle 7, extracto de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; calle 8, extracto de *M. phlei*; calle 9, extracto de *E. coli*. MPM: marcador de peso molecular (Amersham Biosciences), se indican los tamaños en kDa.

**Selección de GrpE.** Los clones pBluescript recombinantes que compartían el fenotipo C, también contenían la secuencia completa del gen *grpE*, que tiene una identidad del 88 % con el gen de la chaperona *grpE* (Rv0351) de *M. tuberculosis*. Este gen de 708 pb, codifica para una proteína de 235 aa, cofactor de Hsp70. Como se ha demostrado la antigenicidad de distintas proteínas inducidas por *stress* térmico, entre ellas, las chaperonas, se decidió evaluar la potencialidad antigénica de esta proteína.

**Análisis de la secuencia primaria de la proteína GrpE.** Esta proteína pertenece a la familia de proteínas PF01025 que abarca a distintas chaperonas ([www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01025](http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01025)). Esta es una familia de proteínas diversa cuya función es proteger a las proteínas del agregado irreversible durante su síntesis o durante períodos de *stress* celular. En procariotas, GrpE, es un homodímero que actúa como co-chaperona de DnaK, y actúa estimulando la velocidad de disociación de ADP en el dominio ATPasa de DnaK. La proteína GrpE tiene un consenso descrito en la base de datos de dominios, familias y sitios funcionales de proteínas PROSITE ([www.expasy.org/prosite/](http://www.expasy.org/prosite/)). Este consenso, PS01071, se corresponde con la región más conservada de la proteína, el extremo C-terminal: [FYLV] - [DNST] - [PHEAYVS] - x(2) - [HMACNQ] - x - [ALV] - [LIVMTNSF] - x(16,21) - [GYP] - [FY] - x(3,4) - [DENGKS] - x(2,3) - [LIV] - [KRIV] - x - [STAG] - x - V - x(0,1) - [IV].

M. paratuberculosis	MTQGNQKTEGNPPEQVTVTDKRRIDPETGEVRHVPPGDTPGGTAPQAATAESG---GAAT	57
M. avium	MTQGNQKTEGNPPEQVTVTDKRRIDPETGEVRHVPPGDTPGGTAPQAATAESG---GAAA	57
M. tuberculosis	MTDGNQKPDGNSGSEQVTVTDKRRIDPETGEVRHVPPGDMPGGTAADAHAH-----TE	52
M. bovis	MTDGNQKPDGNSGSEQVTVTDKRRIDPETGEVRHVPPGDMPGGTAADAHAH-----TE	52
M. ulcerans	MS-----EGNPQEQVTVTDKRRVDPETGEVRHVPPGDTPGGTPPAGADS-----SA	46
M. leprae	MT-----EGNPHEQVTVTDKRRIDPDTGEVRSIPLGDTPGGSEPAGMTDRSANSTDTMV	54
M. sp KMS	MTRP-FNSESDPQEPVTVTDKRRIDPVTGEVREPSGPAPSGPAP-DAAPDSFAGETPEEA	58
M. sp JLS	MTRP-FNSESDPQEPVTVTDKRRIDPVTGEVREPSGPAPSGPAP-DAAPDSFAGETPEEA	58
M. vanbaalenii	MSDP--VDRE----EPITVTDKRRIDPDTGQVREDRENSDAGPAPSGPAPDEFAGESVVEEA	55
M. smegmatis	MTQ---DDS---HEPVTITDKRRIDPETGEVREP-AATPQGSAPASAAP-----ETGGDS	48
	*: . * :*:*****:* **:* *	
M. paratuberculosis	DKVAELTADLQRVQADFANYRKRALRDQQAADRAKAAAVNQLLGVLDLDERARKHGDLE	117
M. avium	DKVAELTADLQRVQADFANYRKRALRDQQAADRAKAAAVNQLLGVLDLDERARKHGDLE	117
M. tuberculosis	DKVAELTADLQRVQADFANYRKRALRDQQAADRAKASVVSQLLGVLDLDERARKHGDLE	112
M. bovis	DKVAELTADLQRVQADFANYRKRALRDQQAADRAKASVVSQLLGVLDLDERARKHGDLE	112
M. ulcerans	AKVAELTADLQRVQADFANYRKRALRDQQAADRAKASVSELLHVAVDI ERARKHGDLD	106
M. leprae	DKVAELTSDLQRVQADFANYRKRALRDQQTASDRAKATVISQLLGVLDLDRAREHGDLD	114
M. sp KMS	DKAGELLADLQRVQADFANYRKRALRDQQLTADRAGVMAQLLP ILDDLDRARSHGDLD	118
M. sp JLS	DKAGELLADLQRVQADFANYRKRALRDQQLTADRAGVMAQLLP ILDDLDRARSHGDLD	118
M. vanbaalenii	GKAAELLADLQRVQADFANYRKRALRDQQLMADRATVVSQLLPVLDDLDRARSHGDLE	115
M. smegmatis	DEVTELKATLQRVKAEDNYRKRALRDQQLIAERTKANVSELLGVLDLDRARSHGDLE	108
	:. ** : *****: : * **:* * :*:*** * : ** :*:***.*****:	
M. paratuberculosis	SGPLKSVADKLESALTGLGLTAFGEEGEEFDPVLHEAVQHEGDG---SKPVI GTVMRQGY	174
M. avium	SGPLKSVADKLESALTGLGLTAFGEEGEEFDPVLHEAVQHEGDG---SKPVI GTVMRQGY	174
M. tuberculosis	SGPLKSVADKLDLSALTGLGLVAFGAEGEDFDPVLHEAVQHEGDGGQSKPVI GTVMRQGY	172
M. bovis	SGPLKSVADKLDLSALTGLGLVAFGAEGEDFDPVLHEAVQHEGDGGQSKPVI GTVMRQGY	172
M. ulcerans	FGPLKAVADKMSVLTGLGLKSFGEEDFDPVLHEAVQHEGDGGQDAK PVI GTVMRQGY	166
M. leprae	SGPLKSVADKLSALTGLGLVAFGVEGEDFDPVLHEAVQHEGDGGEGSKPVI GDVLRHGY	174
M. sp KMS	TGPLKAVADKLVSTLEGLGLTPYEEGDEFPALHEAVQHEGEG---THP VVGTVMRRGY	175
M. sp JLS	TGPLKAVADKLVSTLEGLGLTPYEEGDEFPGLHEAVQHEGEG---THP VVGTVMRRGY	175
M. vanbaalenii	SGPFKAVADKLVAILLEGFGLSGFEEGDEFPALHEAVQHEGEG---THP VVGTVMRRGY	172
M. smegmatis	SGPLKAVADKLVSTLEGLGLSAFGEEDFDPQLHEAVQHEGDG---THP VVGTVMRRGY	165
	**:*:*****: : * **:* * :*:*** * : ** :*:***.*****:	
M. paratuberculosis	KLGDQVLRHALVGVVDTVTVEEGDGEAAATDEPTAAA--AETRPPE SDDNAGASGD-----	227
M. avium	KLGDQVLRHALVGVVDTVTVEEGDGEAAATDEPTAAA--AETRPPE SDDNAGASGD-----	227
M. tuberculosis	QLGEQVLRHALVGVVDTVVVD--AAELESVDDGTAVADTAENDQADQGN SADTSGEQAASE	231
M. bovis	QLGEQVLRHALVGVVDTVVVD--AAELESVDDGTAVADTAENDQADQGN SADTSGEQAASE	231
M. ulcerans	QLGEHVLRNALVAVVETIADD-TSEAGSTQQPADSG---EAGR PDTADNADAPAE-----	217
M. leprae	KLGDQVLRHALVGVVDTIAGD-GAETVAIVAPVDST--AKTEQGE LGDNVTPHKEDGD--	229
M. sp KMS	KVGDQVVRHALVGVVDTVPAGDTAENASAAGR-----EAAESDNQ-----	215
M. sp JLS	KVGDQVVRHALVGVVDTVPAGDTAENASAAGR-----EAAESDNQ-----	215
M. vanbaalenii	RVGEQVVRHALVGVVDTIPDASGPANTGSEPE-----QPAES-----	209
M. smegmatis	RVGEQVIRHAMVGVVDTVDPNASEDGSQAQPEDGSGDKPDAAAEQAAESDN-----	216
	::*:***:*.**:*:	
M. paratuberculosis	----	
M. avium	----	
M. tuberculosis	PSGS 235	
M. bovis	PSGS 235	
M. ulcerans	----	
M. leprae	----	
M. sp KMS	----	
M. sp JLS	----	
M. vanbaalenii	----	
M. smegmatis	----	

**Figura 34. Alineamiento múltiple de secuencias GrpE.** La figura muestra el alineamiento de secuencias de la proteína GrpE en las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*, *M. smegmatis*, las subespecies *avium* y *paratuberculosis* del complejo *M. avium* y las cepas micobacterianas KMS y JLS de especie aún no determinada. Se alinearon las secuencias obtenidas de las bases de datos del NCBI con el programa ClustalW. El asterisco "\*", indica que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los dos puntos ":", indican una sustitución conservada; y el punto ".", indica una sustitución semiconservada en esa posición.



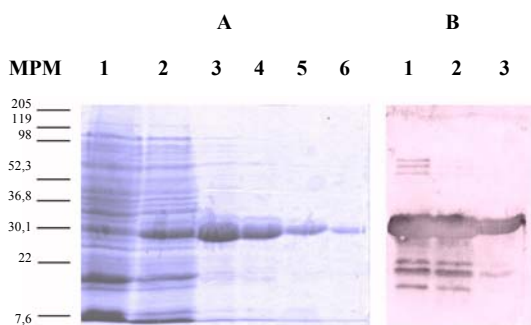
**Análisis de la identidad de secuencias entre los homólogos micobacterianos.** GrpE se sintetiza como parte del operón *dnaK*, siendo el producto principal de este operón, DnaK, una proteína altamente conservada tanto en eucariotas como en procariotas. Para analizar el grado de identidad entre los homólogos micobacterianos, se obtuvieron las secuencias completas de los distintos homólogos, disponibles en las secuencias genómicas de la base de datos NCBI. Posteriormente se realizó un análisis de alineamiento múltiple utilizando el programa CLUSTAL W (1.83) (Figura 34). Junto al alineamiento de las secuencias, el programa muestra los distintos *score* de similitud entre las secuencias, que se muestran en la Tabla 9.

micobacteria	Long. (aa)	Identidad de aa entre secuencias (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1- <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	235	100									
2- <i>M. bovis</i> AF2122/97	235	99	100								
3- <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	227	74	74	100							
4- <i>M. avium</i> subsp <i>avium</i> 104	227	74	74	99	100						
5- <i>M. leprae</i> TN	229	68	68	67	67	100					
6- <i>M. ulcerans</i> Agy99	217	71	71	69	70	67	100				
7- <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	216	59	59	60	60	55	57	100			
8- <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	209	58	58	59	59	57	55	65	100		
9- <i>M. sp</i> JLS	215	57	57	64	64	60	55	61	72	100	
10- <i>M. sp</i> KMS	215	57	57	64	64	60	55	61	73	99	100

**Tabla 9. Matriz de similitud de secuencias GrpE.** La identidad de la secuencia completa entre los homólogos micobacterianos fue calculada utilizando el programa CLUSTAL W (1.83).

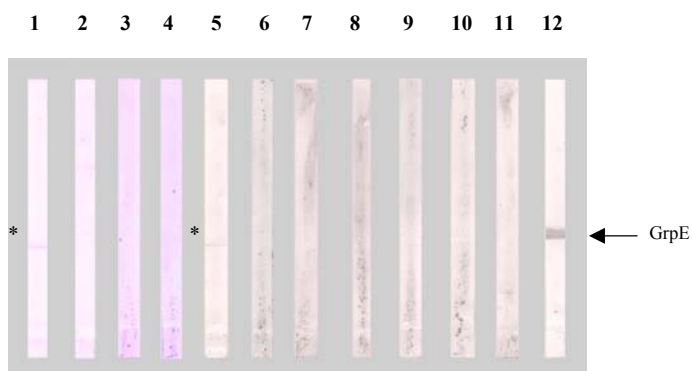
Los distintos homólogos GrpE micobacterianos son mucho más variables respecto de DnaK. En cuanto a la longitud de la secuencia, su tamaño va desde 209 aa (*M. vanbaalenii*) hasta 235 aa (complejo *M. tuberculosis*). Se pudo observar en el alineamiento de secuencias, que las regiones más variables son las amino y carboxilo-terminal. En la matriz de similitud se pudo observar nuevamente que una identidad alta (99 %) intra-especies pertenientes a los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*. Asimismo, existe una identidad del 99 % entre las cepas de especies aún no determinadas JLS y KMS. Sin embargo, a diferencia de DnaK, existe una identidad menor, del 74 % entre los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium*. Estos homólogos, presentan los menores porcentajes de identidad con aquellos homólogos de las micobacterias no patógenas como *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. vanbaalenii* PYR-1, *Mycobacterium* sp. JLS y *Mycobacterium* sp. KMS. Pese a que *dnaK* y *grpE* son genes que comparten la regulación de su expresión, su evolución pudo haber sido distinta.

**Clonado y expresión de GrpE.** Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores para relizar un clonado direccional de la secuencia completa del gen *grpE* de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se seleccionaron los sitios únicos *Bam*HI y *Eco*RI del sitio múltiple de clonado del vector pRSET. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 y se indujo un cultivo de 500 ml durante toda la noche a 37°C. Se purificó la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metales, realizándose una elución competitiva con imidazol (Figura 35).



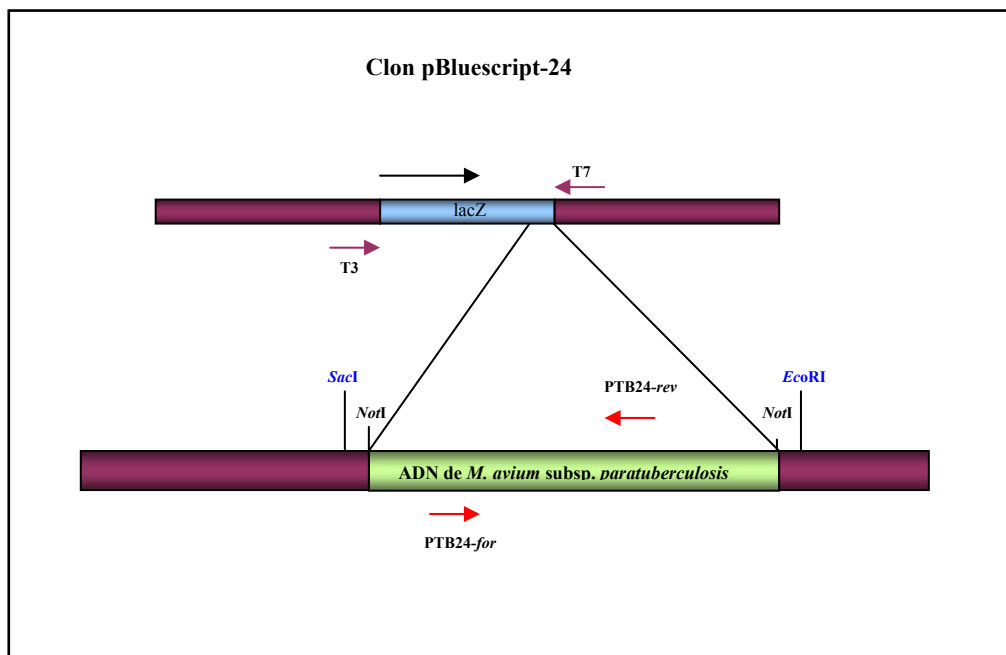
**Figura 35. Expresión heteróloga y purificación de GrpE.** El gen fue clonado en el vector de expresión pRSET y se expresó en *E. coli* BL21 induciendo con IPTG 1 mM por 16 h a 37 °C. Luego de purificar en columna de níquel, se sembraron las fracciones en SDS-PAGE 12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **A.** gel teñido con azul de Coomassie. Calle 1, percolado; calle 2, primer lavado; calles 3 a 6, elución con imidazol 1M. **B.** *Western blot* (anti-His) de las fracciones 3, 4 y 5. MPM: marcador de peso molecular (Bio-Rad), se indican los tamaños en kDa.

**Evaluación de la respuesta humoral contra GrpE.** Se evaluó el reconocimiento de la proteína recombinante por animales sanos (PTB-) y con paratuberculosis (PTB+). Como puede observarse en la Figura 36, 2/6 animales PTB+ reconocen a la proteína mientras que ningún animal PTB- lo reconoce.



**Figura 36. Reconocimiento de GrpE por parte de bovinos sanos e infectados con MPTB.** Se corrió la proteína recombinante en un gel preparativo, se transfirió a una membrana para realizar un *W. blot* con los sueros de los animales, diluidos 1/100. Se empleó el anticuerpo de detección, anti-IgG bovino (Sigma) en una dilución 1/3000. Calles 1 a 6, sueros de animales PTB+; calles 7 a 11, sueros PTB-. Calle 12, control, incubado con el anticuerpo anti-His (1/5000). Se indica con “\*”, los animales que presentaron señal positiva.

**4.1.3.4. Análisis del clon pBL-24** Este clon deriva del análisis de la genoteca con los sueros murinos hiperinmunes y es producto de la escisión automática del vector  $\lambda$ -Zap. Este plásmido, pBL24, tiene un tamaño de inserto aproximado de 2 kb y fue secuenciado parcialmente con los oligonucleótidos T7 y T3. El análisis de alineamiento por BLAST de la secuencia parcial obtenida del clon pBL-24, no mostró identidad significativa con ninguna secuencia depositada en la base de datos del NCBI. Considerando la posibilidad de estar frente a una secuencia novedosa, se diseñaron oligonucleótidos adicionales, PTB24-*for* y PTB24-*rev* para secuenciar la totalidad del inserto clonado (Figura 37).



**Figura 37. Representación del inserto en p-Bluescript (pBL24), derivado por escisión automática del vector  $\lambda$ -ZapII.** Se muestran los sitios de restricción utilizados para liberar el inserto del vector (*EcoRI* y *SacI*) y el sitio de clonado de los fragmentos genómicos (*NotI*). T7 y T3, son los oligonucleótidos universales que hibridan por fuera de la secuencia clonada y se emplearon para secuenciar el inserto de pBL-24. PTB24-*for* (5'CATCAAGAAGGGGCTGGGCGG 3') y PTB24-*rev* (5'GGGTGCCGAAGTGGTAGCAGG 3'), son los oligonucleótidos diseñados para obtener la secuencia completa del ADN de MPTB presente en este clon.

Los resultados de la búsqueda por BLAST empleando la totalidad de la secuencia del inserto en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, no reportó la presencia de secuencias homólogas. Se realizaron análisis de alineamiento de secuencias en el sitio de genomas incompletos disponible en TIGR, y se obtuvieron regiones que presentaban una identidad del 99 % con una secuencia contenida en el fragmento genómico, disponible con el número 3294, de la secuencia parcial del genoma de *M. avium* subsp *avium* 104. Las secuencias parciales del genoma de MPTB, no estaban disponibles al momento de este análisis. En consecuencia, se obtuvo la secuencia del fragmento 3294, perteneciente a *M. avium* subsp. *avium* 104, que contenía el segmento correspondiente a la

secuencia de interés (Figura 38). Nuevos análisis de alineamiento mostraron que la secuencia del extremo 5' de la secuencia vecina a la contenida en el inserto de pBL24, tenía identidad con el gen *sigF* de *M. tuberculosis* H37Rv, determinada en 56 % por BLAST-p, mientras que la secuencia del extremo 3', no presentó homología alguna con esta bacteria.

```

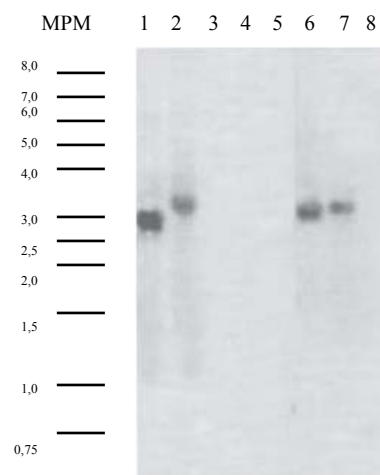
CTGCGAGGTTCCGCTGCACGACTCGAGGAGTGAAGTGAAGAGTGGCCAGCCT Inicio SigF
ATGACCAAGCAATCCGTCGACACCTACAGTCCGCGGCCACCACCCAAATCCGACGATTCGTACGAAGACGTCGTGGAGATGTTCTGTGAAGTCCGCGGGATGCCCGGGAT
CGCACGATACCGCCGTGAGCGCATCGTGGCCGATGCTGCCCCGTCGCGCATACGTTGGCCAGCCATTTCCGCCCGCGCGGAGGGTCTGACGCACTTTGTTCCAGGT
CTCGTGGCCGACTCGTGGGGACATCGACCCGAGATCGAGCACATCAACAACCGGGAAGCGCTGCGGGTCTGTTGCGCCACCTGCGCACCCGGAACCGCGAGGTTTGCGG
TACAGCTGGGGGATGCGGGTCCGCGGCTGCGGAGTTGCACTGCGAGTACGACAGGACGACCCGCACTCGCCACGAGCTCGCCCGGGCGCAACCGCGGGAGCTCT
CGCAGTGTCTGAGGTTCCGCGGGAAGAGATCGTCAATGCTGGTGGCCGCGGACGCTATCGCTCGACTCGTTGGATCGCCGCGAGGGTCCGGAAGTTCGCGGACCGCCG
CTCGTGGCCGACTCGTGGGGACATCGACCCGAGATCGAGCACATCAACAACCGGGAAGCGCTGCGGGTCTGTTGCGCCACCTGCGCACCCGGAACCGCGAGGTTTGCGG
ATGCGGTTCTTGAATCCATGACCCAGAGCCAGATAGCCGAGCGGATCGGGTCTCGCAGATGCGAGTCTCGGCGATCCTGGCAACACCCCTCGGCTGCTGGCGGACCAACTCG
AGTAA Fin SigF ACCGTTCAATCCAGGAGTGTCCGCGCATTTGGCTCCGCGGAGCACTGTACTGTGCGATGCGGAAGACGAACCGAGTGTGTCGCGGGAGGTTGCGCA
GGAGCTGGAAGGAGCTCGATGCTAGGACTTCACTGCGGTGATCGCGGGTGGCGGACGACGCGCTGGCC Inicio clon pBL24 GTGTCGGTCCGCGGGT
GGCGCAGCAACAAGTTCGACGCTTCGAGTTCGAGACCGGATCCGCGACCTCGTGCAGCTCGGCCACCAGCCCGCGCGGACCGCCCTCGTCCGCGGGCGCGGACGCG
CAACGAGTACGCAAGTCTCTCATCCAGGAGCGAGCATCAACGCGCGGTCCTCTTACCGGCGCTCCACCGACCGCAACCCCAACGGCCAGCCGCGGTCTCCACCACTTC
AAAGCAGGAGCGCGGCGCAAGATCAAGATCAACATCGGCATCTACGACGACCCCGCGCGGACCAACCGATTGAACCGCGGAGAGGGCGAGGCGCGGTGTTCAAAG
ACCCGAGCAGCGCGCTCAACATCGGCGCGCGGCGCAGCAGCTGATGGTAAACGACCCGACCGCAGCAAGGGTGTGGTGTACTGTGTTACCGAGGGCAAGGCGCTGGC
GACCTGGAGTTTCAAGGTTCCACCGACAGCTGGCCCGCCGGAATTCGTAACAGCATGTCGCGCAGAAAGCAGGACGCGGCACTAAGAAGGGGTGGCGGGTAGCTAGCGGCT
GGGAGGGGGCGGACGTAAGCATCAACGGGATGCGCGCCATGCGCTGTGTGTGATTTCTGTGCTGGTGTGTCGCGCTGACGCGCTGTGGACATCGTGTGGGGCTC
TGGCGCGCGCGCGCGGGCGAGTGTGTTGCTGACGGTATCTGGCCGTGGTCAAGTGGCGCTGACCGCGATCAACATCGACCGCGGGATGGCTGTACGACGAGCGGG
CCAACCCGACCCCATCTGTCAGGAGCAGCCACCTGGGCAAGTGCATGACTACTTTCCGCGCCCTGTGGCGGTGCGATCGTGTGGCACTGCTGGCCCTGATGAAAG
CCGCTGGACAAGCGGCTCTGTCGACCCGCGGCTGCTCCGCTCTGGCGCTGGGCACTCGGATCGCTCGATGTTCCAGATCTACCGGGTGGTGGGCGGCGCAATCG
GTTTGGGGCGGAGATAGCGCACTGAAAGAGCGCACCCGGGATAACGCTCCCGGATCAGCGGTGGGGTGGAGCAAAACAGCCGAAATCGCCGCGCACCGCGAGTCTT
GGGCGAGCCGTAATTCGCGCAGTGGCCAGCGCGGCGGCCAGGCGCGCTGGCGCTCTTGTCCACTGAGCAGTGCACCGCGCGAGCAAAAGATGCCCCCGCTGGCAACGCT
GACCCGTTGTGCGCTTGTAGATTCGCGGACCAAGCGGGTGGCGCGGCTCCCGAGTTCGAACCGCAACAACAGACCGTCAAGAAAGGAGCACTGACCGCTGGCGCTT
CGGGCGAGGCGGCTGGGCTCCGAGACGTTGATCCGACATTCGGCAGACCGGGAGGTCAGACACTCCAGCGCCCTTCTGTGGCAACCGCAGCAGCCCTCCACGCGCT
CGAAGTTCGCGCGCGCGGCGCATCAGCAGCGGTAGACCGCGGCTGGGGCCAAACCGCTGAGCAGGAATTCATGCCAGCATGATTTCGCGGTGAGCGCGCTCGAGCGTCA
GCGCGATGAAATGCGCTGCAAGCCGCCCACTTTGACCGAGGACCGCGCGCCACCCGGGTCGCGCTGGCGCGCGGTGCGGAC Fin clon pBL24 TCCTGCCCTCGC
CGCGGTTGCGACGTTAAATAAATGCTTGAATTAACAGAGGGTGGGTGTTCCGCGCCCGGAGGTTGTTTCGCGGAGCGCGGGATGTACCGCTGTGCAACCGGAGATCAG
CGAAGCCCGCGGAGGGCAACAACCGCCGCTGCTACCACTTCGGCACCGGGTGCATCTGCTCCGCGCATCGAGGGCAAGCACCGCGAGCCGATCGAGAAGCTGGCGCG
CAGATGTTGGCCGCGCTCGCGGATTCACCGAGCTGCGGACTGGTGGGACGCTGGTGGCGCGCTGACCGACCACTGTCGCGCTGGGACCCCAAGCTGATGTCGCGGT
TCCGCGCCAGCCATGGCCGATCCAGCTACCGCACGTTGTCACCAAGGACCGCTGAGTTCCGCGTGTGTTGCGCACCTCGACGGCATCAACCGCTGCTCCGAGCT
GCCCGCGGGTGGCGCGGAGCGCATGTTCTGAGGCGATGACCGCGAGCGCATCGCTGAGTTCCGACAGATCGACGGGACCCGAGAGGCCATCTCTGATGTTGCGCAACTTC
TCATGCACACTTCGCGCGAGCACAGGGCGCGCTGGCCGGAACAGCGGCGCGGTCGCGTGGCGCGGTGCGCGGAGGGCTGATCGACGCCATCGTCCGGCTGTGGCG
AGCGCGGTGACGTTGGCGCGCGCGGCTCCACGCGGCGAGACCGGACCGGCGACCGGATCAACCGAGGACCACTGACGCGAGCCCTGACCGACGCGCGACA

```

**Figura 38. Secuencia del fragmento 3294 de la secuencia parcial del genoma de *M. avium* subsp. *avium* 104.** Se muestran en azul los nucleótidos contenidos en la secuencia del inserto del clon pBL24. El análisis por BLAST en el genoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, no reportó homología en esta secuencia, como en la secuencia que se encuentra río abajo, que se muestra en negro. Se muestra río arriba, en verde la secuencia correspondiente a una secuencia con un 56 % de identidad a nivel de secuencia aminoacídica con SigF de *M. tuberculosis* H37Rv. Se resaltan los codones de iniciación y terminación del marco de lectura abierto seleccionado para el estudio como antígeno potencial.

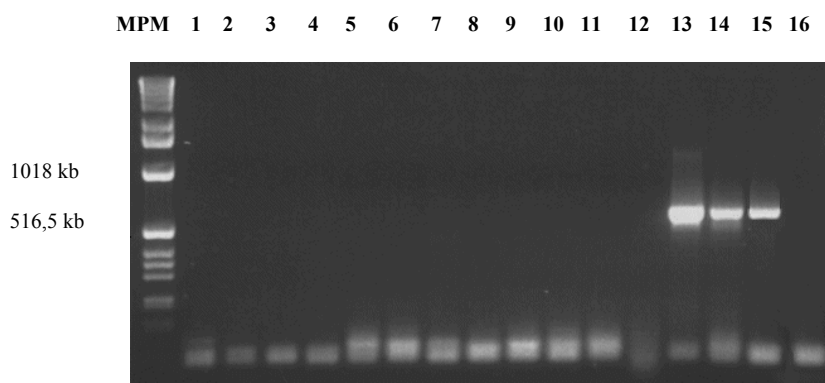
Con la secuencia del inserto y las regiones vecinas, se realizó un análisis de los marcos abiertos de lectura posibles, utilizando en programa *DNA Strider* 1.2. De todas las ORF posibles dentro de la secuencia, se seleccionó una de 633 pb, presente en el extremo 5' del inserto del clon pBL-24 y posiblemente en fase con el gen de β-galactosidasa del vector. Como ya se mencionó, río arriba de la secuencia, hay un gen homólogo a *sig F*. Río abajo de la secuencia, hay un marco abierto de lectura de función desconocida, seguido por una secuencia que tiene un dominio conservado en micobacterias, pero de función desconocida y más alejado un gen regulador de la familia *tetR*. Cuando se evaluaron los extractos de un cultivo de *E. coli* XL-blue (p-Bluescript 24) inducido con IPTG por *Western blot* utilizando los sueros murinos, mostró una proteína de fusión de un tamaño aproximado a 35 kDa, por lo tanto el marco abierto de lectura de 633 pb que codifica para una proteína de un peso teórico de 21 kDa, podía ser compatible con esta observación (dado que resta la contribución de β-gal). Obtenida la secuencia de la proteína hipotética de 210 aminoácidos, se corroboró por análisis comparativo de secuencia que la misma no tenía homólogos en el resto de las micobacterias secuenciadas a ese momento, como *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AF2122/97 y *M. leprae* TN.

**Detección del gen en otros representantes del género *Mycobacterium*.** Con el objetivo de corroborar los resultados preliminares derivados del análisis bioinformático, que sugerían la presencia de un gen hipotético exclusivamente en el MAC, se decidió evaluar la presencia del gen en otras micobacterias. Se emplearon las técnicas de hibridación con sonda (*Southern blot*) y de amplificación génica (PCR). Se digirió el ADN genómico de diferentes especies micobacterianas con la enzima *BstEII*. Los fragmentos fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa y transferidos a una membrana de *nylon*. Se hibridó la membrana utilizando como sonda el marco abierto de lectura completo del gen hipotético, marcado radiactivamente. Se observó hibridación positiva de la sonda con los representantes de la especie *avium* (Figura 39). Por el contrario, no se detectó señal de hibridación de la sonda con el ADN genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. bovis* AN5, *M. tuberculosis* H37Rv o *M. phlei*, de esta última especie, se empleó un aislamiento de campo de nuestra colección.



**Figura 39. Análisis de la presencia del gen por *Southern blot*.** Calles 1 y 6, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Malele-505; calle 2, *M. avium* subsp. *avium*; calle 3, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; calle 4, *M. bovis* AN5; calle 5, *M. tuberculosis* H37Rv; calle 7, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, (aislamiento de campo); calle 8, *M. phlei*. MPM: 1 Kb (Promega), se indican los tamaños de los fragmentos en kb.

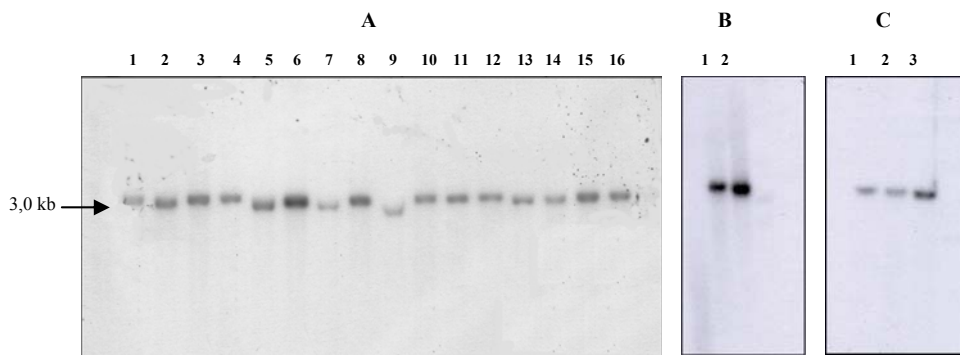
Con el objetivo de ampliar el análisis a un mayor número de micobacterias no contempladas en el ensayo de *Southern blot*, se realizó un análisis mediante amplificación del gen por PCR utilizando como templado ADN de las siguientes micobacterias: *M. phlei*, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5, *M. pinipedii*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *intracellulare*, *M. chitae*, *M. africanum*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. aurum*, *M. terrae*, *M. leprae*. El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa y se observó la presencia o ausencia de un fragmento compatible con el tamaño del gen (611pb). Solamente se detectó el producto de amplificación en las muestras de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *intracellulare* (Figura 40). Como control de calidad del ADN, se amplificó por PCR el gen de la proteína de 65 kDa (Hsp65), que está conservado en todas las especies micobacterianas, dando en todos los casos un producto de amplificación del tamaño esperado (no mostrado).



**Figura 40. Amplificación del gen en distintas especies micobacterianas.** Electroforesis en gel de agarosa 1,5% del producto de amplificación. Se emplearon los oligonucleótidos y las condiciones detalladas en Materiales y Métodos, utilizando como templado, el ADN genómico de distintas especies de micobacterias. Calle 1, *M. chitae*; calle 2, *M. aurum*; calle 3, *M. fortuitum*; calle 4, *M. gordonae*; calle 5, *M. terrae*, calle 6, *M. phlei*; calle 7, *M. smegmatis*; calle 8, *M. africanum*; calle 9, *M. pinipedii*; calle 10, *M. bovis* AN5; calle 11, *M. tuberculosis* H37Rv; calle 12, *M. leprae* (ADN proveniente de una lesión lepromatosa); calle 13, *M. avium* subsp. *avium*; calle 14, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; calle 15, *M. avium* subsp. *intracellulare*; calle 16, control negativo de la PCR. MPM: marcador de peso molecular, 1 Kb (Invitrogen), se muestran tamaños de referencia de algunos fragmentos.

Estos resultados, junto al del *Southern blot*, confirmaron que el gen en estudio está presente únicamente en las especies del MAC y no se encuentra distribuido en otras especies micobacterianas.

Se han reportado distintas deleciones que involucran la ausencia de genes, que permiten diferenciar, incluso entre distintas cepas de la misma especie de micobacteria (Marmiesse *et al.*, 2004), por este motivo, se decidió evaluar la presencia del gen, en aislamientos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de distinto origen. Para esto, se realizó un *Southern blot* utilizando, como en el ensayo anterior, el gen completo como sonda. Se evaluaron 16 aislamientos provenientes de bovinos de raza Holando argentino, 1 aislamiento ovino y 1 aislamiento proveniente de un mouflon (*Ovis musimon*). Como muestra la Figura 41, el gen se detectó en todos los aislamientos, lo que indicó que se encuentra homogéneamente distribuído en los aislamientos de distinto origen estudiados.

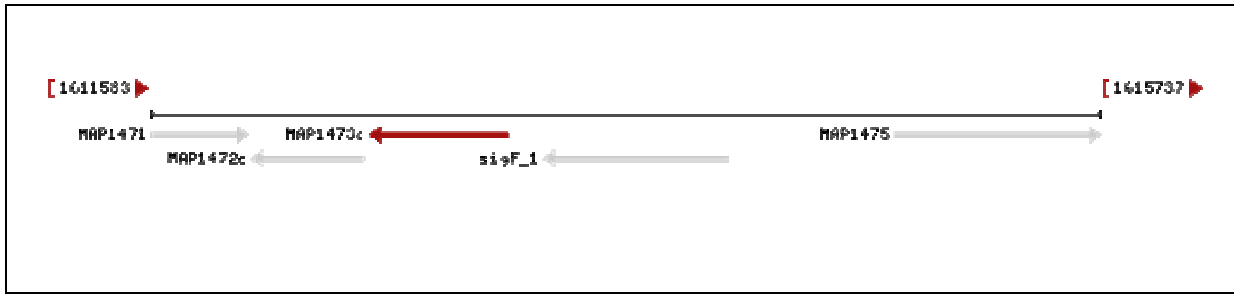


**Figura 41. Presencia del gen en distintos aislamientos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.**

Se estudió la presencia del gen por *Southern blot*. A. Calles 1 a 16, aislamientos bovinos. B. Calle 1, aislamiento proveniente de mouflon (*Ovis musimon*); calle 2, control bovino. C. Calle 1, aislamiento ovino; calles 2 y 3, controles bovinos.

**Análisis de secuencia del gen.** La posterior finalización, de la secuenciación del genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 y de su anotación, permitió determinar que la secuencia identificada en el clon pBL-24, se corresponde con el gen anotado como MAP1473c, localizado en la posición 1.612.931 del genoma de la bacteria (

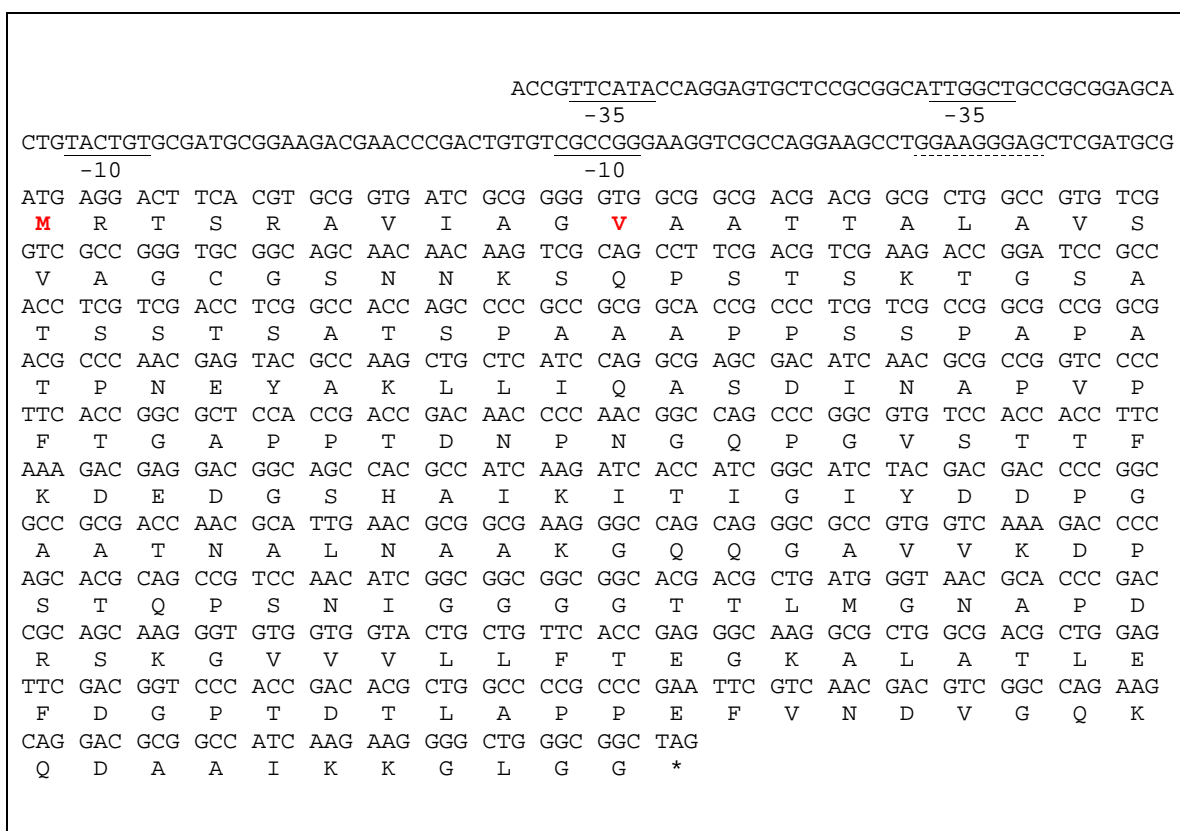
Figura 42). El análisis genómico comparativo empleando el programa ACT, confirmó que la región que involucra al gen *MAP1473c* en *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10, no se encuentra en *M. bovis* AF2122/97. Los análisis por BLAST, en los genomas actualmente disponibles confirmaron los resultados experimentales que mostraron que el gen MAP1473c, es un gen exclusivo del complejo *M. avium*.



**Figura 42. Localización de MAP1473c en el genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10.** Se muestra en rojo, el marco abierto de lectura seleccionado del clon pBL-24. Río arriba, se encuentra un gen relacionado al factor  $\sigma$  (Pfam04539). Río abajo se encuentra una gen que codifica para una proteína hipotética (MAP1472c), y luego un gen, MAP1471c, cuyo producto tiene un dominio conservado de función desconocida (DUF385; CDD, NCBI)

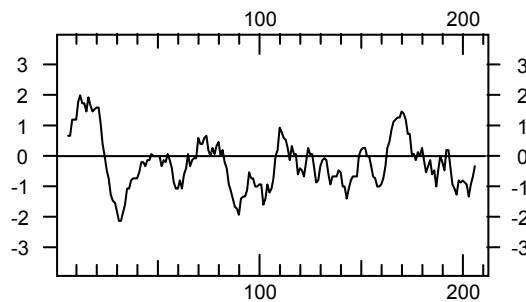
La secuencia codificante y la region regulatoria del gen, se muestran en la Figura 43. La secuencia nucleotídica muestra un alto contenido de G+C (69 %). Se identificó una secuencia potencial de Shine-Dalgarno (GGAAGGGAG), presente 12 pb antes del codón de iniciación ATG. Se localizaron los elementos promotores  $-35$  y  $-10$ . De acuerdo a estos elementos, se descartó que el primer aminoácido de la secuencia fuera valina (V), localizado a 10 aminoácidos del seleccionado por este trabajo, metionina (M). La secuencia codifica un producto de 210 aminoácidos, entre los cuales, alanina es el más abundante (14,6 % del total). Los aminoácidos glicina, treonina y prolina también son abundantes en la secuencia, representando el 11,3, 10,4 y 9,4 % respectivamente.





**Figura 43. Se muestran la region codificante y regulatorias del gen.** La secuencia deducida de aminoácidos se muestra debajo de la secuencia nucleotídica. Dos secuencias promotoras -10 y -35 probables y alternativas están subrayadas. Los nucleótidos CGCCGG corresponden a la secuencia promotora propuesta -10, (similar a CGCCTG del gen *fbpA* de *Mycobacterium tuberculosis*, y TACTGT, la segunda secuencia (similar a TACACT del gen *pan* de *Mycobacterium paratuberculosis*). La identificación de la secuencia -35, TTGGCT (similar a TTGACT, correspondiente a la acetamida sintasa de *M. tuberculosis*) y TTCATA (similar a TTCAAA del gen *bla* de *M. fortuitum*), se realizó de acuerdo de Gómez y Smith (2000). La secuencia de unión al ribosoma es indicada con líneas interrumpidas. Se marcan en rojo, los aminoácidos valina y metionina, este último indicado como el primer aminoácido de la secuencia por el presente trabajo, mientras que valina es el propuesto más tarde, por la anotación de la secuencia del genoma de MPTB K-10.

**Análisis de la secuencia primaria de la proteína.** El programa SignalP 3.0, mostró la presencia de un péptido señal y la localización de los posibles sitios de clivaje de la peptidasa señal. El programa detectó la presencia de un péptido señal con una probabilidad de 1 y un sitio de clivaje entre los residuos 23 y 24 en la secuencia de 210 aminoácidos. El gráfico de hidrofobicidad obtenido con el algoritmo de Kite & Doolite (Figura 44) también indica una secuencia hidrofóbica, compatible con un péptido señal en el extremo amino-terminal de la secuencia estudiada.



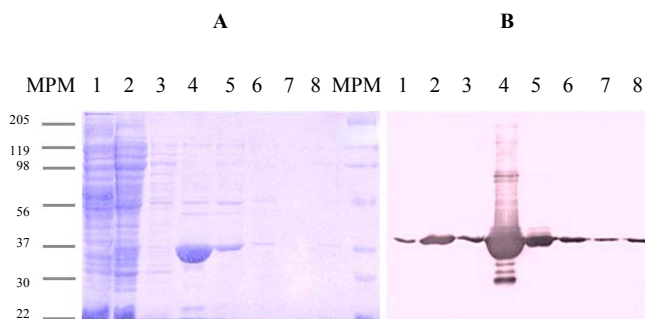
**Figura 44. Perfil de hidrofobicidad de la proteína.** Este gráfico de acuerdo al algoritmo de Kyte & Doolittle muestra el índice de hidrofobicidad en la ordenada y en la abscisa, la posición del aminoácido. Se identifica una región amino-terminal altamente hidrofóbica que abarca los primeros 25 aminoácidos.

**Predicción de regiones transmembrana en la proteína hipotética.** Con el objetivo de identificar las regiones transmembrana que puedan dar información acerca de la topología de la proteína, se buscaron estos dominios empleando las herramientas bioinformáticas disponibles en <http://www.expasy.org>. El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína fue realizada con los programas TMHMM v 2.0 y TMPred. TMPred hace una predicción de regiones que atraviesan la membrana y la posible orientación, basado en las proteínas transmembrana ya descritas. Mientras que el primero de los algoritmos, predice la ausencia de hélices que atraviesen la membrana, mostrando sólo la presencia de un segmento en el N- terminal con una probabilidad de 0,4; el segundo, muestra la posible presencia de una fuerte hélice transmembrana de 21 aminoácidos de longitud, desde el aminoácido 6 al 26. Esta predicción a través de las herramientas bioinformáticas, es compatible con la presencia de una secuencia señal en el extremo N-terminal.

**Búsqueda de dominios conservados y patrones.** La búsqueda de patrones o dominios conservados pueden ser de utilidad para conocer la estructura o función biológica de la proteína. El análisis de la secuencia primaria en las bases de datos mostró que, la secuencia N-terminal se corresponde con el patrón de cis-acilación PS00013 depositado en Prosite (<http://www.au.expasy.org>). Este patrón determina los aminoácidos compatibles en la secuencia

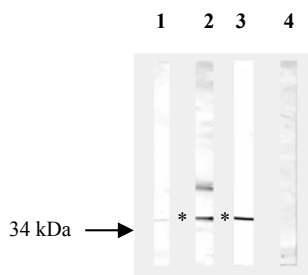
señal para que sea reconocida y procesada por la señal peptidasa II. El patrón de acilación se corresponde con lo detallado a continuación: < [MV] -X- [RK] - {DERK} - [LIVMFWESTAG] - [LIVMFYSTAGCQ]-[AGS] - C >. Asimismo, el análisis bioinformático utilizando la base de datos de familias de proteínas, Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) mostró que la proteína pertenece a la familia de lipoproteínas cuyo representante es el antígeno lipoproteico micobacteriano de 19 kDa (*Mycobacterium 19 kDa lipoprotein antigen*) (código de acceso: PF05481).

**Clonado y expresión del gen.** La secuencia fue clonada en el vector pRSET y expresada en *E. coli* BL21(DE3) pLys. La purificación se realizó en condiciones desnaturizantes, empleando urea 6M, dado que en estas condiciones, se obtuvo un mayor rendimiento de la proteína recombinante. El análisis de las fracciones obtenidas por SDS-PAGE y por tinción con azul de *Coomassie*, mostraron que, si bien la proteína no se purificó a homogeneidad, la fracción de mayor concentración, obtenida por elución con imidazol 50 mM, está enriquecida en la proteína recombinante en un alto porcentaje (Figura 45). Las fracciones que no presentaban esta condición, fueron electroeluidas. Se obtuvo, a partir de un cultivo de 300 mL, un total de 1 mg de proteína recombinante. Las fracciones fueron congeladas a -20 °C hasta su utilización.



**Figura 45 Expresión recombinante y purificación de la proteína.** El vector de clonado pRSET fue empleado para la expresión heteróloga de la proteína en *E. coli* BL21-plys. La proteína recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad. Fueron recolectadas distintas fracciones eluyendo con concentraciones crecientes de imidazol. Las fracciones fueron evaluadas por SDS-PAGE 12% y *Western blot*. **A.** Gel de poliacrilamida teñido con azul de *Coomassie*. **B.** *Western blot* utilizando en anticuerpo monoclonal anti-Histidina 1/5000 (Sigma). Calle 1, control negativo sin IPTG; calle 2, inducción con IPTG 1 mM; calle 3, lavado de la columna; calle 4, imidazol 50 mM; calle 5, imidazol 100 mM; calle 6, imidazol 175 mM; calle 7, imidazol 250 mM; calle 8, imidazol 500 mM. MPM: marcador de peso molecular (Bio-Rad), se indican los tamaños en kDa.

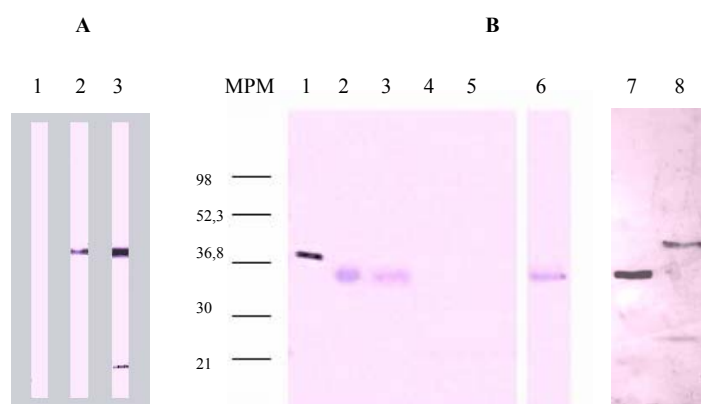
**Reconocimiento de la proteína recombinante por los sueros murinos.** Con el objetivo de confirmar que la secuencia clonada, es reconocida por los sueros murinos utilizados para la evaluación de la genoteca, se analizó por *Western blot* el reconocimiento de la proteína recombinante purificada por estos sueros. Como se muestra en la Figura 46, el *pool* de sueros hiperinmunes reconoció a la proteína recombinante.



**Figura 46. Reconocimiento de la proteína recombinante por los sueros murinos.** Se empleó para el *Western blot*, el mismo suero empleado para el análisis de la genoteca, como segundo anticuerpo se utilizó el monoclonal anti-IgG anti-murino (Sigma). Calle 1, *pool* de sueros pre-inmunes; calle 2, *pool* de sueros hiperinmunes anti-proteínas totales de MPTB; calle 3, anticuerpo monoclonal anti-histidina (Sigma); calle 4, control negativo (sin primer anticuerpo). Se indica con el asterisco “\*”, el reconocimiento de la proteína.

**Detección de la proteína nativa en la bacteria.** Con el objetivo de evaluar la expresión en la micobacteria de la proteína correspondiente al gen seleccionado, se obtuvieron anticuerpos anti-proteína recombinante. Se inmunizaron en ratones BALB/c. Para asegurar la inmunización con la proteína y disminuir interferencias de proteínas de *E. coli* que co-purifican durante la purificación por cromatografía de afinidad, se escindió la proteína recombinante luego de su separación electroforética por SDS-PAGE y tinción por azul de *Coomassie*. La fracción del gel conteniendo la proteína fue disgregada por *Fast-prep* y emulsionada con adyuvante incompleto de Freund para la inmunización de los animales. Los sueros obtenidos, luego de ser evaluado el reconocimiento de la forma recombinante de la proteína, fueron utilizados para el reconocimiento de la proteína en extractos proteicos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* por *Western blot*. Se detectó una proteína de un tamaño aproximado de 34 kDa. El análisis de extractos proteicos de otras micobacterias como *M. smegmatis* y *M. bovis*, no mostraron señal de reconocimiento, indicando la ausencia de homólogos en estas especies (Figura 47). Sin embargo, se observó la detección de una proteína de diferente peso molecular aparente, tanto en *E. coli* K-12 como en *M. phlei*. Dado que, por análisis *in silico* en la base de datos, la secuencia está ausente en el genoma de *E. coli* y, por otro lado, la evidencia experimental de los resultados obtenidos por *Southern blot*, mostró la ausencia del gen en el genoma de *M. phlei*, el reconocimiento de estas proteínas puede atribuirse a la reacción cruzada

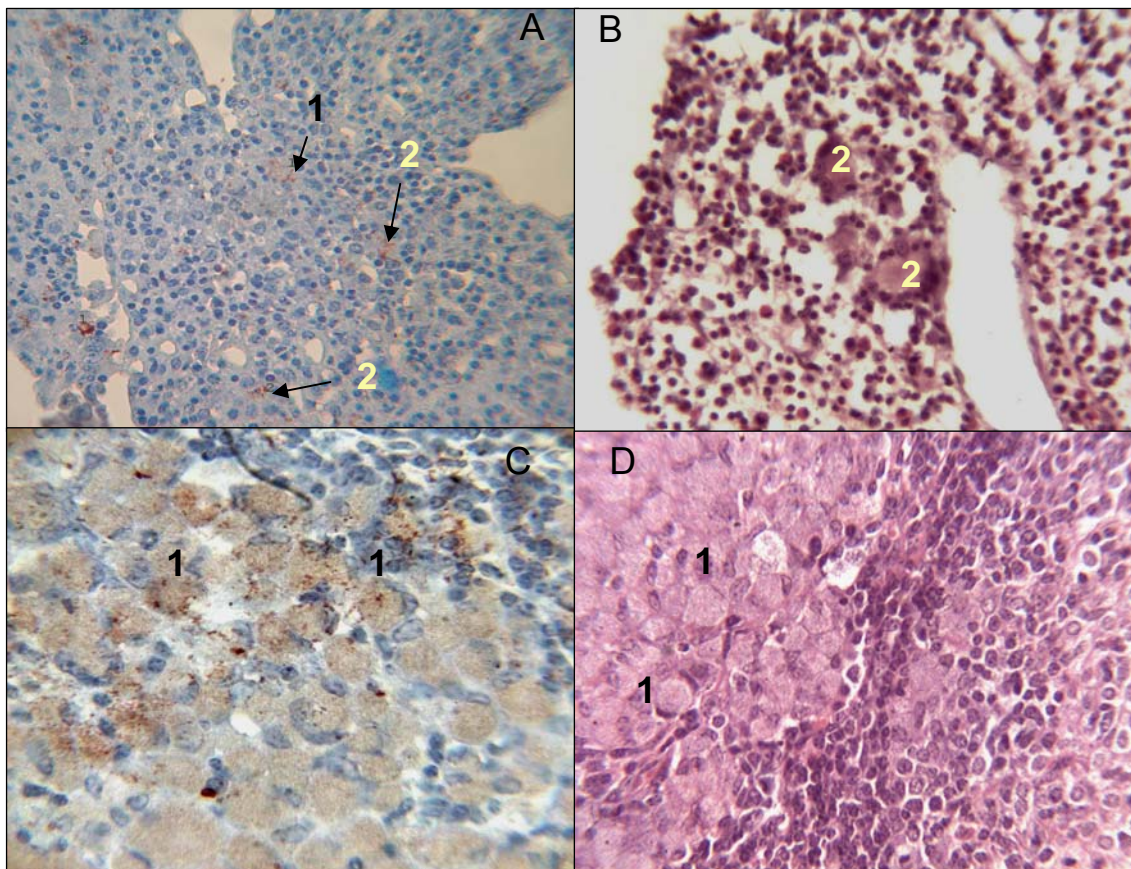
con epítopes conservados presentes en otras proteínas. Como consecuencia a su tamaño aparente en MPTB y a la secuencia consenso de lipidación, se denominó a esta proteína Lpp34.



**Figura 47. Obtención de anticuerpos anti-Lpp34 en ratones e Inmunolocalización de la proteína nativa en MPTB.** A. Ratones BALB/c, fueron inmunizados (n=4) con la proteína recombinante y los sueros fueron evaluados por *Western blot* a t=0 (pre-inmune), calle 1; t<sub>1</sub>=15 días post-inoculación (pi), calle 2; y t<sub>2</sub>=20días pi, calle 3. Los sueros hiperinmunes, fueron usados para reconocer la proteína por *immunoblotting* en una dilución 1/50, como anticuerpo de detección se utilizó el monoclonal anti-IgG murino (Sigma), diluido 1/3000. B. Se emplearon extractos de proteínas de distintas bacterias. Calle 1, extracto de *E. coli* K12; calle 2, extracto de MPTB, calles 3, 6 y 7, proteína recombinante; calle 4, extracto de *M. bovis*; calle 5, extracto de *M. smegmatis*; calle 8, extracto de *M. phlei*; calle 6, control positivo, proteína recombinante detectada con el anticuerpo monoclonal anti-histidina (1/5.000). MPM: marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños de algunas proteínas del marcador, en kDa.

**Inmunohistoquímica.** Los mismos sueros hiperinmunes anti-Lpp34 recombinante, fueron utilizados para detectar a la bacteria en el tejido de animales con paratuberculosis. Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejidos de dos animales con sintomatología compatible con la enfermedad. Estos animales presentaron serología positiva a la prueba ELISA-PPA, y se obtuvo el aislamiento de la bacteria a partir del cultivo de materia fecal. Se procesaron las muestras de tejidos, provenientes de intestino y de ganglio íleocecal, para el análisis histológico. También fueron procesados cortes de los mismos tejidos de dos animales sanos, como control. Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Patobiología de INTA-Castelar por el Med. Vet. Fernando Delgado. Se empleó la técnica de tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de rutina para visualizar las características del tejido y se constató en los animales paratuberculosos, la presencia de abundante cantidad de células gigantes, células epitelioides y macrófagos. Se aplicó el protocolo de inmunohistoquímica (IHQ), empleando el anticuerpo anti-Lpp34 y el anticuerpo anti-MPTB (dirigido a las proteínas totales de la bacteria), como control positivo, y que es utilizado para el análisis de rutina. Se empleó en cortes derivados del mismo tejido, el suero pre-inmune de los ratones inmunizados con Lpp34. El anticuerpo anti-Lpp34 permitió observar señal positiva, en los mismos tejidos de animales con PTB que el anticuerpo de referencia (estos anticuerpos marcaron,

por IHQ solamente los tejidos de animales infectados con la bacteria). Aunque, utilizado en la misma dilución que este, la señal resultó menos intensa. El suero pre-inmune no mostró señal en estas muestras. Se observó marcación en células gigantes, células epitelioides y macrófagos (Figura 48). Estos ensayos con el suero anti-Lpp34, permitieron la detección de la bacteria en el hospedador bovino.



**Figura 48. Inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos dirigidos a la proteína Lpp34.**

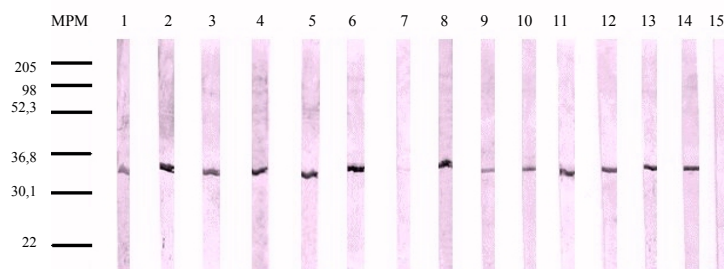
Corte transversal de ileon: **A.** IHQ anti- Lpp 34. (100X) **B.** H&E, 200X. Corte transversal de ganglio ileocecal: **C.** IHQ anti-Lpp34 (400X). **D.** H&E (400X). Se observa inmunomarcación en células gigantes (2), epitelioides (1) y macrófagos. La técnica de hematoxilina-eosina, se realizó con el protocolo convencional, descrito en Materiales y Métodos. Para la IHQ, se incubó con el anticuerpo murino anti-Lpp34 (1/50), 16 h a 4°C. Se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG anti-ratón/anti-conejo (Dako) biotinilado, 20 min a T ambiente. Para revelar la interacción, se incubó con streptavidina conjugada a peroxidasa y luego con el sustrato cromógeno (Dako).

**Fraccionamiento sub-celular y ensayo de partición de fases en Tritón X-114.** Para evaluar la hipótesis que la proteína tiene una localización en la membrana, se procedió a realizar un fraccionamiento sub-celular de MPTB por centrifugación y ultra-centrifugación. Asimismo, para determinar la naturaleza de la interacción con la membrana, se realizó un ensayo de partición en fases con el detergente Tritón X-114, utilizando la fracción de membranas de la bacteria, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. De esta manera, las proteínas de membrana y aquellas que interaccionen fuertemente con ella, quedarán separadas de las hidrofílicas, por su capacidad de interaccionar con el detergente no iónico. Las fracciones (fase acuosa y fase de detergente) obtenidas luego del particionamiento de fases, fueron tratadas con acetona fría para precipitar y concentrar las proteínas, tal como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente, se evaluó por *Western blot*, empleando el suero policlonal contra la proteína recombinante. Como muestra la Figura 49, la proteína se localizó en las fracciones enriquecidas en membrana y pared celular. Esta evidencia junto al resultado de la ausencia de proteína en el sobrenadante, parecería indicar que es una proteína que se localiza en membrana. Por otro lado, el ensayo de partición mostró que la proteína quedó retenida principalmente en la fase del detergente, demostrándose que existe una interacción fuerte con la membrana, característico de las proteínas transmembrana o lipoproteínas.



**Figura 49. Fraccionamiento subcelular y particionamiento de fases en Tritón X-114.** La fracción de membranas obtenida por fraccionamiento subcelular fue sometida a un ensayo de particionamiento en fases con el detergente no iónico Tritón X-114, las fases acuosa y de detergente fueron tratadas con acetona para precipitar las proteínas. Se realizó un *Western blot* con las fracciones, empleando el suero policlonal anti-Lpp34 murino (1/50). Calle 1, proteínas del SN de cultivo obtenidas por precipitación con TCA 10 %; calle 2, extracto celular total, sometido al fraccionamiento subcelular; calle 3, pared y restos celulares (*pellet* de 20.000xg); calle 4, fracción de membranas (*pellet* de 100.000xg); calle 5, fracción citosólica (SN de 100.000xg); calle 6, fracción de proteínas retenidas en el detergente Tritón- X114; calle 7, proteínas retenidas en la fase acuosa del particionamiento de fases. MPM, marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

**Análisis de la respuesta humoral de los bovinos contra la proteína.** Para evaluar la respuesta humoral de contra Lpp34, se estudiaron por *Western blot* los sueros de bovinos infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y en distintos estadios de la enfermedad. Adicionalmente se evaluaron sueros de animales provenientes de rodeos negativos (sin historia de paratuberculosis) con resultado de ELISA negativo y sin aislamiento de MPTB, por cultivo de materia fecal. Debido a que se emplearon sueros de bovinos de distinta procedencia, estos tenían un diagnóstico serológico realizado por distintas pruebas. Se analizaron sueros provenientes de Bélgica (n=40), estos sueros fueron evaluados por el ELISA comercial Pourquier, y por un segundo enzimo-immuno-ensayo que emplea el antígeno LAM. Todos estos sueros, tenían resultado de serología negativo y provenían de establecimientos libres de la enfermedad. El resto de las muestras, provinieron de la EEA-INTA Balcarce. Los sueros de los animales de nuestro país fueron evaluados por el ELISA-PPA (INTA-Balcarce). La Figura 50, muestra un ensayo de un grupo de animales con paratuberculosis y un grupo control. Los resultados del análisis por *immunoblot* de un total de 107 animales evaluados, se muestran en la Tabla 10. Como puede observarse, existe un amplio reconocimiento de la proteína en todos los grupos de animales estudiados. Sólo un bajo número de animales negativos, no presentó respuesta al ser evaluados por esta metodología.



**Figura 50. Reconocimiento de sueros bovinos a la proteína recombinante.** Se separó por SDS-PAGE preparativo, 25 µg de la proteína recombinante, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se cortó en tiras para incubar con distintos sueros bovinos, diluidos 1/100. Se utilizó como anticuerpo secundario el monoclonal anti-IgG bovino (Sigma) en una dilución 1/3000. Calles 1 a 7, animales de rodeos negativos; calles 8 a 13, animales con paratuberculosis confirmada por aislamiento de la bacteria en materia fecal; calle 14, control positivo del *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal anti-histidina, en una dilución 1/5.000 (Sigma); calle 15, control negativo, se realizó el mismo protocolo pero no se incubó con el primer anticuerpo. MPM. Marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

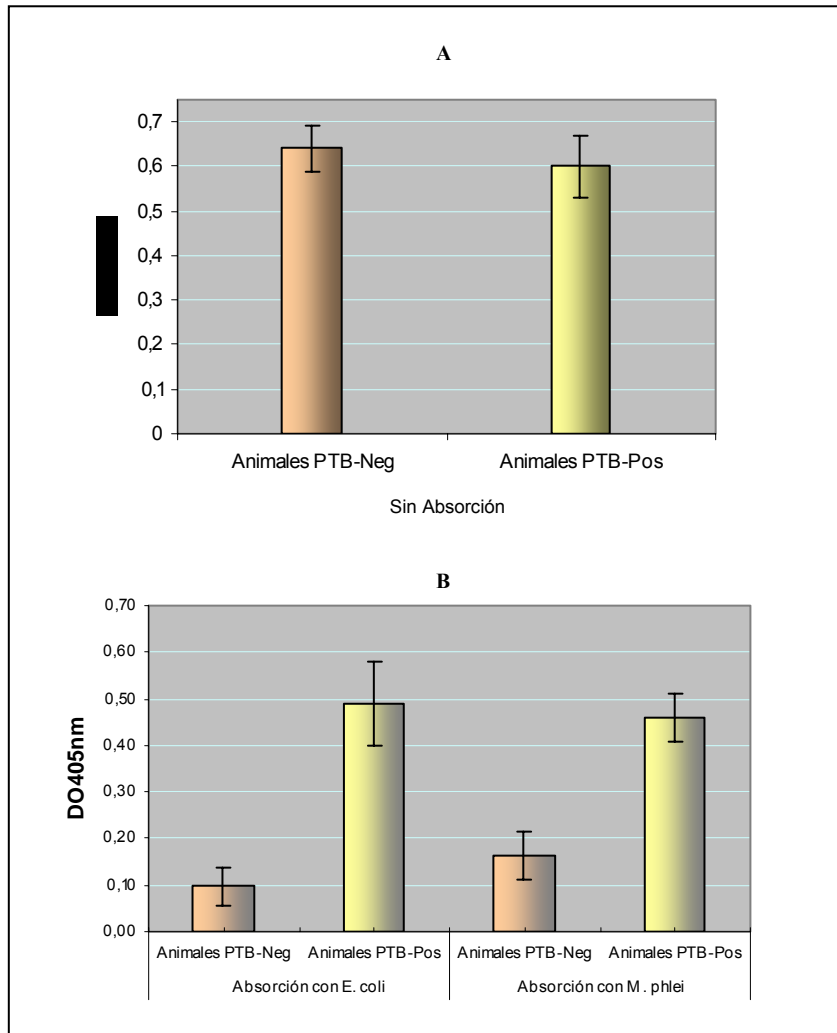
	Animales ELISA +		Animales ELISA -	
	Cultivo +	Cultivo s/r	Cultivo +	Cultivo -
<i>W. blot</i> +	23	14	2	65
<i>W. blot</i> -	0	0	0	3
<b>Total</b>	23	14	2	68

**Tabla 10. Evaluación por *Western blot* del reconocimiento de la proteína recombinante.**  
S/R: sin reporte del resultado del cultivo.



Estos resultados, mostraron una respuesta inespecífica alta. Como se pudo observar en el ensayo de la Figura 47, se detectó la presencia de proteínas en *E. coli* y *M. phlei* que reaccionan en forma cruzada con Lpp34. La presencia de un epítipo fuertemente reactivo conservado en distintas especies, probablemente pueda explicar estos resultados.

Con el objetivo de cuantificar posibles diferencias en el reconocimiento de Lpp34 por parte de los animales paratuberculosos y sanos, no observables por la técnica de *Western blot*, se evaluó un grupo de sueros (n=20) por la prueba de ELISA. Se sensibilizaron placas con 0,5 µg de proteína recombinante por cada pocillo y se evaluaron los sueros diluídos 1/400, pre-adsorbiendo toda la noche con un extracto de *E. coli* o un liofilizado de *M. phlei*. Se analizaron sueros de animales provenientes de rodeos infectados con PTB y con serología positiva, algunos de ellos con diagnóstico confirmado aislamiento de la micobacteria y animales provenientes de rodeos no infectados, con serología negativa. La Figura 51, muestra las lecturas promedio de los grupos obtenidas luego de 15 min de revelado. Se pudieron observar diferencias significativas entre los animales PTB positivos y PTB negativos. La pre-adsorción con *E. coli* pone aún más en evidencia la presencia de epítopos diferenciales en la proteína reconocidos por los animales paratuberculosos.



**Figura 51. Evaluación de sueros bovinos por la técnica de ELISA-Lpp34.** Se evaluó el reconocimiento de la proteína Lpp34 recombinante por parte de los sueros bovinos infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, y positivos a la prueba de ELISA-PPA (Allied-Monitor). Se utilizaron como control, animales negativos a dicha prueba y provenientes de establecimientos libres de la enfermedad. **A** .Se evaluaron los sueros de los animales (1/200) sin absorber. **B**. Se evaluaron los sueros bovinos preabsorbidos con un extracto de *E. coli* BL21, obtenido por sonicación de las bacterias provenientes de un cultivo de 500 mL y cosechadas en fase exponencial, o preabsorbidos con un liofilizado de *M. phlei*, tal cual se utiliza para el diagnóstico serológico de PTB, empleando el antígeno de referencia PPA (Allied); (Paolicchi *et al.*, 2003).

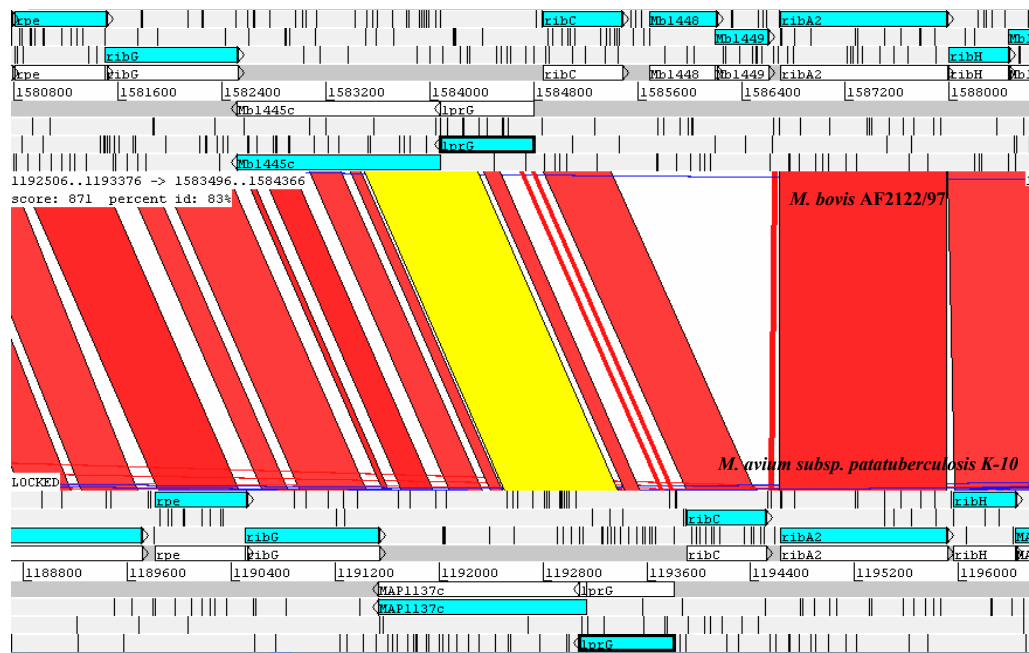
## **4.2. Evaluación de la presencia de proteínas ortólogas: Búsqueda de secuencias antigénicas del complejo *M. tuberculosis*.**

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 (Li *et al.*, 2005), permitió la búsqueda y la posterior caracterización de secuencias que codifican para antígenos descritos con anterioridad en otras especies.

### **4.2.1. Estudio del antígeno P27 (LprG) en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.**

Esta proteína fue estudiada previamente en nuestro laboratorio y se demostró su antigenicidad en animales infectados con *M. bovis* (Bigi *et al.*, 1997). Está codificada por el gen *lprG* (711p) y debido a su tamaño aparente, se denominó P27 en *M. bovis*. El gen *lprG* (*Mb1446c*) presenta una identidad del 100 % con el gen *Rv1411c* de *M. tuberculosis*. Este gen, se encuentra presente en el genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y está anotado como *MAP1138c*. El análisis de alineamiento local de secuencias (BLAST) entre LprG-*M.bovis* y el homólogo de MPTB, mostró una identidad del 83 % a nivel de secuencia nucleotídica y del 68 % a nivel de secuencia aminoacídica.

**Análisis comparativo de las regiones genómicas de *M. bovis* AF2122/97 y MPTB K-10, correspondientes al gen *lprG*.** Para realizar un análisis comparativo del entorno genético del gen en MPTB K-10, con el genoma de *M. bovis* AF2122/97, se utilizó el programa ACT. Se pudo constatar que la región genómica que contiene al gen se encuentra conservada en ambas especies micobacterianas (Figura 52). El gen vecino hacia el extremo 3' del gen *lprG*, *Mb1445* en *M. bovis*, codifica para una proteína de membrana, caracterizada en *M. tuberculosis* y denominada P55. En MPTB, se encuentra un homólogo, *MAP1137c*. Esta proteína está relacionada al transporte y pertenece al agrupamiento COG0477 (Transporte de carbohidratos y metabolismo, superfamilia de permeasas). Existe en la región de los dos genomas, una cantidad importante de genes relacionados al metabolismo de riboflavina, *ribC*, *ribA<sub>2</sub>* y *ribH*, río arriba de *lprG* y *ribG*, río abajo. Entre los genes *ribA<sub>2</sub>* y *ribC* del genoma de *M. bovis*, se encuentran dos genes (*Mb1448c* y *Mb1449c*) que codifican para proteínas hipotéticas. Estos últimos genes, están ausentes en MPTB.

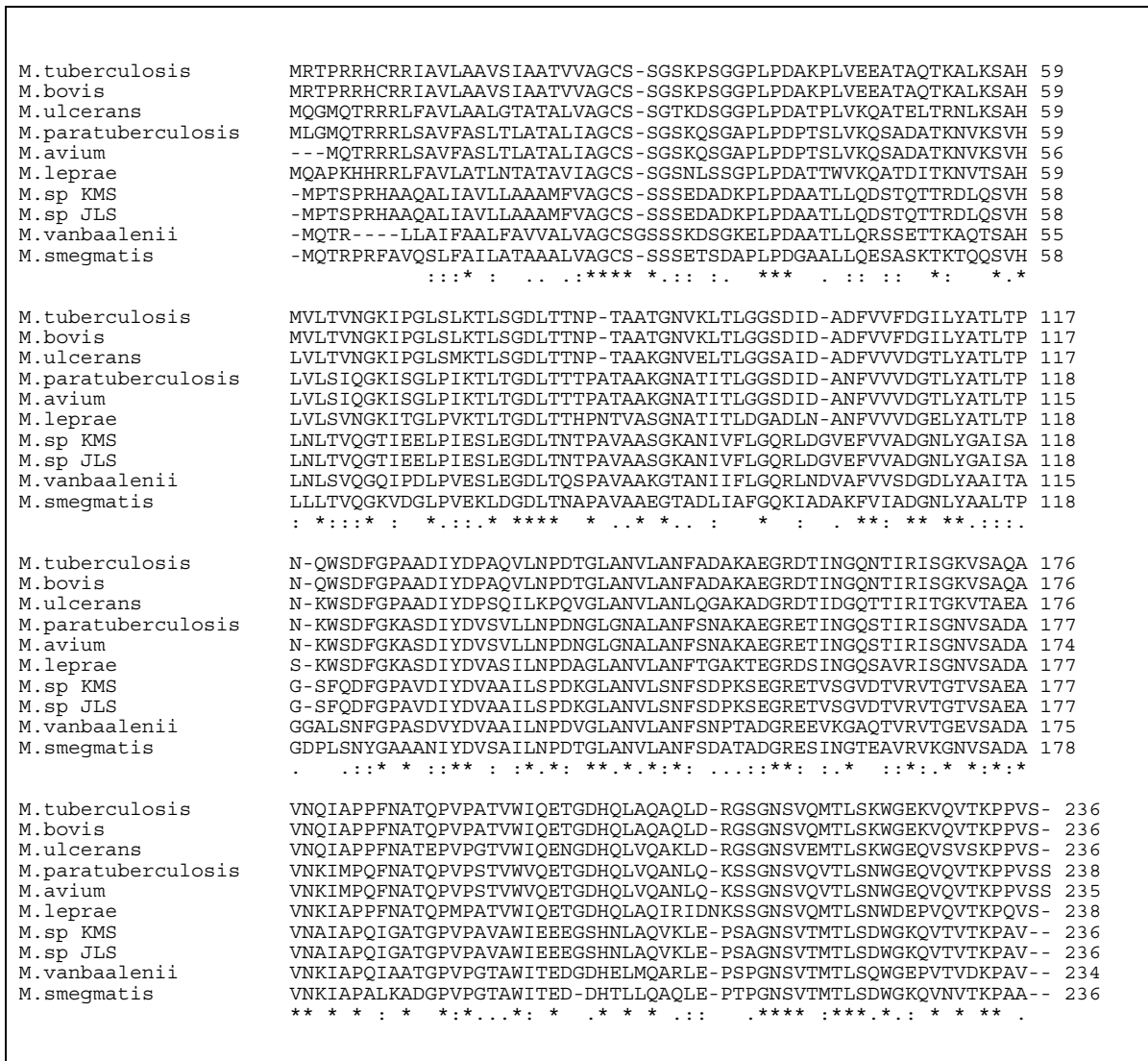


**Figura 52.** Análisis comparativo de la region genómica que contiene el gen *lprG* en *M. bovis* AF2122/97 y *M. avium subsp. paratuberculosis* K-10. El programa muestra una vista comparativa de los genomas basados en homología. En la parte superior del visor se encuentra la secuencia genómica de *M. bovis*, en la parte inferior, el genoma de MPTB. Las regiones homólogas se muestran en rojo y en amarillo (en este color, se resalta la secuencia de estudio, *lprG*).

**Análisis de la secuencia primaria.** El peso molecular estimado en base a la secuencia de 238 aminoácidos de la proteína de MPTB, es de 24, 7 kDa, aproximado al de LprG de *M. tuberculosis* (24,5 kDa). Con el objetivo de evaluar la presencia de homólogos y analizar la similitud entre ellos, se realizaron búsquedas por BLAST y se obtuvieron las secuencias de los posibles ortólogos de los genomas micobacterianos disponibles en la base de datos del NCBI. Se realizaron análisis de alineamiento global de secuencias con el programa CLUSTAL W (1.83). Se analizó la identidad global entre las proteínas de las micobacterias descritas anteriormente. Se adicionó al análisis la secuencia identificada por BLAST en el genoma de *Nocardia farcinica* IFM 10152 (código de acceso, AP006618). *Nocardiaceae* y *Mycobacteriaceae* son familias que pertenecen al mismo orden *Actinomycetales*. Distintas especies del género *Nocardia* junto con las bacterias de la familia *Streptomicetaceae* han sido recuperadas del ambiente. La Figura 53 muestra el alineamiento entre las secuencias micobacterianas. Dado que la secuencia de *Nocardia farcinica* tiene una baja identidad, sólo se la incluyó para evaluar el porcentaje de homología que se muestra en la matriz de similitud. Del alineamiento múltiple de secuencias entre las distintas especies micobacterianas se pudo observar que la secuencia amino terminal presenta mayor variabilidad que el resto de la proteína (Figura ). Dado que la paratuberculosis y la tuberculosis bovina son enfermedades relevantes en el ámbito veterinario y son infecciones que pueden coexistir, se evaluó la identidad en

la secuencia completa entre los homólogos de las especies MPTB y *M. bovis*. Al igual que el alineamiento entre todos los homólogos micobacterianos, este alineamiento global de secuencias mostró claramente que la región N-terminal es la zona más variable (Figura 54).

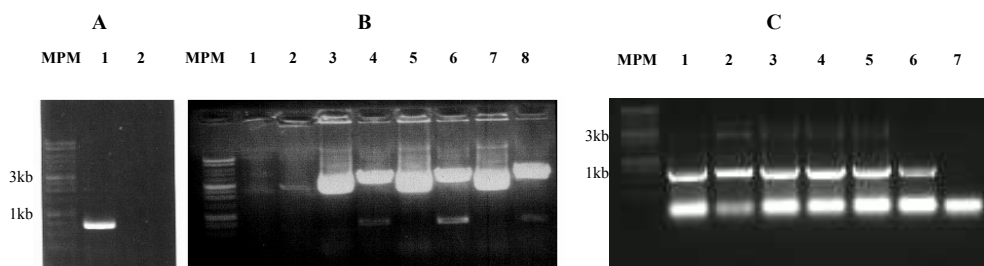
La matriz de similitud entre las secuencias muestra que, el homólogo de MPTB presenta una identidad menor al 50 % con las especies no patógenas (Tabla 11). Esta identidad es mayor con los homólogos presentes en las especies patógenas, teniendo un mayor porcentaje de similitud con la secuencia de *M. ulcerans* (78 %). La identidad global con el homólogo del complejo *M. tuberculosis* es del 66 %. La proteína codificada por el genoma de *Nocardia farcinica* tiene el menor porcentaje de similitud con el homólogo de MPTB (36 %). En cuanto a la longitud de la secuencia primaria, esta varía entre 234 y 238 aminoácidos. La secuencia perteneciente al género *Nocardia*, nuevamente fue la que presentó mayor diferencia, con 268 aminoácidos.



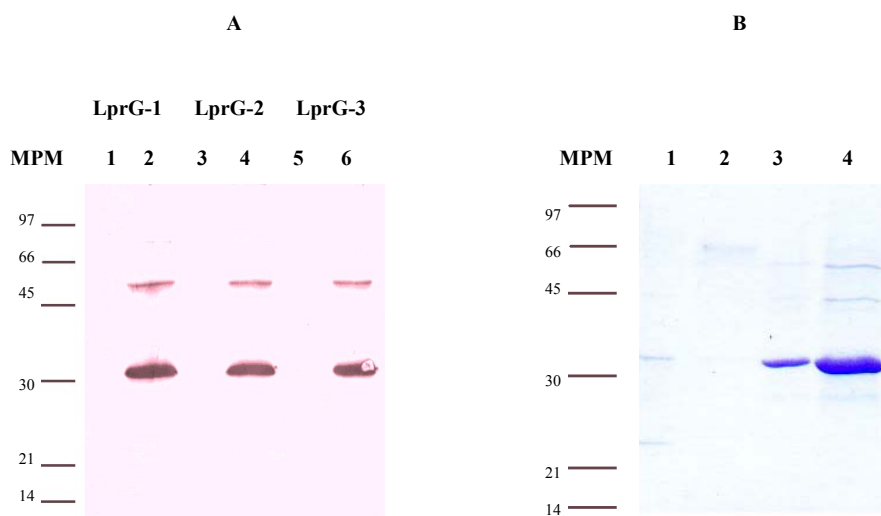
**Figura 53. Alineamiento múltiple de secuencias *LprG*.** La figura muestra el alineamiento de secuencias de la proteína codificada por *lprG* en las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*, *M. smegmatis*, las subespecies *avium* y *paratuberculosis* del complejo *M. avium* y las cepas micobacterianas KMS y JLS de especie aún no determinada. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NCBI y se alinearon con el programa ClustalW. El asterisco "\*", indica que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los dos puntos ":", indican una sustitución conservada; y el punto ".", indica una sustitución semiconservada en esa posición.



mediante el ensayo colorimétrico BCA (Pierce). La concentración de esta fracción fue de 400  $\mu\text{g/mL}$ . Se fraccionó y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.



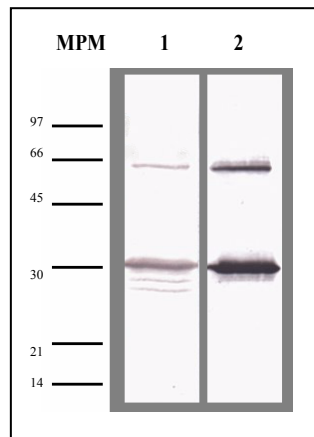
**Figura 55. Amplificación y clonado del gen *lprG*.** A. Se amplificó por PCR el gen, utilizando como templado el ADN de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Calle 1, ADN de MPTB; calle 2, control negativo de la PCR. B. El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T (Promega). El inserto liberó por digestión con las enzimas *Bam*HI-*Kpn*I por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se muestran las reacciones de digestión utilizando ADNp de 4 clones seleccionados. Los clones 2, 3 y 4 liberan el inserto de tamaño esperado. Calles 1, 3, 5 y 7, ADNp sin digerir; calles 2, 4, 6 y 8, ADNp digerido. C. Se evaluó la eficiencia de la reacción de ligación al vector pRSET por amplificación del gen *lprG*. Se muestra el análisis de los clones recombinantes por PCR. Calles 1 a 5, ADNp de los distintos clones; calle 6, ADN de MPTB; calle 7, control negativo de PCR. MPM: 1kb (Promega), se indica en la figura, los tamaños de fragmentos representativos.



**Figura 56. Evaluación de la expresión y purificación de LprG.** A. Luego de la transformación de *E. coli* BI21 con pRSET recombinante, distintos clones, LprG-1, LprG-2 y LprG-3, fueron inducidos con IPTG 1mM a una  $\text{DO}_{600}$  de 0,4. Se evaluó por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-His (1/5.000) la expresión de LprG recombinante. Calles 1, 3 y 5: cultivo sin inducir; calles 2, 4 y 6, cultivo tratado con IPTG 1mM. B. El clon LprG-2 fue seleccionado para la purificación de la proteína recombinante. Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de las distintas fracciones de la elución de la columna con un gradiente de pH, se tiñó el gel con azul de *Coomassie*. Calle 1, Tris-HCl 20 mM pH 6; calle 2, Tris-HCl 20 mM pH 4, calles 3 y 4, Tris-HCl 20 mM pH 2. MPM: marcador de peso molecular (Bio-Rad), se indican los tamaños en kDa.

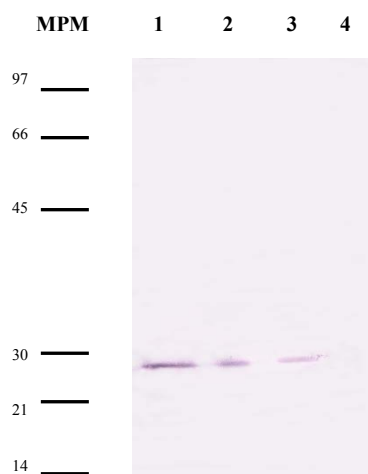


**Evaluación de la reacción cruzada con la proteína ortóloga de *M. bovis*.** Para evaluar la relación antigénica con la proteína homóloga, presente en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, se realizó un ensayo de *Western blot* donde se enfrentó la proteína recombinante LprG de MPTB a un suero hiperinmune anti-LprG de *M. bovis*, obtenido en conejo. La Figura 57, muestra que el suero reconoció a la proteína de MPTB. Se demostró con este ensayo que existe reactividad cruzada entre las proteínas homólogas.



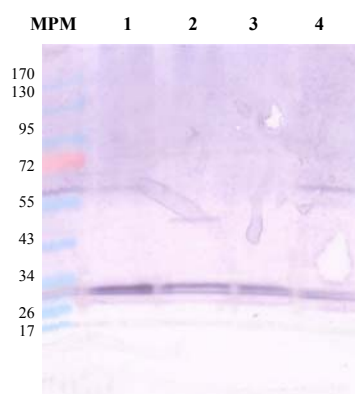
**Figura 52. Reacción cruzada entre los homólogos LprG de MPTB y *M. bovis*.** Se realizó un *Western blot* para evaluar el reconocimiento de la proteína recombinante de MPTB con un suero policlonal anti-LprG de *M. bovis*. Calle 1, LprG de MPTB recombinante (LprG-MPTB) (2 µg) incubada con anti-LprG-*M. bovis*. Se utilizó una dilución 1/100 del suero, como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma), en una dilución 1/3000; calle 2, LprG-MPTB recombinante incubada con el monoclonal anti-His (Sigma), se empleó como anticuerpo secundario un anticuerpo monoclonal anti-IgG-anti murino.

**Localización de la proteína nativa en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Para evaluar la expresión y posible localización del homólogo en MPTB, se utilizó el suero hiperinmune contra LprG de *M. bovis*, producido en conejo. Se realizó un *Western blot* con las proteínas del sobrenadante de cultivo de MPTB, precipitadas con sulfato de amonio, y con las proteínas solubles del extracto celular, obtenidas por lisis utilizando un *Fast-prep*. Para este análisis, también se utilizaron las mismas fracciones proteicas de *M. bovis* AN5. Se pudo observar que la proteína se expresaba en MPTB, con un tamaño aparente de entre 25-30 kDa. Se identificó una señal intensa en el extracto celular de MPTB (Figura 58), sin embargo, también se detectó su presencia en la fracción de proteínas del sobrenadante de cultivo. Contrariamente, en *M. bovis*, la proteína se detectó exclusivamente en el extracto de proteínas celulares.



**Figura 58. Detección de LprG en la bacteria por *Western blot*.** Se detectó la proteína con el suero policlonal anti-Lprg de *M. bovis*. Se evaluaron las fracciones proteicas de extracto celular y de sobrenadante de cultivo. Calle 1, extracto de MPTB; calle 2, sobrenadante de MPTB; calle 3, extracto de *M. bovis*; calle 4, sobrenadante de *M. bovis*. MPM: marcador de peso molecular (Amersham-Biosciences), se indican los tamaños en kDa.

**Reconocimiento de LprG en otras micobacterias.** Para evaluar la expresión de los ortólogos potenciales en *M. smegmatis* y *M. phlei*, y además, conocer la presencia de epítopes compartidos con LprG-MPTB, se obtuvieron sueros hiperinmunes en ratones BALB/c dirigidos a la proteína recombinante de MPTB. Estos sueros, se utilizaron para evaluar por *Western blot* los extractos celulares de las micobacterias. Se pudo detectar el reconocimiento de proteínas de un tamaño aproximado de 30 kDa en todos los extractos proteicos evaluados (Figura 59), esto demuestra la expresión de proteínas con epítopes compartidos en dichas especies. Dado que el gen se encuentra en *M. smegmatis*, se puede afirmar la presencia del ortólogo LprG en esta especie. Como puede observarse en la misma figura, el anticuerpo, dirigido a LprG-MPTB, reconoce a una proteína del tamaño esperado en el extracto celular de *M. bovis*, demostrándose nuevamente la presencia de epítopes compartidos.



**Figura 59. Evaluación de la presencia de homólogos a LprG en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> y *M. phlei*.** Se realizó un *Western blot* empleando sueros hiperinmunes murinos, anti-LprG (MPTB), se empleó una dilución 1/50. Se utilizó como anticuerpo secundario el anticuerpo monoclonal anti-IgG anti-ratón, conjugado a fosfatasa alcalina, empleando una dilución 1/3000. Calle 1, extracto de proteínas celulares de MPTB; calle 2, extracto de proteínas celulares de *M. bovis* AN5; calle 3, extracto de proteínas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; calle 4, extracto de proteínas de *M. phlei*. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños en kDa.

**Evaluación de la respuesta humoral de los animales contra la proteína recombinante.** Se evaluó el reconocimiento de la proteína recombinante purificada, por parte de los sueros de animales con paratuberculosis. Para tal fin, se seleccionaron los sueros de animales eliminadores de la bacteria por materia fecal (animales PTB+). Adicionalmente, se incorporaron como controles, sueros de animales provenientes de establecimientos libres de la enfermedad y que resultaron negativos a las pruebas de aislamiento de la bacteria por materia fecal, como a los ensayos serológicos (animales PTB-). La Figura , muestra que 2/6 animales PTB+, reconocieron a la proteína en el ensayo de *immunoblot*, mientras que ninguno de los sueros negativos reaccionó cuando se lo enfrentó a la proteína.



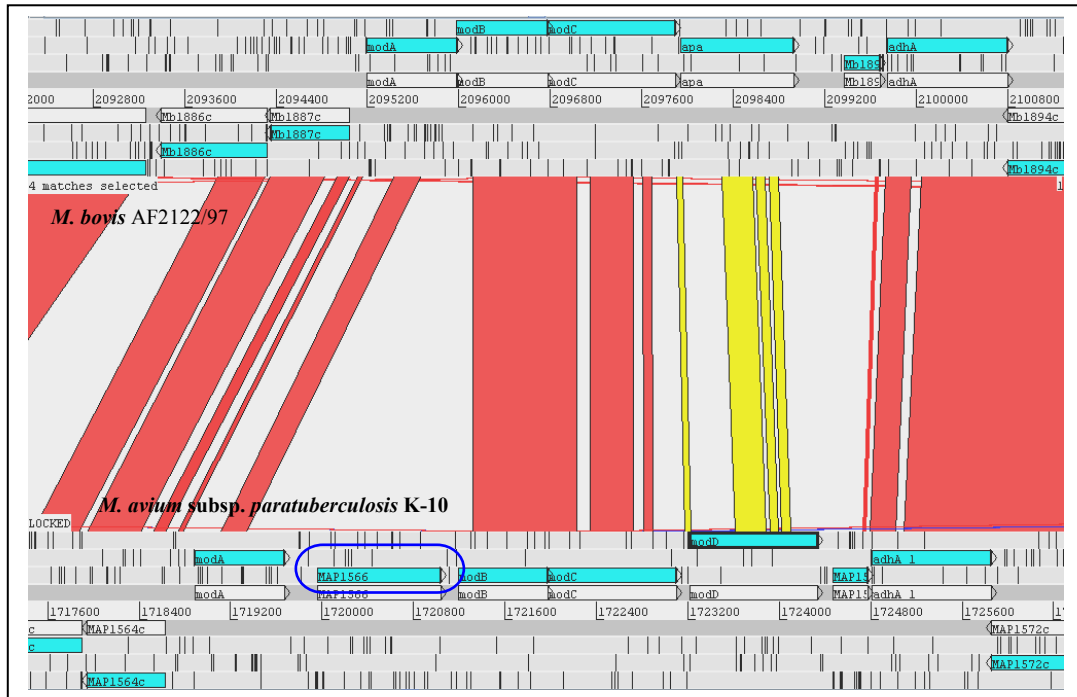
**Figura 60. Reconocimiento de LprG recombinante por los sueros bovinos.** Se emplearon sueros de bovinos infectados por la bacteria y sueros de bovinos provenientes de rodeos libres de la enfermedad. Se separó electroforéticamente la muestra de proteína en un SDS-PAGE 12 % preparativo, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se evaluó por *Western blot* el reconocimiento de la proteína empleando una dilución 1/100 de los sueros bovinos. Calle 1, anti-His; calles 2 a 6, sueros de animales PTB +; calles 7 a 11, sueros de animales PTB -. Se indica con “\*”, la señal positiva en los animales que detectaron la proteína.

#### 4.2.2. Estudio del antígeno de 45/47 kDa en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Esta proteína fue descrita inicialmente en las especies del complejo *M. tuberculosis* y en *M. leprae* (Wieles *et al.*, 1994; Espitia *et al.*, 1995). Si bien se describió la presencia de esta proteína en *M. avium* subsp. *avium* (Secott *et al.*, 2001), la caracterización de este homólogo en MPTB no es completa, como así tampoco fue evaluada su capacidad antigénica y utilidad diagnóstica en la enfermedad de Johne.

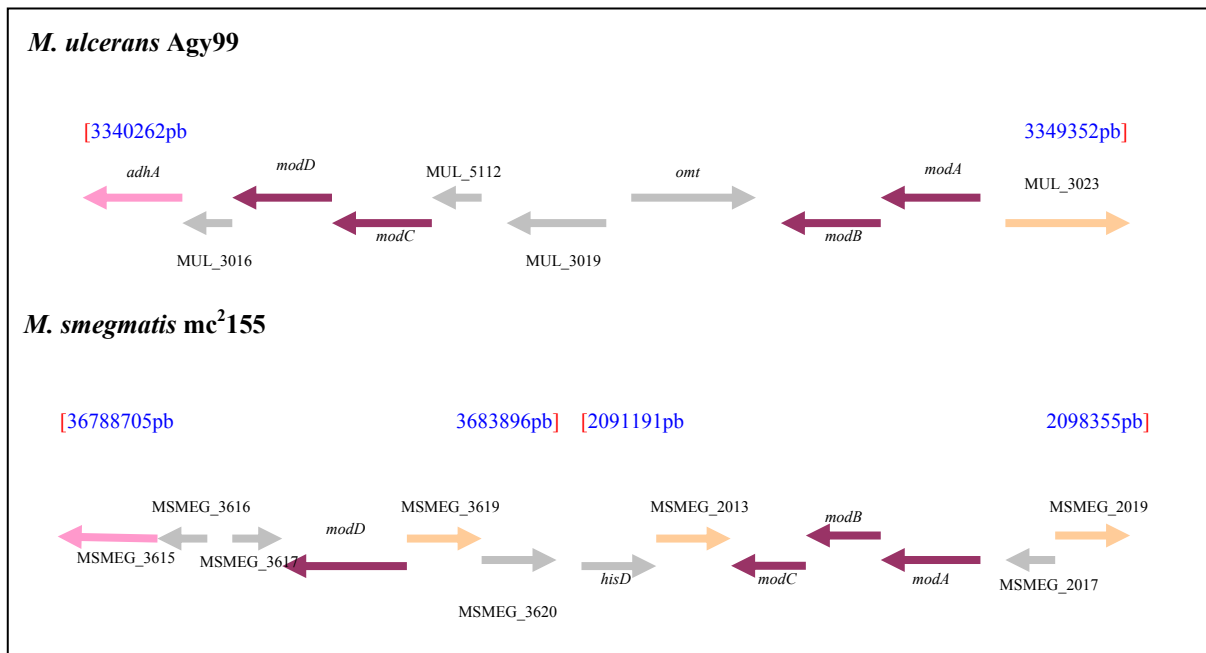
**Análisis del gen que codifica para el antígeno 45/47 kDa en MPTB.** Se corroboró la presencia de un gen que tiene 1107 pb, anotado como *modD* y corresponde al marco de lectura *MAP1569* en el genoma de la bacteria. Por análisis de alineamiento local de secuencias (BLAST), se observó que la secuencia contenida entre los nucleótidos 403 y 668, tiene un porcentaje de identidad de 81 % con el gen Rv1860 de *M. tuberculosis* H37Rv y 82 % con el gen Mb1891 de *M. bovis* AF2122/97. Estos genes, codifican para el antígeno de 45/47 kDa en estas bacterias, y son denominados de acuerdo al producto que codifican, *apa* o *modD*, indistintamente.

**Análisis comparativo de las regiones genómicas de *M. bovis* AF2122/97 y MPTB K-10, correspondientes al gen *modD*.** Para realizar un análisis comparativo del entorno genético del gen *modD* en MPTB K-10, con el genoma de *M. bovis* AF2122/97, se utilizó el programa ACT. La Figura 531, muestra el alineamiento de la región de interés entre los dos genomas.



**Figura 53.** Análisis comparativo de la region genómica que contiene los genes *modABCD* en *M. bovis* AF2122/97 y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* K-10. El programa muestra una vista comparativa de los genomas basados en homología. En la parte superior del visor, se encuentra la secuencia de *M. bovis*, en la parte inferior, el genoma de MPTB. Las regiones homólogas se muestran como líneas rojas. Los genes *mod* se encuentran presentes en las dos especies. En amarillo, se muestra la secuencia de *modD*. Río abajo del gen *modA* de MPTB, existe un gen hipotético, *MAP1566* (marcado en azul), que está ausente en *M. bovis*. Se señala con amarillo la homología presente en el gen *modD* entre los dos genomas.

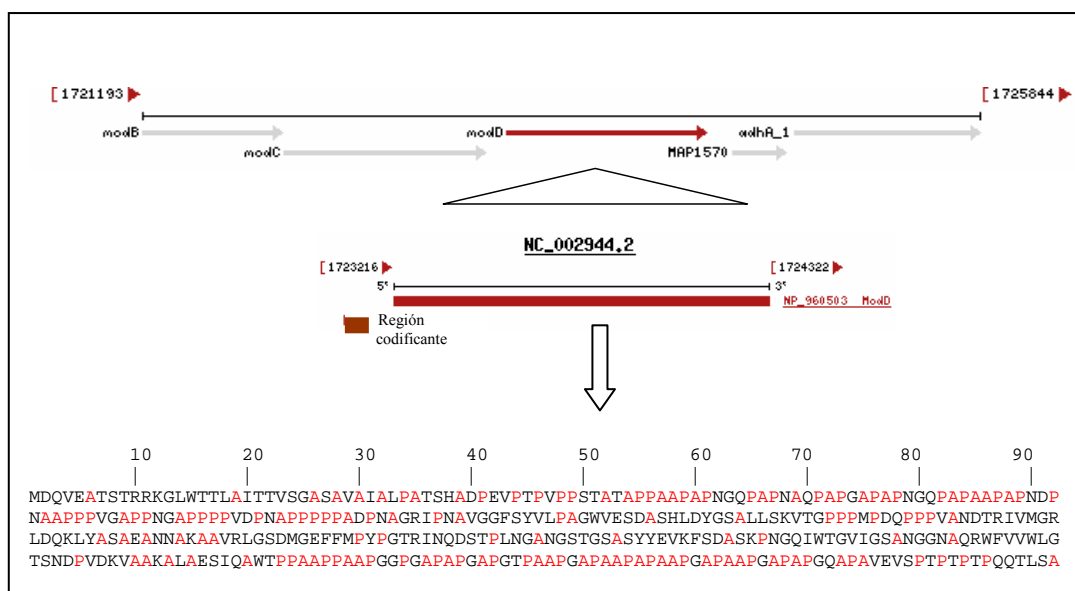
Se observó que, en *M. bovis* el gen *modD* se encuentra río abajo de los genes *modA*, *modB*, *modC*. Estos genes están relacionados con la captación del molibdeno y constituirían, junto a *modD* un operón en *M. bovis*. Río abajo de *modD*, se encuentran, un gen hipotético y el gen *adhA*, que codifica para la subunidad A de la enzima alcohol deshidrogenasa. En MPTB, el gen *modD* tiene la misma posición relativa que en *M. bovis*. Asimismo, en esta bacteria, existe un gen no caracterizado (*MAP1566*), entre las secuencias de los genes *modA* y *modB*. Por lo tanto, existe una organización distinta de los genes *modABCD* en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Esto mismo se observó en otras micobacterias como *M. ulcerans*, y *M. smegmatis*. En estas últimas bacterias, los genes *modA* y *modB* se encuentran en regiones genómicas distantes del resto de los genes del operón (Figura 54).



**Figura 54. Región genómica de los genes *mod* en *M. ulcerans* Agy99 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.** Se muestra esquemáticamente el ordenamiento de los genes en las distintas especies. En púrpura se muestran los genes *mod*, en naranja, los genes que codifican para las deshidrogenadas de la familia PF00106 *short-chain*, y en rosa las deshidrogenasas dependientes de Zn, pertenecientes a la familia PF00107. Se muestra dentro de los corchetes y en azul, la localización de las secuencias en el genoma de cada bacteria.

La figura muestra las regiones genómicas conteniendo las secuencias de los genes en *M. ulcerans*. El gen *adhA* (MUL\_3015) codifica para una alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc, de 342 aminoácidos, el producto de este gen, presenta una identidad superior al 70 % con las proteínas presentes en otras especies como *M. leprae* (ML\_2053) *M. bovis* (Mb1893), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP1571) y con la proteína de 337 aminoácidos codificada por el gen MSMEG\_3615 del genoma de *M. smegmatis*. Estas deshidrogenadas pertenecen a la familia PF00107, y son responsables de la oxidación de etanol a acetaldehído. Es notoria la presencia en esta región de otras deshidrogenadas, codificadas por MSMEG\_2019, MSMEG\_2013, y MSMEG\_3619 en *M. smegmatis*, por MUL\_3023 en *M. ulcerans* y por *MAP1564c* en *M. avium* subsp. *paratuberculosis* pertenecientes a la familia PF00106. Esta familia, conocida como familia de deshidrogenasas-reductasas *short-chain* (SDR), es una gran familia de enzimas de cerca 250 a 300 aminoácidos. La enzima alcohol-deshidrogenasa de *Drosophila* fue el primer miembro de esta familia caracterizado, en consecuencia, esta familia solía llamarse “alcohol deshidrogenada tipo insecto” o *short-chain*.

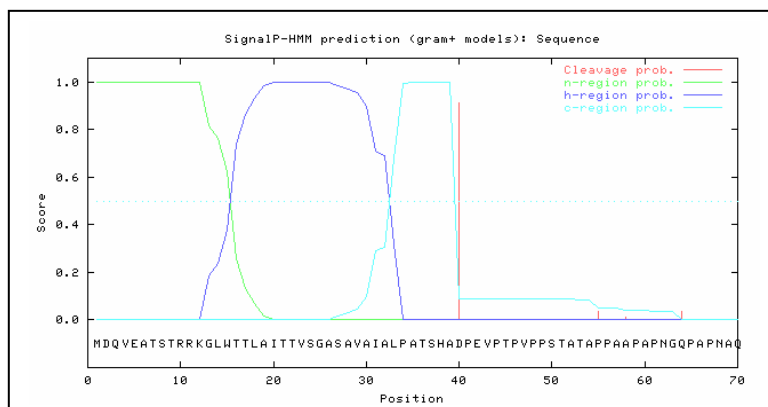
**Caracterización de la secuencia primaria de ModD de MPTB.** El gen *modD* codifica para una proteína de un peso molecular teórico de 36 kDa. La secuencia está caracterizada por un alto contenido de residuos alanina y prolina (A, P), que, en el caso de MPTB, es cercano al 20 % (Figura 55).



**Figura 55. Localización del gen *MAP1569* en el genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y secuencia aminoacídica de la proteína, ModD.** Se muestra la secuencia traducida de 368 aminoácidos y en la parte inferior de la figura, la composición aminoacídica, rica en residuos alanina y prolina (AP), resaltados en color rojo.

La búsqueda de dominios conservados en la secuencia de aminoácidos por SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (Schultz *et al.* 1998), muestran la presencia de un dominio de unión a fibronectina, por lo que la proteína ModD de MPTB pertenece a la familia FAP-P (*Fibronectin-attachment protein*), descrita en Pfam bajo el código de familia de proteínas pfam07174 (Finn *et al.*, 2006) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Esta familia está formada por distintas proteínas de unión a fibronectina (FAP). Sus miembros son ricos en prolina y alanina, tienen, aproximadamente, 300 aminoácidos de longitud y estarían restringidas al género *Mycobacterium*. Por medio de una herramienta bioinformática de búsqueda de motivos en la base de datos Prosite, se identificó el motivo para N-glicosilación (PS00001), con alta probabilidad ( $P: 5,13e^{-03}$ ). Este consenso de N-glicosilación está representado por las secuencias con las siguientes características: (N - {P} - [ST] - {P}). Los sitios potenciales a ser glicosilados en ModD de MPTB, son los aminoácidos N, que presentan los siguientes consensos NDTR y NGST, presentes entre los residuos 176 a 179 y 231 a 234 respectivamente.

El modelo de Hidden Markov de SignalP 3.0, mostró la presencia de una secuencia señal para la exportación de la proteína, vía el camino secretorio general, al igual que la proteína homóloga de *M. tuberculosis* (Figura 56).



**Figura 56. Análisis predictivo de la secuencia señal utilizando el programa SignalP 3.0.** Se muestra en la figura la salida del programa. Las regiones probables n (residuos cargados positivamente), h (residuos hidrofóbicos) y c (residuos cargados negativamente o neutros) presentes en las secuencias señal (con una probabilidad=1) y el sitio de clivaje con una probabilidad de 0,91 entre las posiciones 39 y 40.

Con el objetivo de evaluar la identidad entre los homólogos micobacterianos, se realizó un análisis comparativo a nivel de secuencia primaria. Se analizaron las secuencias aminoacídicas de la proteína estudiada, presentes en las distintas micobacterias, cuyos genomas se encuentran disponibles en la base de datos. La longitud de la secuencia varía en tamaño de 287 (*M. leprae*) a 385 aminoácidos (*M. avium* subsp. *avium*). A partir del análisis del alineamiento global de secuencias por ClustalW, se pudo observar que a lo largo de toda la secuencia, existen escasas regiones conservadas. La mayor homología, estuvo dada entre los organismos pertenecientes al mismo complejo (*M. avium* y MPTB; 98 %; *M. bovis* y *M. tuberculosis*, 99 %). Los alineamientos de secuencias primarias entre las micobacterias de distintos complejos, mostraron una identidad inferior al 70 %. Los valores más bajos de identidad del homólogo de MPTB, se presentaron entre las secuencias proteicas de las bacterias no-patógenas como *M. smegmatis* (49 %), *M. vaanbalenii* (51 %) y con las cepas micobacterianas JLS y KMS (52 %) (Figura 57).



M.tuberculosis	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAMASASLVTVA--VPATANADP-EPAPPVPTT--AASP	54
M.bovis	MHQVDPNLTRRKGRLAALAIAMASASLVTVA--VPATANADP-EPAPPVPTT--AASP	54
M.leprae	MNQVDLDSTHRKGLWAILAIIVVASASAFTMP--LPAAANADP-APLP-----	45
M.PTB	MDQVEATSTRRKGRLWTTLAIITVSGASAVAIA--LPATSHADPEVPTP-----	48
M.avium	MDQVEATSTRRKGRLWTTLAIITVSGASAVAIA--LPATSHADPEVPTP-----	48
M.ulcerans	MHEVDPNKRHRHGLWTTLALAAVSSASVVSIA--LPATASADP-APAP-----	47
M.sp JLS	MDEPDVMSTRRRGLSKTLAIAAVAGATAAALA--MPSVAGAQPPPPPP-----	51
M.sp KMS	MDEPDVMSTRRRGLSKTLAIAAVAGATAAALA--MPSVAGAQPPPPPP-----	51
M.smegmatis	MYESDSMSHRRSGLSKKLTAAVVTGMTAVAVA--LPSVAHADPEPPPPPPGNTFLPAP	57
M.vanbaalenii	MDQPDMAKRRKGLPTSFRRSALTGATAALTAVFTLPAVAYAQPAPPPSPA-----	53
	* : : * * : : : : . : * : : * * * .	
M.tuberculosis	PSTAAAPPAPATPVAPPPP-----AAANTPNAQPGDPNAAP-PPADPNAP	98
M.bovis	PSTAAAPPAPATPVAPPPP-----AAANTPNAQPGDPNAAP-PPADPNAP	98
M.leprae	PSTATAAPSPAQEIITPLP-----GAPVSSEAQPGDPNA--PSLDPNAP	87
M.PTB	PSTATAPPAAPAPNGQPAPNAQPAAPGAPAPN--GQPAAPAAPNDPNAAP-PPVGAPPN	104
M.avium	PSTATAPPAAPAPNGQPAPNAQPAAPGAPAPN--GQPAAPAAPNDPNAAP-PPAGAPPN	104
M.ulcerans	-STTAAPPADPN-----AAPPPADPNAPP-PPV-----	73
M.sp JLS	PAAPAPPPPGPGVPVPPPPA-DPNAAPPAG-----QLPPPPADPNAPP--PADPNAP	102
M.sp KMS	PAAPAPPPPGPGVPVPPPPA-DPNAAPPAG-----QLPPPPADPNAPP--PADPNAP	102
M.smegmatis	PADPNAPAPAPAPAPAPAPALAPAPAGAPAPAPAPADPNAPAPADPNAP	117
M.vanbaalenii	PAVEAPPVPPP-PVDPNAPVPPPPVDPNAP-----VPPPPVDPNAPVPPPPADPNAP	104
	: . . . . . . . * **** .	
M.tuberculosis	-----PPPVIAPNAQP-----VRIDNPVGGFSFALPAGWVESDAAHFDYGS	141
M.bovis	-----PPPVIAPNAQP-----VRIDNPVGGFSFALPAGWVESDAAHLDYGS	141
M.leprae	-----YPLAVDPNAG-----RITNAVGGFSFVLPAGWVESEASHLDYGSV	127
M.PTB	-----GAPPPVDPNAPPPPADPNAGRIPNAVGGFSYVLPAGWVESDASHLDYGS	156
M.avium	GAPPAPPNGAPPVDPNAPPPPADPNAGRIPNAVGGFSYVLPAGWVESDASHLDYGS	164
M.ulcerans	-----VDPNAPEP-----GRVNNAVGGFSVVPAGWVESDASHLDYGS	112
M.sp JLS	P-----PPAPEP-----GRVDNAAGGFSYVVPAGWVESDASHLDYGS	140
M.sp KMS	P-----PPAPEP-----GRVDNAAGGFSYVVPAGWVESDASHLDYGS	140
M.smegmatis	AP-----APAEPPAPEP-----GRVDNAAGGFSYVVPAGWVESDASHLDYGS	161
M.vanbaalenii	V-----PPAPEP-----GRVDNAAGGFSYVVPAGWVESDASHLDYGS	142
	* * * : * . * * * : * * * : : : * . .	
M.tuberculosis	LLSKTTGDPFFPGQPPVANDTRIVLGRDLQKLYASAEATDSKAAARLGSMDGFEFMPYP	201
M.bovis	LLSKTTGDPFFPGQPPVANDTRIVLGRDLQKLYASAEATDSKAAARLGSMDGFEFMPYP	201
M.leprae	LLSKAIEQPPVLGQPTVVATDTRIVLGRDLQKLYASAEADNKAARLGSMDGFEFMPYP	187
M.PTB	LLSKVTGPPMPDQPPVANDTRIVMGRDLQKLYASAEANNAKAAARLGSMDGFEFMPYP	216
M.avium	LLSKVTGPPMPDQPPVANDTRIVMGRDLQKLYASAEANNAKAAARLGSMDGFEFMPYP	224
M.ulcerans	LLSKMTGPPMPGQAPPIANDTRIVLGRDLQKLYASAEATNKAARLGSMDGFEFMPYP	172
M.sp JLS	LLTRIPPEGVTN-----PPNDTSVLLGRDLKLFAGAETDNTKAAANRLASMDGFEFMPFP	195
M.sp KMS	LLTRIPPEGVTN-----PPNDTSVLLGRDLKLFAGAETDNTKAAANRLASMDGFEFMPFP	195
M.smegmatis	LLTKTVAEGAE-----PPNDTSVLLGRDLKLFAGAEPDNNKAARLASMDGFEFMPFP	215
M.vanbaalenii	LLTKLPPGAPPD--AQPPNDTSVLLGRDLKLFAGAENDNTKAAARLASMDGFEFMPFP	200
	** : : . . * * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
M.tuberculosis	GTRINQETVSLD-ANGVSGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--APDAGPPQR	258
M.bovis	GTRINQETVSLD-ANGVSGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--APDAGPPQR	258
M.leprae	GTRINQETIPLH-ANGIAGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--TPDVGPSQR	244
M.PTB	GTRINQDSTPLNGANGSTGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--GNAQR	269
M.avium	GTRINQDSTPLNGANGSTGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--GNAQR	277
M.ulcerans	GTRINQETIPLN-ANGITGSASYEVKFSKPNQIWTGVIKSPAA--TPNEGPPQR	229
M.sp JLS	GTRVNQSTPLD-ANGMPGVASASYEVKFTDNTKPNQIWTGVIKSPAA--GTPRQRTPER	254
M.sp KMS	GTRVNQSTPLD-ANGMPGVASASYEVKFTDNTKPNQIWTGVIKSPAA--GTPRQRTPER	254
M.smegmatis	GTRVNQSTPLD-ANGMPGVASASYEVKFTDNTKPNQIWTGVIKSPAA--GTPRQRTPER	274
M.vanbaalenii	GTRVNQSTPLD-ANGMPGVASASYEVKFTDNTKPNQIWTGVIKSPAA--GTPRQRTPER	256
	** : * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
M.tuberculosis	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIRPLVAPPPAP-----APAPAEP-----	300
M.bovis	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIRPLVAPPPAP-----APAPAEP-----	300
M.leprae	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIRSEMAPIPAS-----VSAP-----	283
M.PTB	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIQAWTPPAAPPAAPGGGAPAPGAP-----GTPAAP	324
M.avium	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIQAWTPPAAPPAAPGGGAPAPGAPAGAPAPGAPAA	337
M.ulcerans	WFVVWLGTANNPVDKGAAKALAESIRPWMPPPAP--AP--APAPGEP-----	272
M.sp JLS	WFVVWLGSATNPVDREAAVTLANSIRPWAPPPPPP-----PPAPGDP-----	296
M.sp KMS	WFVVWLGSATNPVDREAAVTLANSIRPWAPPPPPP-----PPAPGDP-----	296
M.smegmatis	WFVVWLGTANNPIDKAAVALANSIRPWAPPPPPPA-----PADPADP-----	318
M.vanbaalenii	WFVVWLGTANNPIDKAAVALANSIRPWAPPPPPPADPN-APVPADP-----	304
	***** : : * : * * * * * . * . . *	
M.tuberculosis	-----APAPAPAGEVAPTPTPTPTPQRTLPA	325
M.bovis	-----APAPAPAGEVAPTPTPTPTPQRTLPA	325
M.leprae	-----APVG-----	287
M.PTB	G--APAAPAPAAPGAPAPG--APAPGQAPAVEVSPTP-TPTPQQTLSA	368
M.avium	GAPAPAPAPAAPGAPAPGAPAPGQAPAVEVSPTP-TPTPQQTLSA	385
M.ulcerans	-----APQPGAP-EP-----VPAPAPAPAAGVAPTIV-APAPRQPT-	306
M.sp JLS	-----NVPPPPADPNAPPPRPEVGVAVPVAPENVPPEMRPOG	333
M.sp KMS	-----NVPPPPADPNAPPPRPEVGVAVPVAPENVPPEMRPOG	333
M.smegmatis	-----NAAPPPDPNAPPARPVGVVVPVPT--DAPPEMPPA	353
M.vanbaalenii	-----NAPPP--DPNAPAPRPAVGVVVPVPT--DAPPEMPPA	338

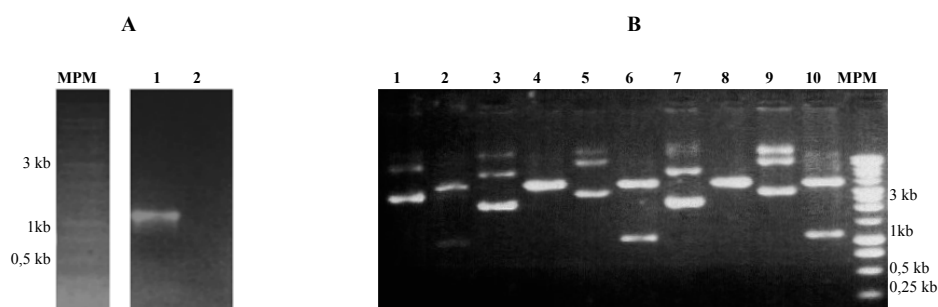
(pie de figura en la página siguiente)

**Figura 57. Alineamiento múltiple de secuencias ModD.** La figura muestra el alineamiento de secuencias de la proteína ModD en las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. vanbaalenii*, *M. smegmatis*, las subespecies *avium* y *paratuberculosis* del complejo *M. avium* y las cepas micobacterianas KMS y JLS de especie aún no determinada. Se alinearon las secuencias obtenidas de las bases de datos del NCBI con el programa ClustalW. El asterisco "\*", indica que, el residuo en esa posición es idéntico en todas las secuencias del alineamiento; los dos puntos ":", indican una sustitución conservada; y el punto ".", indica una sustitución semiconservada en esa posición.

micobacteria	Long. (aa)	Identidad de aa entre secuencias (%)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1- <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	325	100												
2- <i>M. bovis</i> AF2122/97	325	99	100											
3- <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	368	64	64	100										
4- <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> 104	385	66	67	98	100									
5- <i>M. leprae</i> TN	287	69	69	63	63	100								
6- <i>M. ulcerans</i> Agy99	306	70	70	71	71	64	100							
7- <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	353	52	52	49	50	48	56	100						
8- <i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	338	48	49	51	51	45	53	68	100					
9- <i>M. sp</i> KMS	333	50	51	52	53	48	56	73	68	100				
10- <i>M. sp</i> JLS	333	50	51	52	52	49	57	73	68	99	100			

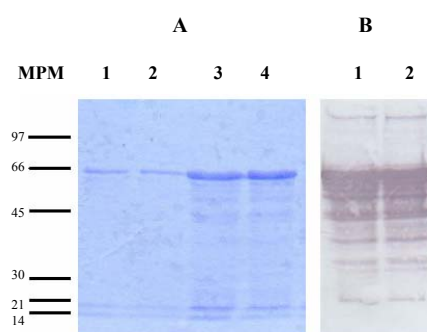
**Tabla 12. Matriz de similitud de secuencias ModD.** La identidad de la secuencia completa entre los homólogos micobacterianos fue calculada utilizando el programa CLUSTAL W (1.83).

**Clonado, expresión y purificación de ModD de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.** Se clonó el marco abierto de lectura completo del gen *MAP1569*. Se realizó un clonado direccional adicionando las secuencias de reconocimiento de las enzimas *KpnI* y *EcoRI*, en los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen por PCR (Figura 58). Luego del clonado se insertó la secuencia en el vector de expresión pRSET-B.



**Figura 58. Clonado del gen *MAP1569*.** A. Amplificación por PCR del gen, utilizando como templado ADN genómico de MPTB. Se muestra el producto de la reacción de PCR del tamaño esperado, visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % y tinción con bromuro de etidio. Calle 1, ADNg de MPTB; calle 2, control negativo. B. Clonado del gen en el vector pCR-Topo (Invitrogen). Se muestra el análisis por digestión utilizando el ADNp de 5 clones seleccionados en medio LB agar-ampicilina adicionado con X-Gal/IPTG. Se muestra la separación por electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de digestión respectivas, utilizando las enzimas *KpnI-EcoRI*. Calles 1, 3, 5, 7 y 9, ADNp sin digerir; calles 2, 4, 6, 8 y 10, ADNp digerido. Posteriormente, se subclonó la secuencia en el vector pRSET. MPM: marcador de peso molecular 1kb (Promega), se indican algunos de los tamaños en la figura.

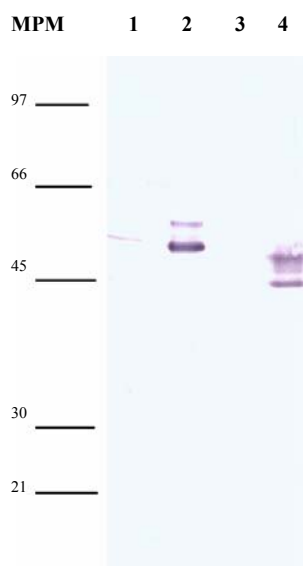
La proteína micobacteriana se expresó en el sistema heterólogo *E. coli* BL21-pRSET. Se obtuvo una proteína de un tamaño aparente de aproximadamente 60 kDa. Este tamaño es mayor al esperado, sin embargo, esto puede ser consecuencia del elevado contenido de prolina en la proteína (Romain *et al.*, 1993; Thole *et al.*, 1990). Adicionalmente, el tamaño de la proteína nativa en el homólogo de *M. tuberculosis* resultó también mayor al deducido por la secuencia de aminoácidos (Laqueyrie *et al.*, 2005). Se purificó el antígeno por columna de afinidad a metales. Se empleó un volumen de cultivo de 500 mL y se obtuvieron 2 mg de proteína recombinante. Pese a utilizar el inhibidor de proteasas PMSF, se observó un patrón de degradación en la proteína recombinante purificada (Figura ), demostrando que la proteína es poco estable, bajo las condiciones de extracción establecidas.



**Figura 67. Purificación de ModD por columna de afinidad Ni-NTA.** Un cultivo de *E.coli* BL21:pRSET:modD fue crecido hasta una DO de 0,4 para luego inducir con IPTG 1 mM por 4h. **A.** SDS-PAGE 12 % teñido con azul de *Coomassie*. Calles 1 a 4, distintas fracciones eluidas con Tris-HCl 20 mM pH 2. **B.** *Western blot* de las fracciones de las calles 3 y 4 utilizando el anticuerpo anti-histidina (Sigma) como primer anticuerpo (1/5000) y un anti-IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (1/3000) como anticuerpo secundario. MPM: marcador de peso molecular (Amersham), se indican los tamaños en kDa.

**Estudios de la expresión de la proteína en MPTB-Malele 505 y de la reactividad cruzada con el ortólogo de *M. bovis*.** Se obtuvieron las proteínas del extracto celular a partir de la disrupción mecánica del *pellet* celular de un cultivo en fase exponencial, resuspendido en PBS. Para obtener las proteínas del sobrenadante, este fue previamente filtrado para luego realizar una precipitación de las proteínas con sulfato de amonio, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Se separaron las fracciones por SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar la detección de la proteína por *Western blot*. Para la detección, se utilizó un suero policlonal murino específico anti-Mod, obtenido de acuerdo a lo mencionado en Materiales y Métodos. La Figura 68 muestra que se pudo detectar la proteína en el sobrenadante, al igual que en *M. bovis*, un aislamiento de campo utilizado como control. Se detectaron dos polipéptidos de entre 50 y 60 kDa, posiblemente esto sea consecuencia de la modificación post-traduccional en la micobacteria. Pese a la presencia de una secuencia que direcciona a la proteína al medio extracelular, también se detectó una banda de menor intensidad en el extracto celular de *M. avium*

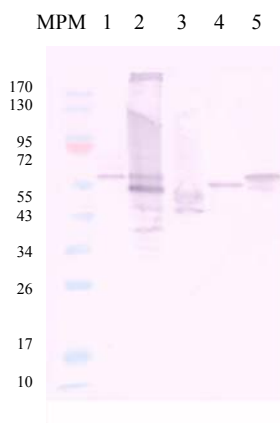
subsp. *paratuberculosis*. También se observó que la proteína tenía un tamaño mayor que el homólogo de *M. bovis*. Esto resultó de acuerdo a lo esperado, ya que difieren en 43 aminoácidos (Tabla 12). Dado que existió reconocimiento de este último, utilizando anticuerpos policlonales generados contra la proteína de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, se pudo concluir que existen epítopes B compartidos entre estos homólogos.



**Figura 68. Localización de la proteína nativa por Western blot.** Se evaluaron por *immunoblotting* las fracciones de proteínas de extracto celular y del sobrenadante de cultivo filtrado. Las proteínas se obtuvieron a partir de un cultivo en fase exponencial de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se utilizaron como control, las mismas fracciones proteicas de *M. bovis*. Se sembraron 25 µg de proteínas por calle y luego de la separación electroforética y transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se detectaron con un anticuerpo policlonal específico anti-ModD-MPTB murino (1/50), se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG anti-murino conjugado a fosfatasa alcalina, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se observa la detección de un dímero tanto en el sobrenadante de MPTB como de *M. bovis*. Se observa una señal más débil en el extracto de MPTB. Calle 1, proteínas del extracto de MPTB; calle 2, proteínas de sobrenadante de MPTB; calle 3, proteínas de extracto de *M. bovis*; calle 4, proteínas de sobrenadante de *M. bovis*. MPM, marcador de peso molecular (Amersham), se indican los tamaños en kDa.

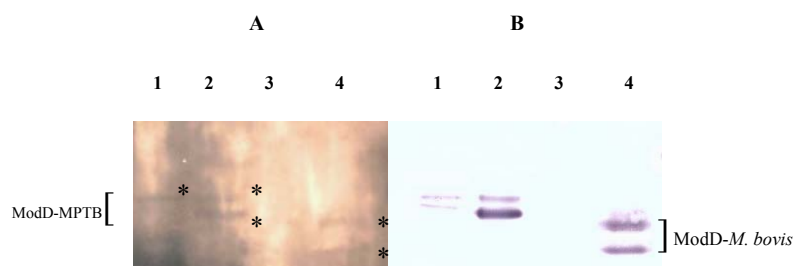
**Identificación de los homólogos hipotéticos en *M. phlei* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.** Con el objetivo de evaluar la expresión de los homólogos ModD en otras micobacterias, se seleccionaron las cepas *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y *M. phlei*. Esta última es una micobacteria ambiental, que puede potencialmente entrar en contacto con los animales, donde la expresión del homólogo no ha sido estudiada. También se incorporó un aislamiento de campo de *M. avium* subsp. *avium*. Las bacterias fueron crecidas en 100 mL de medio libre de proteínas durante 48 h. Se centrifugó la totalidad del cultivo, se filtró utilizando una unidad filtrante (Millipore), para luego obtener las proteínas del sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio. Se evaluó el reconocimiento de las proteínas mediante la utilización del suero anti-ModD por *Western blot*.

Se detectó señal de reconocimiento del antisuero específico, correspondiente a proteínas de 55 kDa en el sobrenadante de *M. smegmatis* y de aproximadamente 59 kDa en el sobrenadante de *M. phlei*. También el suero reconoció la proteína homóloga en *M. avium* subsp. *avium* (Figura 69).



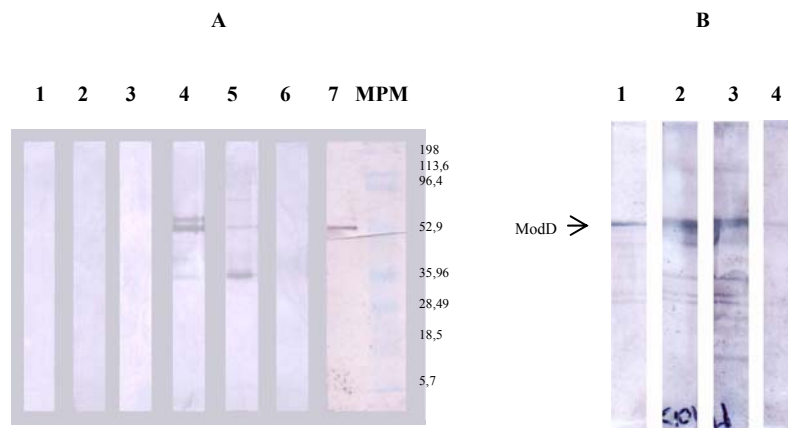
**Figura 69. Detección de posibles homólogos a ModD en *M. phlei* y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155.** Se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio las proteínas del sobrenadante (SN), previa filtración del medio de cultivo de ambas especies de micobacterias. Se detectó por *Western blot* la presencia de ModD empleando el suero policlonal anti-ModD(MPTB). Calle 1, proteínas del SN de cultivo *M. avium* subsp. *avium*; calle 2, proteínas del SN de cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; calle 3, proteínas del sobrenadante de cultivo de *M. bovis*; calle 4, proteínas del SN de cultivo de *M. smegmatis*; calle 5, proteínas de SN de cultivo de *M. phlei*. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños en kDa.

**Ensayo de glicosilación: Unión a Concanavalina A (ConA).** La glicosilación del antígeno de 45/47 kDa se ha demostrado en *M. tuberculosis* y se ha reportado que esta modificación post-traducciona, sería importante para la inmunogenicidad de la proteína (Lara *et al.*, 2004). A partir del análisis de la secuencia primaria, se pudo establecer la presencia de dos motivos de glicosilación en la secuencia de ModD de MPTB, uno de ellos (NDTR), ampliamente conservado en las micobacterias patógenas. Se decidió evaluar la glicosilación de la proteína por medio de un ensayo de *blotting* utilizando la lectina ConA, que tiene la capacidad de interactuar con los residuos de manosa, conjugada a la enzima peroxidasa (Sigma). Se transfirieron las fracciones proteicas a una membrana de nitrocelulosa y se procesó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos. Se pudo observar que el homólogo de MPTB está glicosilado, al igual que el homólogo del complejo *M. tuberculosis* (Figura 70). Se detectó la señal de reconocimiento en ambas isoformas de la proteína, demostrando que ambos polipéptidos, de distinto tamaño aparente, se glicosilan. Mediante el mismo ensayo, no tuvimos evidencia de glicosilación en la proteína recombinante expresada en *E. coli* (no mostrado).



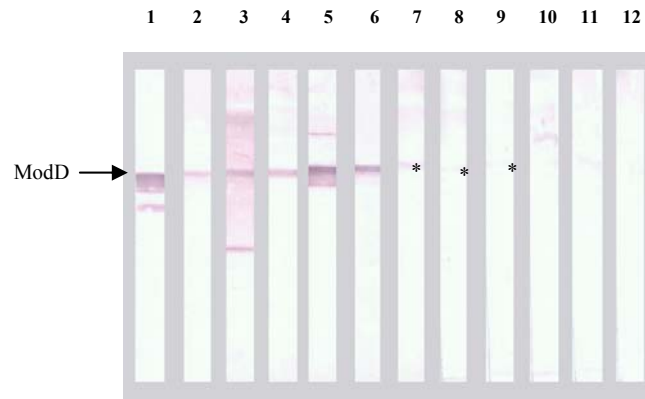
**Figura 70. Evaluación de la glicosilación en ModD mediante el ensayo de unión a ConA.** A. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa fracciones de extracto y sobrenadante de *M. bovis* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. A. Incubación con ConA-peroxidasa (Sigma) y revelado por quimioluminiscencia. B. Incubación con el antisero policlonal anti-ModD y la interacción antígeno-anticuerpo se detectó con el anticuerpo secundario anti-IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina y por revelado en presencia del sustrato NBT/BCIP (Promega). Calles 1, extracto de MPTB; calles 2, sobrenadante de MPTB; calles 3 Extracto de *M. bovis*; calles 4, sobrenadante de *M. bovis*. Se señala con el asterisco “\*” la presencia de señal, que indica la glicosilación de la proteína. Como consecuencia de la marcación intensa de otras glicoproteínas peso molecular menor a ModD, se muestra la porción del *film* y de la membrana que corresponden a las proteínas de entre 40 y 90 kDa.

**Reactividad humoral de ModD.** Como consecuencia de la modificación post-traduccional demostrada en la proteína nativa, primeramente se evaluó el reconocimiento de la proteína recombinante sin modificar, expresada en *E. coli*. Se realizó un reconocimiento de sueros inmunoreactivos, que reconozcan la proteína nativa, glicosilada. Para tal fin, se separó electroforéticamente una fracción de proteínas de sobrenadante de cultivo filtrado y precipitado por sulfato de amonio y se transfirió a nitrocelulosa. Se incubó cada tira con un suero distinto de animales con aislamiento positivo de la bacteria en materia fecal. Se identificaron dos sueros de animales con paratuberculosis clínica que reaccionaron positivamente reconociendo el complejo ModD. Se pudo observar también que estos animales, no reconocieron una gran variedad de proteínas del sobrenadante. Posteriormente, estos sueros fueron enfrentados a la forma recombinante de la proteína, expresada en *E. coli* BL21(DE3), demostrándose un reconocimiento efectivo de la misma a pesar de que la misma no esté glicosilada (Figura 59). Se evaluó también, el reconocimiento de la proteína recombinante por animales tuberculosos. Se emplearon 5 sueros de animales con tuberculosis clínica, confirmada por la presencia de lesiones compatibles con la enfermedad, PCR de isopado nasal, y mediante la prueba de  $\gamma$ IFN. Estos animales mostraron un reconocimiento débil de la proteína. Estos experimentos demuestran que ModD conserva su inmunoreactividad, aún sin la presencia de los residuos glicosídicos.



**Figura 59. Identificación de sueros que reconozcan la proteína nativa (glicosilada) de MPTB.** Se evaluó por *Western blot*, el reconocimiento de las proteínas del sobrenadante de cultivo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* con sueros bovinos. **A.** Calles 1 a 6, membranas incubadas con sueros de animales paratuberculosos (4 y 5 en fase clínica); calle 7, membrana incubada con antisuero murino anti-ModD-MPTB. Los sueros inmunoreactivos, que reconocieron una proteína de idénticas características que ModD (calles 4 y 5) se enfrentaron a la proteína recombinante expresada en *E. coli* BL21(DE3). **B.** Calle 1, membrana incubada con el anticuerpo monoclonal anti-His (Sigma); calle 2, membrana incubada con suero correspondiente a calle 4, mostrado en A; calle 3, membrana incubada con el suero correspondiente a la calle 5 (Figura A), calle 4, *pool* de sueros de animales (n=5) con tuberculosis bovina. MPM: marcador de peso molecular (BioRad), se indican los tamaños en kDa.

**Evaluación de la respuesta humoral contra el antígeno ModD de MPTB en bovinos.** Se realizó un análisis de la respuesta del hospedador utilizando muestras de animales sanos y naturalmente infectados con MPTB. Se evaluaron los sueros por *immunoblotting* con la proteína recombinante purificada. Los sueros de los 5 animales con paratuberculosis evaluados, presentaron una respuesta notoria frente a la proteína, mientras que solo 3 de los 6 animales PTB negativos presentaron una señal débil (Figura 60). Estos datos sugieren, que ModD de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* es inmunogénica y existe una respuesta diferencial entre los animales infectados y libres de la enfermedad.

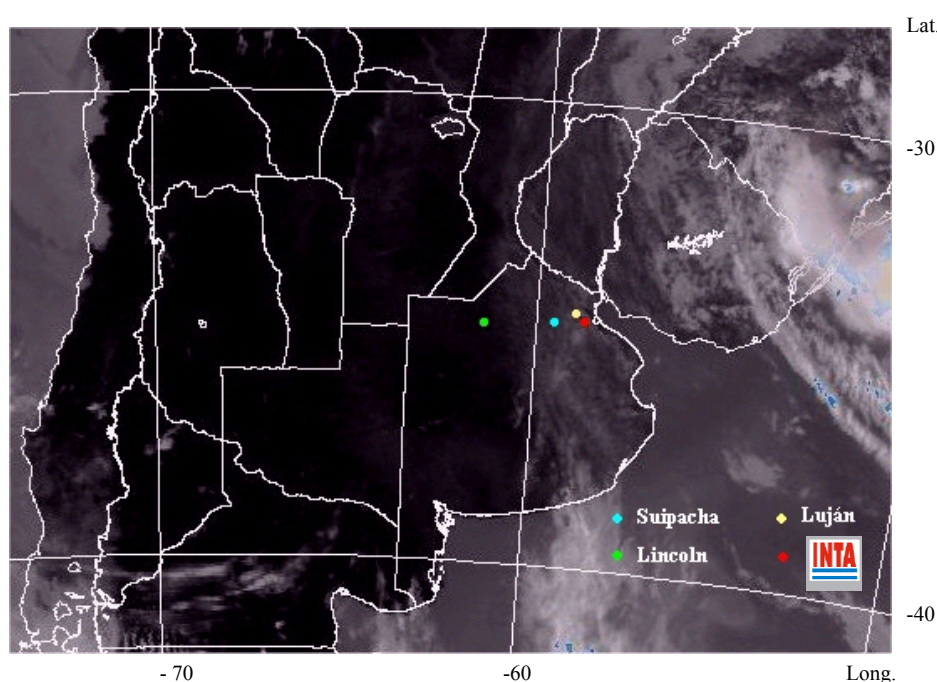


**Figura 60. Reconocimiento de ModD por sueros bovinos.** Distintos sueros bovinos de animales infectados con MPTB (PTB+) y sueros bovinos provenientes de animales de rodeos libres de la enfermedad, fueron enfrentados a la proteína recombinante en un ensayo de *W. blot*. Calle 1, anti-His; calles 2 a 6, sueros de animales PTB+; calles 7 a 12, sueros de animales PTB-. El símbolo \*, indica la presencia de una señal débil de reconocimiento.



### 4.3. Evaluación de la Respuesta celular en tambos con paratuberculosis.

Con el objetivo de estudiar la capacidad inductora de la respuesta celular de los distintos antígenos, se analizó la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN en un total de 90 bovinos. Se realizaron distintos muestreos en establecimientos con paratuberculosis. Fueron evaluados establecimientos lecheros de distintas localidades de la provincia de Buenos Aires (Figura 61), durante los meses de Septiembre y Diciembre de 2006. Todos los establecimientos seleccionados son considerados libres de tuberculosis, de acuerdo al Plan Nacional de erradicación de la tuberculosis bovina (SENASA).



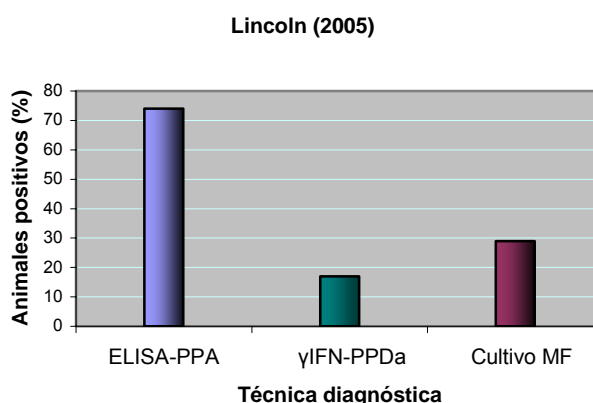
**Figura 61. Localidades de origen de los animales muestreados.**

INTA: Centro Nacional Investigación Agropecuaria-Castelar

#### 4.3.1. Antecedentes de los tambos estudiados.

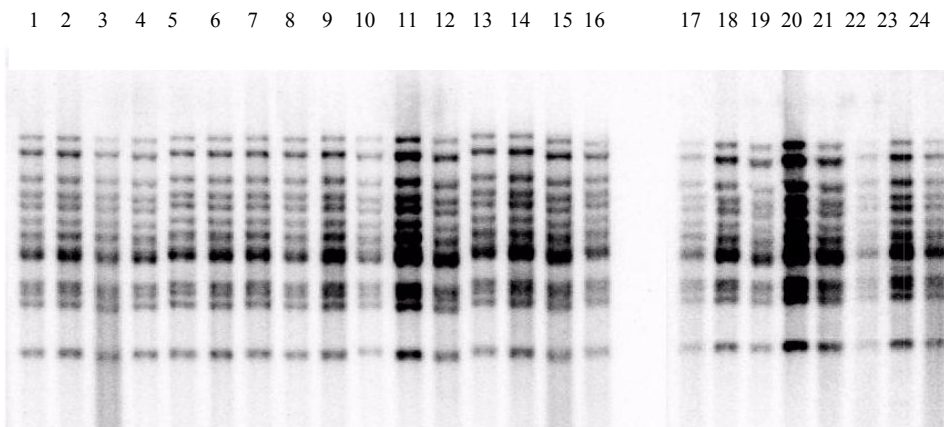
**Tambo-Suipacha (N=21).** Uno de los muestreos se realizó en un tambo de la localidad de Suipacha, donde fueron evaluados los antígenos recombinantes en 21 animales. En un relevamiento previo de 50 animales, este establecimiento tuvo un 30 % de animales positivos a la prueba serológica de ELISA-PPA. Algunos animales presentaban síntomas clínicos que evidenciaban la enfermedad, como pérdida de peso notoria, diarrea acuosa y sanguinolenta en algunos casos. Se sacrificaron dos animales que cursaban la fase clínica de la enfermedad, con diarrea crónica, pérdida de peso, desmejoramiento general y producción láctea disminuída. Los análisis histopatológicos y el aislamiento de la bacteria a partir de la materia fecal de los dos animales sacrificados, confirmaron la sintomatología compatible con paratuberculosis.

**Tambo-Lincoln (N=24).** Se realizó otro muestreo en un tambo ubicado en la localidad de Lincoln. Previamente, en Noviembre de 2005, se estudiaron 50 animales provenientes de este establecimiento. En esa oportunidad, se evaluó la respuesta humoral mediante el ELISA-PPA y la respuesta celular mediante la estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN (Bovigam, CSL) con el antígeno de referencia PPDa. Se tomaron muestras de materia fecal y de leche de los animales y de los filtros de leche del equipamiento empleado para el ordeño, para el aislamiento de la bacteria. El 74 % de los animales resultó positivo por la prueba de ELISA-PPA. Un porcentaje menor, 17 %, fue positivo a la prueba de  $\gamma$ IFN, mientras que el aislamiento de la bacteria se obtuvo en el 29 % de los casos (Figura 62). En esa oportunidad, un animal con síntomas notorios de la enfermedad, fue sacrificado y sus órganos fueron procesados para el análisis histopatológico, confirmándose la presencia de lesiones compatibles con la patología. El procesamiento histológico fue realizado por el Med.Vet. Fernando Delgado del Instituto de Patobiología, INTA-Castelar. Adicionalmente, se aisló la bacteria por cultivo, a partir de nódulos linfáticos mamarios y mesentéricos y de tejido intestinal.



**Figura 62.** Resultados de las distintas técnicas aplicadas al tambo de Lincoln en el muestreo del año 2005 (N=50). PPA: antígeno protoplasmático; MF: materia fecal.

Todos los aislamientos de MPTB obtenidos de los animales de este establecimiento fueron analizados por RFLP-*IS900*, obteniéndose un único perfil en la totalidad de los mismos. Este perfil corresponde al tipo A (Moreira *et al.*, 1999), mayoritario en nuestro país, que es idéntico al más abundante en Europa, denominado C17 (Figura 63).



**Figura 63.** RFLP-IS900. Se muestran los perfiles de los distintos aislamientos como resultado de la hibridación con la sonda IS900 de los fragmentos genómicos obtenidos por digestión con *BstEII*. Posteriormente, este perfil fue identificado como del tipo A, de acuerdo a Moreira *et al.* (1999). Calles 1 a 16, aislamientos de MPTB a partir de materia fecal de distintos animales; calles 17 a 20, aislamientos provenientes del filtro de los tambos; calles 21 a 24, aislamientos a partir de tejido del animal necropsiado (linfonódulo mamario, ganglios mediastínicos, válvula ileo-cecal e intestino delgado).

Posteriormente, en el año 2006, se muestrearon 24 animales de este establecimiento para el estudio de los antígenos recombinantes.

**Tambos CNIA-Castelar y Luján (N=45).** El mejor criterio para determinar la ausencia de infección de MPTB para un animal individual, debe estar basado en la ausencia de infección del establecimiento completo al cual pertenece el animal (Collins *et al.*, 2005). Como grupo control fueron muestreados 45 animales pertenecientes a establecimientos sin historial de la ocurrencia de la enfermedad y sin aislamiento de la bacteria por cultivo de *pooles* de materia fecal. Se incluyeron en este estudio animales del tambo de INTA-Castelar (N=37) y animales de un establecimiento de la localidad de Luján (N=8), Pcia de Buenos Aires.

#### 4.3.2. Toma de muestras y procesamiento.

Se recolectó materia fecal del recto de cada animal en frascos estériles. Se procesó una fracción de 10 g, para el cultivo, según Paolicchi *et al.*, (2003), previa decontaminación con hexadecilpiridinium 0,75 %. Las muestras resultantes fueron sembradas en medio de Herrold, con y sin micobactina, suplementando los medios con los antibióticos vancomicina (100 µg/mL), anfotericina B (2,0 mg/mL), ácido nalidíxico (3 mg/mL) y nistatina (100 µg/mL). Una fracción de la materia fecal decontaminada fue procesada por la técnica de Ziehl-Neelsen, de acuerdo al protocolo descrito por Kantor (1988), para la visualización de las micobacterias al microscopio óptico. Se extrajeron 50 mL de leche de cada animal, que se procesaron para el cultivo. Los

cultivos fueron incubados durante un período de 4 meses y se confirmó la identidad del aislamiento por PCR-IS900. Para la obtención del suero se extrajeron 5 mL de sangre entera de cada animal por punción de la vena coxígea. Las muestras fueron procesadas por la técnica de ELISA que emplea el antígeno protoplasmático PPA (Allied), de acuerdo al protocolo descrito por Paolicchi *et al.*, (2003). Adicionalmente, se extrajeron 10 mL de sangre heparinizada (20 U/mL), para las pruebas celulares. Esta sangre fue procesada dentro de las 4 h desde su obtención. Todas las técnicas bacteriológicas, así como la prueba de ELISA-PPA, fueron realizadas en el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción animal de la Estación Experimental y Agronómica de INTA-Balcarce.

#### **4.3.3. Prueba de estimulación de la liberación de $\gamma$ IFN**

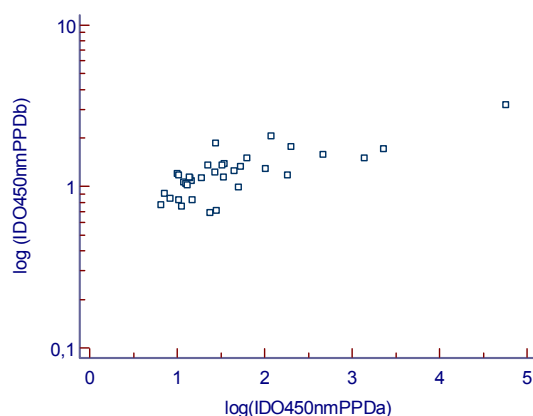
Para la evaluación de la respuesta celular se cuantificó la liberación de  $\gamma$ IFN por estimulación de la sangre entera de los animales. Para la estimulación de los linfocitos, se incubó la sangre con los antígenos durante 16 h, y luego se evaluó el  $\gamma$ IFN liberado mediante el ELISA comercial Bovigam (Biocor, CSL). Resultados preliminares, no mostrados en este trabajo, demostraron que concentraciones menores a 10  $\mu$ g/mL de los antígenos recombinantes eran insuficientes para estimular la respuesta celular en animales infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Por este motivo, se utilizó una concentración antigénica de 10  $\mu$ g/mL de acuerdo a lo descrito en la bibliografía (Sung *et al.*, 2005). Se estimuló la sangre de la totalidad de los animales con el panel de antígenos recombinantes, las mezclas antigénicas PPDa, PPDb (Biocor) y el estimulante inespecífico *Pokeweed mitogen* (Tabla 13). Para evaluar la liberación de  $\gamma$ IFN en ausencia de estímulo, o los niveles endógenos de la citoquina en cada animal, se incubó cada muestra con PBS (control negativo). Se evaluaron adicionalmente, distintas mezclas antigénicas recombinantes y un Derivado Proteico Purificado del aislamiento Malele-505 de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, preparado en nuestro laboratorio y que denominamos PPDj-IB.

Antígeno	Descripción	Referencia
MAP860c	Antígeno subespecie específico (MPTB)	Bannantine <i>et al.</i> , (2004); este trabajo.
Lpp34	Antígeno específico MAC	Gioffré <i>et al.</i> , 2006 y este trabajo
BfrA	Antígeno MAC/MTC	Sugden <i>et al.</i> , (1991); este trabajo
PknB	Antígeno potencial	Este trabajo
DnaK/Hsp70	Antígeno MAC/MTC	Stevenson <i>et al.</i> , (1991) y este trabajo
GrpE	Antígeno potencial MAC/MTC	Este trabajo
LprG	Antígeno homólogo de MPTB	Este trabajo
ModD	Antígeno homólogo de MPTB	Este trabajo
Ag85A	Antígeno MTC/MAC	Rosseels <i>et al.</i> , (2006); plásmido cedido por P. Brennan (Universidad de Columbia, USA)
LppE/LppJ	Antígenos potenciales MTC/MAC (proteínas hipotéticas)	Winter-Santángelo <i>et al.</i> , I. Pasteur-IB-INTA (datos no publicados) y este trabajo
PPDa	Derivado Proteico Purificado de <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	Comercial (Biocor, CSL)
PPDb	Derivado Proteico Purificado de <i>M. bovis</i> AN5	Comercial (Biocor, CSL)
PPDj-IB	Derivado Proteico Purificado de <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> Malele-505	Este trabajo
MixA	Mezcla recombinante: Hsp70 Lpp34, BfrA, ModD, LppE, LprG	Este trabajo
MixB	Mezcla recombinante: Hsp70, Lpp34, LppJ	Este trabajo
<i>Pokeweed mitogen</i> (PWM)	Lectina de origen vegetal (Inductor inespecífico)	Comercial (Sigma)

**Tabla 13. Panel de antígenos evaluados por la prueba de liberación de  $\gamma$ IFN Bovigam (Biocor, CSL).** MAC, complejo *M. avium*; MTC, complejo *M. tuberculosis*; PPD, Derivado Proteico Purificado (a, aviar; b, bovino; j, johnina).

Se midió la densidad óptica a 450 nm (DO450nm) y se calcularon los promedios de los duplicados, para luego calcular los índices de densidad óptica (IDO450nm) en relación al PBS como se indica en Materiales y Métodos. Este valor de IDO450nm, representa el nivel de la citoquina liberada por los linfocitos, estimulados con el antígeno analizado. Se estimaron los puntos de corte tal como se describió en Materiales y Métodos.





**Figura 65. Análisis de correlación entre la respuesta celular de los animales por estimulación con PPDa y PPDb.** Se realizó una análisis de correlación obteniéndose un valor  $R = 0,7553$  ( $P < 0,0001$ ;  $n = 35$ )

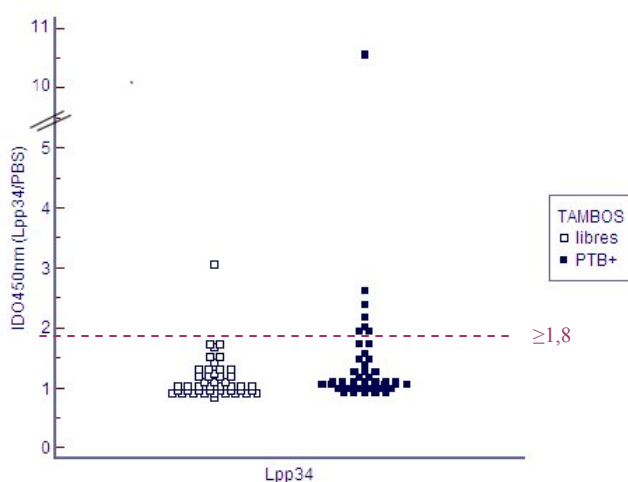
Se observó que muchos de los animales de los tambos infectados que presentaban valores altos de estimulación con PPDa, también presentaban valores altos de estimulación con PPDb. Con el objetivo de evaluar el grado de asociación entre los índices de estimulación obtenidos con las dos mezclas antigénicas (PPDa y PPDb) se realizó un análisis de correlación (Figura 65). El análisis arrojó un coeficiente de correlación,  $r = 0,7553$  ( $P < 0,0001$ ). Este resultado mostró que el grado de respuesta de los animales frente a PPDa está asociado al nivel de respuesta que presentan frente a PPDb. Esto podría ser consecuencia de los antígenos homólogos presentes en las dos bacterias.

#### **Evaluación de la interferencia de las reacciones cruzadas en el ensayo que utiliza las PPDs de referencia.**

Se realizó un análisis comparativo de la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN por estimulación con PPDb y PPDa en los rodeos libres de la enfermedad. Se observó que la respuesta fue significativamente mayor cuando se estimuló con PPDa respecto de la estimulación con PPDb ( $P = 0,0085$ ) (Figura 64). Esto se podría explicar por las reacciones cruzadas con las bacterias saprófitas, muchas de ellas del complejo *M. avium* presentes en el ambiente (Primm *et al.*, 2005, Wilks *et al.*, 1981).

#### 4.3.3.2. Antígenos recombinantes seleccionados a partir del análisis de la genoteca $\lambda$ -Zap::*M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

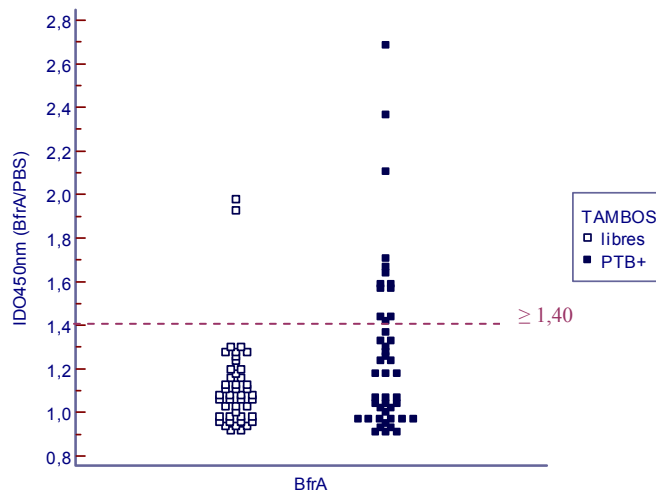
**Lpp34.** La estimulación de los linfocitos T con el antígeno Lpp34 resultó en una respuesta levemente diferencial entre los animales de los tambos infectados y sanos ( $P= 0,042$ ). Hubo un animal de un tambo con PTB que respondió con un índice de estimulación marcadamente superior al resto (10,56) (Figura 668). También un único animal de un tambo libre de la enfermedad presentó un valor muy superior al resto de los animales sanos (3,06). Este ensayo demostró la presencia de epítopes T en Lpp34.



**Figura 66.** Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno Lpp34. Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas de cada grupo (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $P=0,042$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba que emplea este antígeno, IDO450nm  $\geq 1,80$

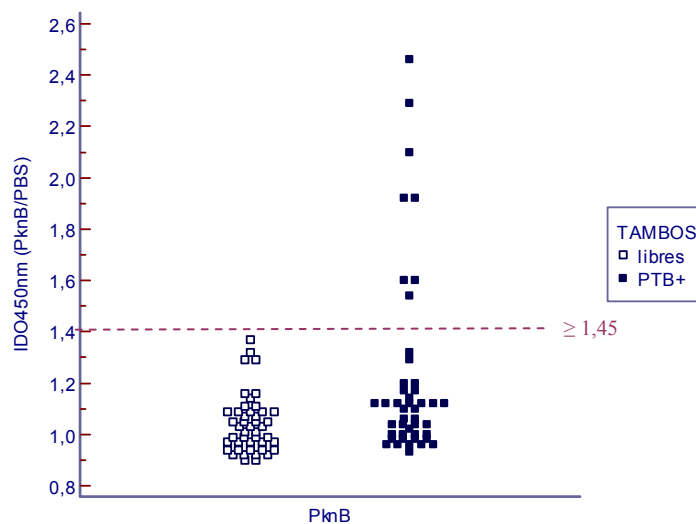
**BfrA.** Los valores de estimulación de algunos animales con este antígeno en los tambos PTB+, fueron elevados (IDO450 máximo de 2,69). Sin embargo, dos animales del tambo negativo también presentaron respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN, aunque con valores menores (cerca de 2) (Figura 67). Este antígeno pudo diferenciar a los tambos sanos de los infectados con una significancia del 6 % ( $P = 0,060$ ).





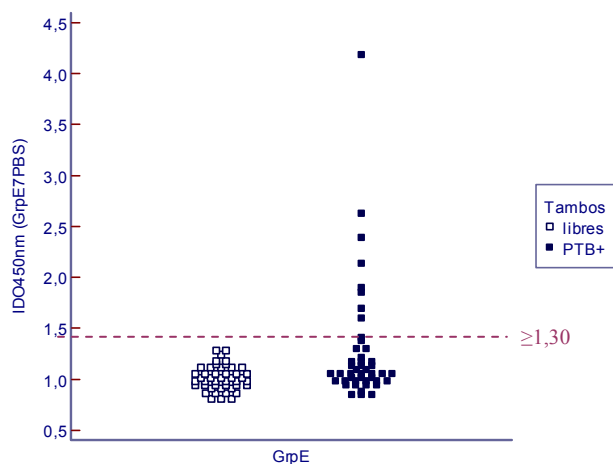
**Figura 67. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno BfrA.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) de los animales pertenecientes a los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas de cada grupo (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), no mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $p=0,06$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se indica con la línea punteada, el punto de corte del ensayo con este antígeno, IDO450nm  $\geq 1,40$ .

**PknB.** Este antígeno estimuló de forma diferencial la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN en los distintos tambos ( $P = 0,003$ ). El valor máximo de estimulación en los animales con PTB fue de 2,46, mientras que el máximo valor de estimulación en los animales sanos fue de 1,37 (Figura 68). Este ensayo demostró la presencia de epítopes T en PknB, capaces de estimular la respuesta celular.



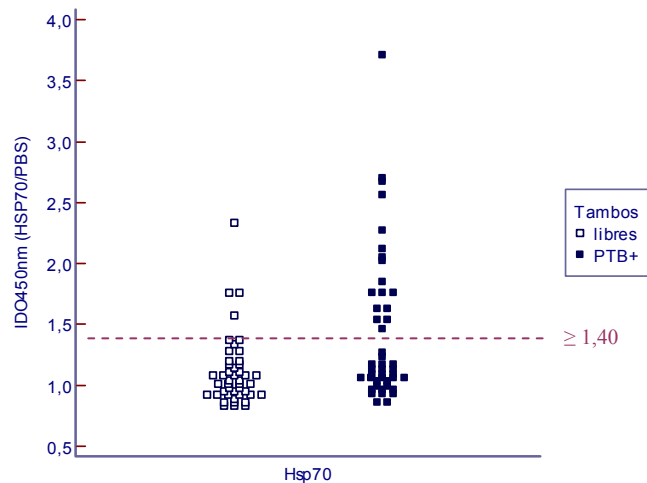
**Figura 68. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno PknB.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas de cada grupo (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), no mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $p=0,030$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba con este antígeno IDO450nm  $\geq 1,45$ .

**GrpE.** Los animales estimulados con este antígeno tuvieron un valor máximo de IDO450nm de 4,18 en los tambos con paratuberculosis, mientras que el valor máximo en los tambos negativos fue 1,3 (Figura 69). La estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN con este antígeno, demostró la presencia de epítopes T que permitieron diferenciar los tambos libres de los tambos infectados con PTB ( $P = 0,0080$ )



**Figura 69. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno GrpE.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas de cada grupo (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $p=0,008$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba con este antígeno, IDO450nm  $\geq 1,30$ .

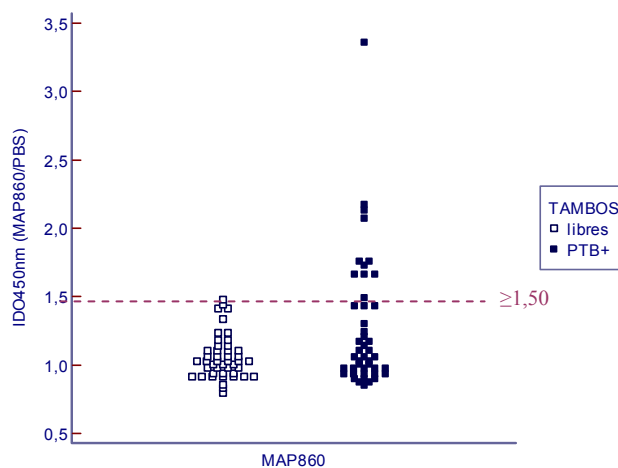
**Hsp70.** Los animales estimulados con este antígeno tuvieron un valor máximo de respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) de 3,71 en los tambos infectados (Figura 70). Algunos animales de los rodeos libres de la enfermedad presentaron valores de estimulación altos. El IDO450nm máximo de los tambos negativos fue de 2,33. La estimulación que se observó en algunos animales de los tambos libres de la enfermedad se puede explicar por la conservación de Hsp 70 (DnaK) en el dominio Bacteria. Sin embargo, la respuesta (mediana) de estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN con este antígeno fue mayor en los tambos PTB+ y permitió diferenciar los tambos libres de los tambos infectados ( $P = 0,035$ ).



**Figura 70.** Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno Hsp70. Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. La respuesta de los grupos (medianas) fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $p=0,035$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba que emplea este antígeno, IDO450nm  $\geq 1,40$ .

#### 4.3.3.3. Antígenos recombinantes de MPTB, previamente descritos en la bibliografía.

**MAP860.** Se analizó la respuesta celular por estimulación con el antígeno codificado por el gen *MAP860c*. Esta secuencia fue descrita previamente como una secuencia diferencial a partir del análisis comparativo del genoma de MPTB K-10 y *M. avium* subsp. *avium* 104 (Bannantine *et al.*, 2004), aunque no fue demostrada su capacidad inductora de la respuesta celular.

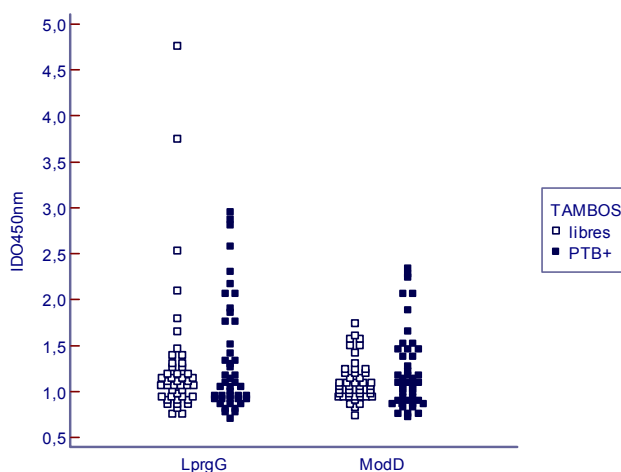


**Figura 71.** Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno MAP860. Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos positivos y negativos. Las respuestas de cada grupo (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $p=0,0304$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba que emplea este antígeno, IDO450nm  $\geq 1,50$ .

Se expresó la proteína en el sistema heterólogo *E. coli*-pRSET y se obtuvo una proteína de 43 kDa, que se purificó por columna de afinidad en condiciones nativas. Se evaluó la respuesta mediada por células a partir de la estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN de los linfocitos T, empleando la proteína recombinante (Figura 71). El empleo de este antígeno permitió observar una respuesta diferencial entre los animales de los tambos con PTB y los sanos ( $P = 0,0304$ ). El máximo valor de estimulación (IDO450nm) en los tambos infectados fue de 3,36, mientras que en los tambos sanos, fue de 1,48.

#### 4.3.3.4. Antígenos homólogos descritos en el complejo *M. tuberculosis*

**LprG y ModD.** La utilización del antígeno *LprG*, no resultó en una estimulación diferencial ya que no hubieron diferencias significativas entre las respuestas (medianas) de los animales de los tambos libres de la enfermedad y los animales de los tambos libres ( $P = 0,34$ ). Dos animales pertenecientes a los tambos negativos, tuvieron respuestas elevadas con IDO<sub>450nm</sub> de 4,77 y 3,84, inclusive mayores que el valor de estimulación máximo en el rodeo infectado (2,95) (Figura 72). Esto podría explicarse, por la presencia de proteínas homólogas a *LprG* en las bacterias ambientales. La búsqueda por BLASTp en el genoma de *Nocardia farcinica* IFM 10152, identificó una proteína de 268 aminoácidos con una homología del 33 % a *LprG* de MPTB. Es de esperar que esta proteína esté conservada en el género, que tiene representantes distribuidos en el ambiente.

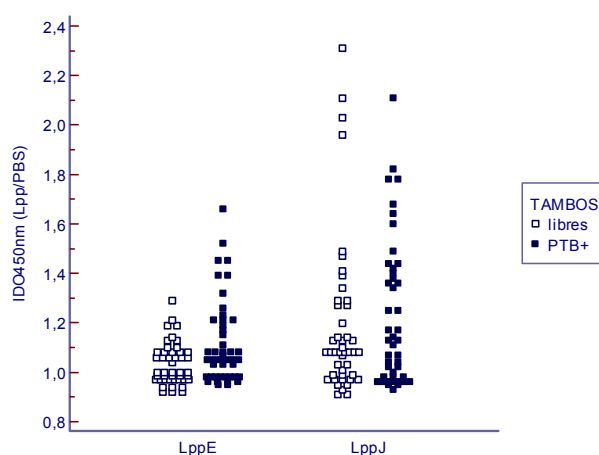


**Figura 72.** Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con los antígenos *LprG* y *ModD*. Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) obtenida en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas (mediana) obtenidas con cada antígeno en los distintos tambos, fueron analizadas con el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias no significativas entre las dos poblaciones ( $P=0,34$ ; GL:1,  $n=90$  y  $P=0,765$ ; GL:1,  $n=90$ , respectivamente)

Si bien la estimulación de la respuesta celular con ModD, tampoco permitió diferenciar los tambos infectados de los sanos ( $P = 0,7652$ ), este antígeno estimuló a 6 animales de los tambos PTB+ con IDO450nm altos, cercanos a 2. En ambos casos, se seleccionó un punto de corte de un IDO450  $\geq 1,50$ , ya que este valor permitió una especificidad cercana al 90 %.

### Lipoproteínas hipotéticas del complejo *M. tuberculosis*

Se estudiaron las lipoproteínas hipotéticas LppE y LppJ. Se evaluó la antigenicidad de estas proteínas de *M. tuberculosis*, que tienen sus respectivos homólogos en el complejo *M. avium*. El gen *lppJ*, (MAP2417c) de MPTB, codifica para una proteína de 18 kDa que presenta una identidad del 33 % por BLAST-p, con el homólogo de *M. tuberculosis* H37RV, codificado en esta bacteria por el gen Rv2080. LppE, codificada por el gen Rv1881c en *M. tuberculosis*, tiene un tamaño teórico de 15 kDa y es una proteína que pertenece a la familia PFAM05481, cuyo representante es el antígeno de 19 kDa de *Mycobacterium*. En MPTB la proteína está codificada por el gen MAP1604c y tiene un 67 % de homología a nivel de secuencia aminoacídica con la proteína del complejo *M. tuberculosis*. Se clonaron los genes correspondientes a *M. tuberculosis* en nuestro laboratorio para expresar las proteínas recombinantes en el vector pET-28. Posteriormente fueron purificadas por cromatografía de afinidad por la plataforma de purificación del Instituto Pasteur, en un trabajo en colaboración con la Dra. Natalie Winter. Resultados previos, mostraron la capacidad antigénica de estas proteínas en el modelo murino experimental de tuberculosis, así como también la capacidad estimulante de la respuesta celular en animales infectados con *M. bovis*, por este motivo, decidimos evaluar la respuesta de los animales con PTB estimulando a los animales de los distintos tambos con estos homólogos de *M. tuberculosis* (Figura 73).

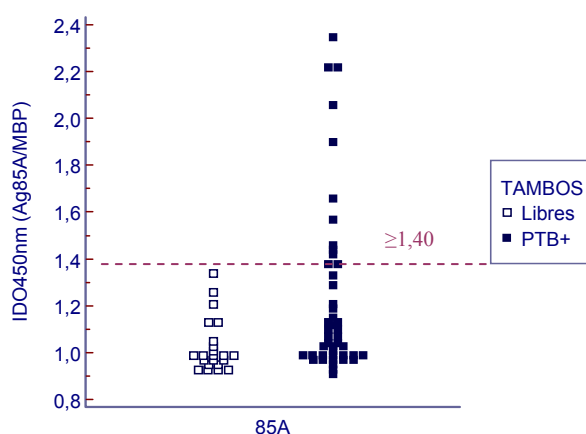


**Figura 73. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con los antígenos LppE y LppJ.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos infectados (PTB+) y libres de la enfermedad. Las respuestas obtenidas en cada tambo (mediana), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas). Para el antígeno LppJ la respuesta no mostró diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $P=0,4525$ ; GL:1,  $n=90$ ). LppE presentó una respuesta diferencial en los dos tambos ( $P = 0,0179$ , GL:1,  $n=90$ ).

La Figura 73 muestra que si bien los animales respondieron frente a ambos antígenos, se pudo observar una respuesta marcadamente distinta. LppJ fue capaz de estimular indistintamente a los animales de los tambos infectados como sanos ( $P = 0,4525$ ). Por el contrario, LppE, estimuló más la respuesta celular en los animales de rodeos con paratuberculosis ( $P = 0,0179$ ), aunque con niveles de respuesta menores que LppJ. Por lo tanto, LppE sería más específico. Probablemente, la presencia de algún homólogo conservado en las especies ambientales expliquen los resultados observados con LppJ. Se consideraron como positivos a aquellos animales que presentaban un  $IDO_{450} \geq 1,31$  para LppE y una  $IDO_{450nm} \geq 1,60$  para LppJ.

### Complejo del antígeno 85

El complejo del antígeno 85, constituido por el antígeno 85A, 85B y 85C, demostró ser un buen estimulante de la respuesta celular en animales tanto con tuberculosis bovina como con PTB (Rosseels *et al.*, 2006), por lo tanto, fue incorporado en este trabajo el antígeno 85A (Ag85A) para su estudio. La Figura 74, muestra los  $IDO_{450nm}$  obtenidos luego de la estimulación con el antígeno. La estimulación (mediana) de los animales de los tambos infectados fue significativamente mayor que los tambos libres de la enfermedad ( $P = 0,0005$ ). El valor máximo de estimulación fue de 2,35 en los tambos infectados, mientras que en los tambos libres de la enfermedad, los valores de estimulación alcanzaron un  $IDO_{450}$  de 1,34.



**Figura 74. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con el antígeno 85A.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN ( $IDO_{450nm}$ ) en los animales de los tambos positivos y negativos. Este antígeno se expresó en el vector pMAL, en consecuencia el  $IDO_{450}$  se calculó respecto de la proteína de unión a maltosa MBP, empleada en la misma concentración. Las respuestas de los grupos (medianas), fueron comparadas por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas), mostrando diferencias significativas entre las dos poblaciones ( $P = 0,0005$ ; GL:1,  $n=90$ ). Se muestra con la línea punteada, el punto de corte seleccionado para la prueba que emplea este antígeno,  $IDO_{450nm} \geq 1,40$ .

#### 4.3.3.5. Análisis comparativo del ensayo de liberación de $\gamma$ IFN basado en los distintos antígenos.

Se identificó a los animales con respuesta positiva a cada prueba en base al punto de corte seleccionado para cada antígeno. Se determinó la proporción de animales de los tambos infectados que resultaron positivos para cada ensayo. La especificidad de la prueba fue estimada a partir de la proporción de animales que mostraron valores de estimulación por debajo del punto de corte en los tambos libres de la enfermedad (Tabla 14).

Antígeno estimulante	Animales positivos (%)			Especificidad* <sup>1</sup> (%)
	Tambos PTB+ N=45	Tambos PTB- N=45		
PPDa	14	(31)	2	95,5
Lpp34	6	(13)	1	97,8
BfrA	13	(29)	1	97,8
GrpE	12	(27)	0	100
Hsp70	17	(38)	4	91,1
PknB	8	(18)	0	100
MAP860	14	(31)	0	100
LprG	13	(29)	6	86,7
ModD	9	(20)	4	91,1
LppJ	7	(15,5)	3	93,3
LppE	7	(15,5)	0	100
Ag85A	9	(20)	0	100

**Tabla 14.** Cantidad de animales positivos por la prueba de  $\gamma$ IFN utilizando los distintos antígenos y estimación de la especificidad de cada ensayo.

\*<sup>1</sup> la especificidad fue estimada como  $N-n(\text{pos})/N \times 100$ , donde N es el número de animales evaluados (N=45), n(pos) es el número de animales positivos en los tambos libres (falso-positivos).

El porcentaje de animales positivos identificados por los antígenos BfrA, MAP860, LprG, y GrpE, fue semejante al obtenido con PPDa. La especificidad de la prueba con los antígenos GrpE, MAP860, LppE y Ag85 fue superior a la especificidad de la prueba con PPDa (100 % vs 95,5 %). El antígeno Hsp70, detectó una mayor proporción de animales que PPDa, sin embargo la especificidad fue menor. Las Tablas 16 y 17 muestran los resultados de las distintas pruebas en cada animal de los tambos infectados, junto a los resultados de todas las pruebas diagnósticas realizadas, como también la presencia o ausencia de sintomatología asociada a la enfermedad en el momento del muestreo. A partir del análisis de estas tablas, se pudo observar una respuesta muy variada entre los animales, tanto en magnitud como en cantidad y naturaleza de antígenos reconocidos.

animal	Sintomatol.	ELISA-PPA	ZN-MF	Cultivo	Respuesta Celular: Liberación de $\gamma$ IFN											
					BfrA	GrpE	PknB	Hsp70	Lpp34	M860	LprgG	ModD	LppE	LppJ	Ag85A	PPDa
M15	neg	pos	pos	neg	1,67	1,38	1,2	1,19	1,11	1,53	1,35	1,53	1,39	1,44	1,1	3,24
M315	neg	neg	neg	neg	1,26	0,98	1,01	0,99	1,06	0,98	1,41	1,16	0,99	1,02	1,14	1,08
m698	neg	pos	neg	neg	1	1,41	1,29	1,55	1,32	1,11	2,07	1,47	1,15	1,82	1,08	1,63
887	diarrea sang.	pos	pos	Mf	1,18	1,21	1,54	1,85	2,38	1,03	1,18	2,07	1,09	1,14	1,57	2,24
1152	diarrea	neg	neg	neg	1,44	1,6	1,12	1,13	2,17	1,54	2,81	1,19	1,22	1,25	1	1,02
1226	neg	neg	neg	neg	2,11	2,39	2,46	1,76	10,56	2,07	1,91	1,41	1,4	1,64	2,35	5,15
1244	diarrea	pos	pos	neg	1,33	0,98	1,12	2,67	1,75	1,1	1,07	1,1	1,03	1,17	1,05	2,11
1286	neg	neg	pos	neg	1,6	1,85	1,93	2,02	1,48	1,14	2,18	1,88	1,66	2,11	1,12	1,57
1293	diarrea	pos	pos	neg	0,98	0,94	1,92	0,98	1,05	1,03	1,06	1,46	1,05	0,98	1,15	0,98
1322	neg	pos	neg	neg	1,02	0,97	1,07	1,07	1,27	0,98	0,97	1,07	1,04	0,98	1,19	1,02
1330	neg	pos	neg	neg	1,04	1,08	1,01	1,15	1,15	1	0,99	1	1,08	1,07	2,22	1,37
1403	diarrea	neg	neg	neg	1,37	0,88	0,96	1,76	1,39	1	1,86	1,14	1,11	1,49	1,03	1,5
1415	neg	pos	pos	neg	1	1,04	1	0,95	1,08	0,98	1,08	1,1	1,21	1,11	1,07	1,62
1481	neg	neg	neg	neg	1,3	1,08	1,11	1,09	1,05	1,2	1,06	1,18	1,45	1,38	1,01	1,82
1502	neg	neg	neg.	neg	1,25	1,3	1,04	1,54	2,02	1,3	1,34	2,08	1,21	1,68	1	1,43
1524	neg	neg	neg.	neg	0,97	0,98	1	1,06	0,92	1,09	0,94	1,06	0,98	1,04	0,97	1,6
1532	neg	pos	pos.	neg	0,95	1,06	1,61	1,63	0,96	0,99	1,78	0,86	1,45	0,97	1,9	4,76
1538	neg	neg	neg	neg	1,64	0,98	0,98	0,96	1,08	1,07	1	0,97	1,05	1,42	0,99	1,12
1552	diarrea-bajopeso	pos	pos	neg	1,33	1,13	0,96	0,97	1,1	1,07	1,27	1,49	1,19	1,44	1,07	13,11
1559	diarrea	neg	neg	neg	1,19	1,09	1,04	1,08	0,98	1,02	1,03	0,89	0,98	1,18	0,98	3,34
1706	neg	neg	neg	neg	0,97	1,12	1,17	1,06	0,98	1,04	1,05	1,01	1,03	0,98	1,07	2,63
<b>Total</b>	<b>7/21</b>	<b>10/21</b>	<b>8/21</b>	<b>1/21</b>	<b>5/21</b>	<b>6/21</b>	<b>5/21</b>	<b>8/21</b>	<b>4/21</b>	<b>3/21</b>	<b>6/21</b>	<b>4/21</b>	<b>5/21</b>	<b>4/21</b>	<b>4/21</b>	<b>13/21</b>

**Tabla 15. Respuesta celular, humoral y resultados bacteriológicos de los animales del establecimiento de la localidad de Suipacha (n=21).** Un total de 19 animales presentaron respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN frente a alguno de los antígenos estudiados. Se muestran en gris los índices de estimulación (IDO450nm) considerados como positivos de acuerdo a los puntos de corte estimados para cada ensayo. Se resaltan en verde, la respuesta de  $\gamma$ IFN positiva estimulando tanto con PPDa como con los antígenos recombinantes; en rosa, los animales que respondieron exclusivamente a la estimulación de los antígenos recombinantes; en amarillo, los animales que respondieron exclusivamente a PPDa. Se muestran los resultados de la prueba de ELISA-PPA que emplea el antígeno de *M. avium* subsp. *avium* (Allied), la tinción de Ziehl-Neelsen en materia fecal (MF) y el cultivo de materia fecal y leche. Se registró la sintomatología de cada animal en el momento de la realización del muestreo.



					Respuesta Celular: Liberación de $\gamma$ IFN											
animal	Sint.	ELISA-PPA	ZN-MF	Cultivo	BfrA	GrpE	PknB	Hsp70	Lpp34	M860	LprgG	ModD	LppE	LppJ	Ag85A	PPDa
204	neg	neg	neg	neg	1,05	1,17	0,99	2,56	1,32	1,5	2,58	1,27	0,98	1,34	1,01	1,88
210	neg	pos	neg	neg	1,04	1,01	1,12	1,03	1,03	1,07	1,08	1	1	0,97	1,11	1,1
4545	neg	pos	pos	neg	2,37	1,3	1,1	2,7	1,73	1,76	2,87	2,28	1,09	1,79	1,42	1,93
4708	neg	pos	neg	neg	1,59	1,16	1,32	1,65	1,52	1,43	1,51	1,52	1,17	1,25	1	1,68
4746	neg	pos	pos	Mf (05)	1,24	2,63	2,1	2,27	1,13	3,36	2,09	1,66	0,95	1,36	2,06	11,95
4816	neg	pos	pos	neg	1,03	1,09	1,14	1,27	0,97	1,24	0,97	1	0,97	1,36	1,66	1,15
4930	neg	pos	neg	neg	1,71	1,69	1,12	1,46	1,18	1,76	1,1	1,18	0,97	1,03	1,03	1,78
4955	neg	neg	neg	neg	1,05	0,98	1,13	1,06	1,06	1,05	0,96	1,05	1,06	0,95	1,33	1,07
4961	neg	pos	neg	neg	1	1,04	1,13	1,18	1,22	1,19	1,05	1,09	1,32	1,13	1	1,15
4991	neg	neg	neg	neg	1,08	1,07	1,17	1,07	0,96	0,99	1,09	0,89	0,97	0,93	0,95	1,69
5125	neg	neg	neg	leche	2,69	4,18	1,2	2,12	1,97	2,13	2,95	2,34	1,05	1,4	1,08	2,25
5129	neg	pos	neg	neg	1,07	0,95	1,05	1,06	1,15	1,73	0,96	1,05	1,06	1	1,07	0,96
5140	neg	neg	neg	neg	0,97	1,07	0,99	1,03	1,06	1,07	1,06	1	1,06	0,96	1,02	1,02
5161	diarrea	neg	neg	neg	1,57	2,14	2,29	1,76	1,95	2,17	1,76	1,38	1,52	1,6	1,21	1,36
5175	neg	pos	neg	neg	1,02	1,9	1,6	2,05	1,57	1,66	1,3	1,06	1,08	1,02	1,09	1,28
5209	neg	neg	neg	neg	1,02	1,04	1	1,09	1,05	1,06	1,2	1,02	0,98	0,96	0,99	1,08
5369	neg	neg	neg	leche yMf	1,58	1,14	0,98	3,71	2,62	0,98	2,31	2,24	1,23	1,78	1,02	2,07
5470	neg	neg	neg	neg	1	1,07	1,12	1,14	0,99	1,02	1,06	0,99	1,09	1,07	1	1,08
5585	bajo peso	neg	neg	neg	1,45	0,99	1,02	1,17	1,01	1,67	1	1	0,98	1,06	2,22	1,34
5614	neg	pos	pos	neg	1,07	1,05	1,01	1,23	1,12	1,17	1,14	1,09	0,96	1,04	1,38	1,58
5642	neg	pos	pos	neg	1,42	1	0,97	0,94	0,97	1,03	0,98	1,07	0,99	0,97	1,46	1,54
5643	neg	neg	neg	neg	1,18	1,17	0,96	0,99	1,08	1	0,99	1	1,07	1,07	1,04	0,92
5695	neg	pos	neg	neg	1	0,97	1,06	1,15	0,99	0,99	1	0,99	0,98	1,03	1	1,14
6028	bajo peso	pos	pos	Mf	1,28	1,08	1,05	1,11	1,14	1,66	1,11	1,22	1,26	1,13	1	1,51
<b>Total</b>	<b>3/24</b>	<b>13/24</b>	<b>6/24</b>	<b>4/24</b>	<b>8/24</b>	<b>6/24</b>	<b>2/24</b>	<b>9/24</b>	<b>2/24</b>	<b>11/24</b>	<b>7/24</b>	<b>5/24</b>	<b>2/24</b>	<b>3/24</b>	<b>5/24</b>	<b>11/24</b>

**Tabla 16. Respuesta celular, humoral y resultados bacteriológicos de los animales del establecimiento de la localidad de Lincoln (n=24).** Un total de 17 animales presentaron respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN frente a alguno de los antígenos estudiados. Se muestran en gris los índices de estimulación (IDO450nm) considerados como positivos de acuerdo a los puntos de corte estimados para cada antígeno. Se resaltan en verde, la respuesta de  $\gamma$ IFN positiva estimulando tanto con PPDa como con los antígenos recombinantes; en rosa, los animales que respondieron exclusivamente a la estimulación de los antígenos recombinantes; en amarillo, los animales que respondieron exclusivamente al PPDa. Se muestran los resultados de la prueba de ELISA-PPA que emplea el antígeno de *M. avium* subsp. *avium* (Allied), la tinción de Ziehl-Neelsen en materia fecal (MF) y el cultivo de materia fecal y leche. Se registró la sintomatología de cada animal en el momento de la realización del muestreo.

Se pudo observar que de los 45 animales, 36 presentaron respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN cuando fueron estimulados con algún antígeno. De estos animales, 17 (47 %), respondieron tanto a PPDa como a los antígenos recombinantes, 8 (22 %) respondieron únicamente a PPDa y 11 (30,5 %) respondieron exclusivamente a los antígenos recombinantes.

Con el objetivo de evaluar la respuesta celular por estimulación con los antígenos recombinantes en el contexto de las pruebas diagnósticas serológicas y bacteriológicas, se clasificaron a los animales de acuerdo a las categorías que se presentan en la Tabla 17.

Ensayo	$\gamma$ IFN-PPDa +	$\gamma$ IFN-PPDa -
ELISA-PPA +; Bacteriología +	M15r-887r-1244r-1415-1532r-1552*- 4545r-4746*r-5614-5642r-6028r	4816r
ELISA-PPA +; Bacteriología -	M698r-4708r-4930r-5129	1322-1330r-4961r-4961r 1293r-210-5695
ELISA-PPA -; Bacteriología +	5125r-5369r-1286r	-
ELISA-PPA -; Bacteriología -	1226r-1481r-1524-1559-1706- 204r-4991	M315-1152r-1403r-1502r-1538r-4955 - 5140-5161r-5209-5470-5585r 5643-

**Tabla 17. Clasificación de los animales en distintas categorías diagnósticas.** Se indican en rojo los animales que presentaron alguna sintomatología evidente al momento del muestreo. Con “\*” se indica aquellos animales que presentaron IDO450nm>10 por estimulación con PPDa. La letra “r” junto al número de animal, indica que el animal también presentó respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con los antígenos recombinantes.

De acuerdo a la respuesta inmunológica que predomina en los animales (Th1 o Th2), los animales que se encuentran en una etapa inicial de infección, con respuesta celular específica positiva y respuesta humoral baja o sin seroconversión, son 10 (eliminadores y no eliminadores). Los antígenos recombinantes reconocieron a 6/10 de los animales. En el otro extremo del espectro, se encuentran los animales con una baja o nula respuesta Th1 y con una respuesta Th2 aumentada. Estos animales estarían representados por los grupos que contienen a los animales (ELISA +;  $\gamma$ IFN PPDa -; Bacteriología +/-). Dentro de esta categoría hay 8 animales, de los cuales 5/8 animales respondieron a los antígenos recombinantes.

A partir de la categorización de los animales en base a los resultados obtenidos por todas las metodologías pudimos observar que aquellos animales que presentaron los valores superiores a 10 (IDO450nm) de respuesta  $\gamma$ IFN, marcados con \* (1552 y 4746), son animales que también tienen respuesta humoral detectable por la prueba de ELISA, y uno de ellos (1552) presentaba sintomatología clínica. Se puede constatar que dentro del mismo grupo (ELISA+; Bacteriología+;  $\gamma$ IFN PPDa +), hay dos animales que también presentaron sintomatología (6028, 1244). De los animales de este grupo, 8/11 respondieron a los antígenos recombinantes. Hay cuatro animales

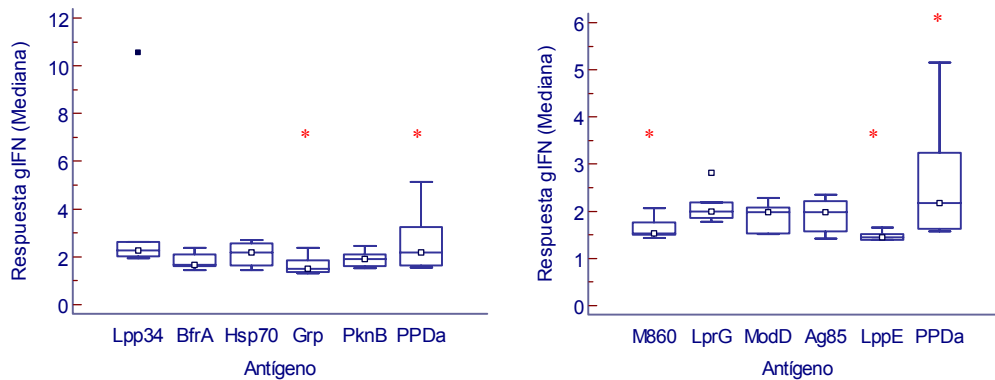
dentro del grupo (ELISA+; Bacteriología-;  $\gamma$ IFN PPDa +), de los cuales 3/4 animales respondieron a los antígenos recombinantes.

La categoría más abundante, con 12 animales, está representada por aquellos animales que no respondieron a ninguna de las pruebas convencionales. Dentro de esta categoría pueden encontrarse tanto animales no infectados pero expuestos, como animales infectados pero que aún no han desarrollado una respuesta consistente, o animales de estadios muy avanzados con una baja respuesta inmunológica. Sin embargo 6 de ellos respondieron a los antígenos recombinantes, 4 de los cuales tenían asociada algún tipo de sintomatología como pérdida de peso o diarrea.

De los resultados expresados en la Tabla 17 podemos concluir que de los animales muestreados, muchos de ellos presentaron una respuesta inmune correspondiente a estadios intermedios de la enfermedad, ya que presentan tanto respuesta Th1 como Th2. Se pudo observar también que algunos animales de estadios avanzados, no pierden la respuesta Th1, presentando altos niveles de estimulación. La detección de animales por los ensayos de estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN con los antígenos recombinantes y que no son detectados cuando se estimula con PPDa, podría deberse a la respuesta del animal hacia un antígeno poco representado en PPDa. Por este motivo, es probable que los antígenos recombinantes tengan una mayor sensibilidad que PPDa para detectar estos casos. La confirmación bacteriológica de estos animales, así como la realización de futuros ensayos celulares y humorales contribuirán a confirmar estos resultados.

#### **Niveles de estimulación antigénica de los antígenos recombinantes respecto de PPDa.**

Se analizaron comparativamente los valores de estimulación alcanzados por los animales que presentaron respuesta positiva de liberación de  $\gamma$ IFN frente a todos los antígenos evaluados. Cuando se estimuló la liberación de  $\gamma$ IFN con los antígenos Lpp34, BfrA, Hsp70, PknB, LprG, ModD y el Ag85A, los animales presentaron niveles de estimulación (IDO450nn mediana) que no difieren significativamente de los alcanzados por la estimulación con PPDa. Sin embargo, cuando se estimuló la liberación de  $\gamma$ IFN con los antígenos GrpE, Map860 y LppE, estos presentaron una respuesta significativamente menor que con PPDa (Figura 75). Estos resultados demostraron que con el empleo de un único antígeno como estimulante en la prueba celular de liberación de  $\gamma$ IFN es posible alcanzar los mismos niveles de estimulación que con la mezcla antigénica PPDa. Por otro lado, pese a que GrpE y Map860 no son estimuladores potentes de la respuesta celular, permiten un reconocimiento sensible de los animales infectados con paratuberculosis.



**Figura 75. Capacidad estimulante de los antígenos respecto de PPDa: gráfico de Box & Whisker.** Se evaluó la respuesta de estimulación (IDO450nm mediana) para cada antígeno en los animales que resultaron positivos con todos ellos (N=6). El gráfico muestra el valor de la mediana, y dentro de las cajas se encuentran el 50 % central de la distribución de datos. Las barras indican los valores mínimos y máximos de estimulación obtenidos con cada antígeno. Se realizó un análisis comparativo empleando la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Los únicos antígenos que mostraron diferencias significativas respecto de la respuesta obtenida con PPDa fueron GrpE (P=0,030) y Map860 (P=0,031), LppE (P= 0,031).

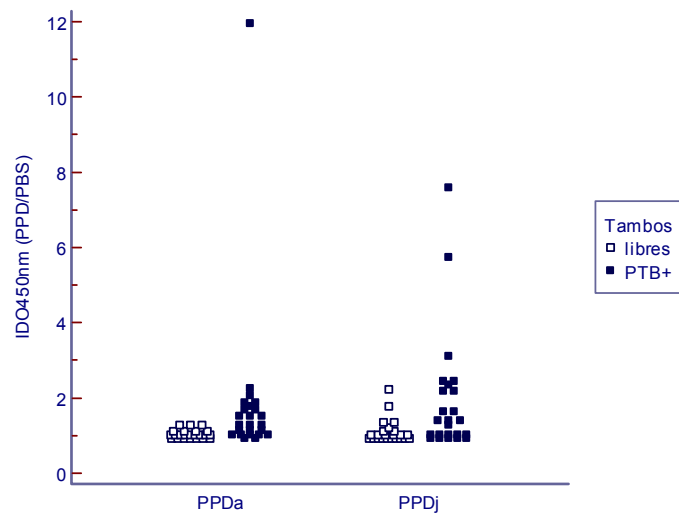
#### 4.3.3.6. Evaluación de la respuesta frente a combinaciones de antígenos recombinantes (Mix).

Se conoce que la respuesta a las proteínas de las micobacterias es heterogénea en los animales infectados (Collins *et al.*, 2005). Debido a esta heterogeneidad, se decidió implementar la utilización de mezclas antigénicas recombinantes. De esta manera, se buscó incrementar la diversidad de epítopes reconocibles por las células T de los animales, con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba. Estas combinaciones antigénicas fueron denominadas MixA y MixB, cuya composición se detalla en la Tabla 13. Los antígenos fueron seleccionados en base a la frecuencia de respuesta de los animales pertenecientes a los rodeos con PTB, resultantes del análisis preliminar del primer tambo muestreado (Suipacha). Para conservar la sensibilidad obtenida con el antígeno empleado en forma individual, se utilizaron las mismas concentraciones finales (10 µg/mL). De esta manera, se buscó también lograr un efecto aditivo de los antígenos, en caso de que los animales reconozcan epítopes en distintas proteínas, traduciéndose en niveles de DO<sub>450nm</sub> superiores a las obtenidas con los antígenos empleados individualmente.



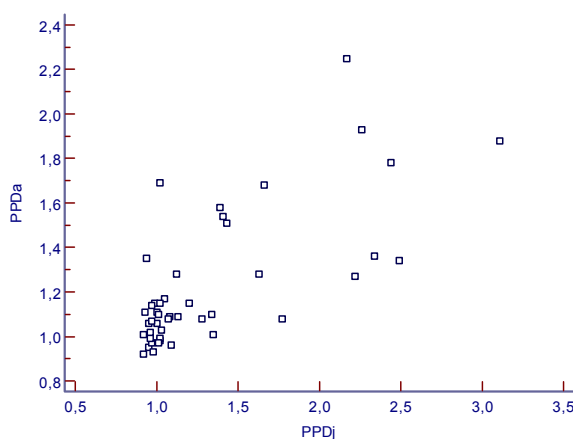
#### 4.3.3.7. Análisis de la respuesta celular frente a una PPD producida a partir de un aislamiento de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

El análisis de rutina, involucra la utilización de los antígenos comercializados por la firma Biocor, CSL; a partir de los cuales, se validó el ensayo Bovigam. El antígeno PPDa, está formulado a partir de la cepa de referencia *M. avium* D4. Este antígeno, se implementa como antígeno de referencia para la evaluación de la respuesta celular, en tuberculosis bovina (junto a PPDb como antígeno específico), y como antígeno específico en el diagnóstico de paratuberculosis. Se incorporó al análisis, la evaluación de la respuesta celular de los animales, frente a una PPD, elaborada a partir de un cultivo de la cepa salvaje Malele-505 de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se procesaron 250 mL de un cultivo en fase exponencial tardía, de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos y se empleó la misma concentración de proteínas de las distintas PPDs para estimular en el ensayo de evaluación de respuesta celular. Se analizaron 48 animales, 24 animales de un tambo libre y 24 de un tambo con paratuberculosis.



**Figura 77. Respuesta de  $\gamma$ IFN por estimulación con PPDa y PPDj-IB.** Se muestra el gráfico de distribución de valores (*dot plot*) de la liberación de  $\gamma$ IFN (IDO450nm) en los animales de los tambos positivos y negativos. Los valores obtenidos entre los tambos PTB+ y sanos fueron comparados por el *test* no paramétrico Kruskal-Wallis (para muestras no pareadas). La respuesta de los animales de los tambos infectados o libres de la enfermedad frente a PPDa y PPDj-IB, se analizó por el *test* no paramétrico de Wilcoxon (para muestras pareadas).

La PPDj-IB, al igual que PPDa, estimula de manera diferencial la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN en los distintos tambos, mostrando niveles de estimulación superiores en los tambos infectados ( $P = 0,0085$ ) (Figura 77). Del análisis comparativo en los animales del tambo con PTB se observó que, pese a que con PPDa hay un animal con un valor de estimulación de 11,95, no hubo diferencias significativas en los niveles de estimulación de estos animales frente a PPDj-IB y PPDa ( $P = 0,6482$ ). Sin embargo, la respuesta individual de algunos de los animales, fue distinta frente a las PPDs. Este comportamiento, pudo ser consecuencia de una composición diferencial de las mezclas. Sin embargo, la respuesta de la mayoría de los animales mantuvo la misma relación frente a los antígenos, mostrando una correlación positiva (Figura 77). Se pudo observar también que la respuesta celular evaluada en los animales de los tambos sanos frente a las distintas PPDs no difirió significativamente ( $P = 0,9854$ ).



**Figura 77. Análisis de correlación entre la respuesta celular estimulando con PPDj-IB y PPDa.** Cada cuadrado representa una muestra, se indican los valores de IDO450nm empleando los dos Derivados Proteicos Purificados. El valor  $\rho$  calculado mediante la correlación por *ranking* de Spearman fue  $r=0,702$  ( $P<0,0001$ ).

La Tabla 18 muestra los valores de estimulación obtenidos en cada animal por estimulación con las distintas PPDs. En base a los animales identificados como positivos con cada antígeno, se calcularon las sensibilidades y especificidades relativas, de acuerdo a los valores de la Tabla 19 .

Pese a esta sensibilidad del 75 % y especificidad del 86 % respecto de PPDa, se observó que los animales 204 y 5369 tuvieron una estimulación con PPDa y PPDb de la misma magnitud, sin embargo, en estos animales la respuesta de estimulación con PPDj-IB fue mayor. Los animales detectados únicamente por estimulación con PPDj-IB, presentaron respuesta celular frente a otros antígenos recombinante (5161, 5175, 5585), respuesta humoral (5175) y sintomatología compatible con paratuberculosis como diarrea (5161) y pérdida de peso (5585). Por este motivo, son considerados infectados con MPTB y respondieron a la estimulación por PPDa. La implementación

de la PPD preparada a partir de un aislamiento de campo de MPTB, permitió identificar a algunos animales paratuberculosos que no fueron reactivos a la estimulación por PPDa y en otros casos permitió una respuesta diferencial respecto de los valores obtenidos por estimulación con PPDb.

Tambo con paratuberculosis				Tambos Libres			
animal	PPDa(Biocor)	PPDj-IB	PPDb (Biocor)	animal	PPDa (Biocor)	PPDj-IB	PPDb (Biocor)
204	1,88	3,11	1,76	1	1,05	1,05	1,04
210	1,1	1,01	1,05	2	1,08	1,77	1,01
4545	1,93	2,26	1,25	3	0,98	1,02	1
4708	1,68	1,66	1,31	4	1,15	1,2	1,06
4746	11,95	5,73	1,54	5	1,03	0,98	0,96
4816	1,15	0,99	0,98	6	1,09	1,08	1,09
4930	1,78	2,44	1,49	7	0,99	1,06	0,99
4955	1,07	1,01	0,98	8	0,97	1,01	0,99
4961	1,15	1,02	1,08	500	1,17	1,05	1,11
4991	1,69	1,02	1,08	511	1,06	1	1,07
5125	2,25	2,17	1,74	521	1,03	1,03	1,02
5129	1,06	1,09	0,98	524	1,28	1,12	1,18
5140	1,02	0,96	1,9	536	0,97	1,07	1,09
5161	1,36	2,34	1,37	551	1,01	1,02	0,98
5175	1,28	1,63	1,14	557	1,11	1	1,1
5209	1,08	1,07	1,07	583	1,1	1,34	1
5369	2,07	7,6	2,06	588	1,27	2,22	1,09
5470	1,08	1,28	0,97	593	0,99	1,02	1
5585	1,34	2,49	1,73	600	1,01	1,35	1,09
5614	1,58	1,39	1,2	614	1,09	1,13	1,11
5642	1,54	1,41	1,16	A1	1,28	0	1,08
5643	1	1,02	1,08	A2	2,47	0,95	1,26
5695	1,14	0,97	1,12	550/40	1,35	1,04	1,1
6028	1,51	1,43	1,37	604/10	1,06	1,05	1,04
n= 24	11/24	12/24	4/24	n=24	1/24	2/24	0/24

**Tabla 18. Valores de estimulación obtenidos empleando los Derivados Proteicos Purificados PPDa, PPDb (Biocor) y PPDj-IB.** Se obtuvo un índice de concordancia  $\kappa = 0,62$  entre las pruebas basadas en PPDa y PPDj-IB. Se indican en gris, los resultados positivos en las dos pruebas, en amarillo los resultados positivos en solo una prueba. En verde, los valores de estimulación con PPDb de la misma magnitud o superiores a los obtenidos con PPDa.

$\gamma$ IFN- PPDj	$\gamma$ IFN- PPDa		Total
	+	-	
+	9	5	14
-	3	31	34
Total	12	36	48

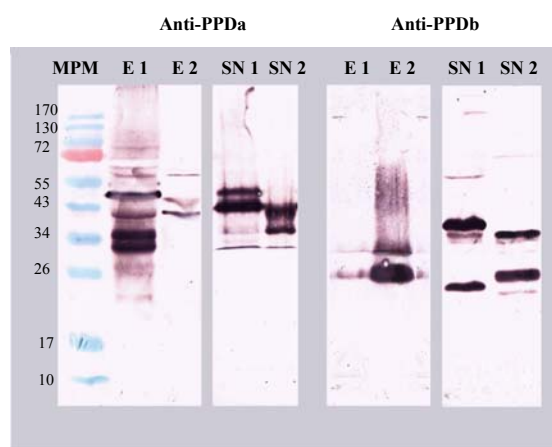
**Tabla 19. Evaluación de la Sensibilidad y Especificidad relativa a PPDa.** La sensibilidad se estimó como  $[9/(9+3)] \times 100 = 75\%$ , y la especificidad como  $[31/(31+5)] = 86\%$  de acuerdo a Jacobson *et al.*, 1998.



#### **4.4. Análisis de los Derivados Proteicos Purificados (PPDs)**

El análisis de rutina de la respuesta celular tanto *in vivo* como *ex vivo* involucra la utilización de mezclas no definidas conocidas como PPDs. Si bien se conoce de la presencia de distintas proteínas liberadas por lisis de la bacteria por calor y de otros componentes celulares como lípidos y polisacáridos, poco se sabe sobre los antígenos predominantes en cada una de ellas. Para estudiar los antígenos dominantes hacia los cuales responden los animales, la abundancia de estos en las distintas PPDs y la presencia de antígenos diferenciales o compartidos entre PPDa y PPDb comerciales empleadas en el diagnóstico, se utilizaron dos estrategias experimentales. La primera, consistió en evaluar la respuesta humoral generada en ratones luego de ser inmunizados con las mezclas antigénicas. La segunda, se basó en el reconocimiento directo de los antígenos en las PPDs por *Western blot*, empleando anticuerpos específicos contra determinadas proteínas o componentes celulares.

**4.4.1. Estudio comparativo de la respuesta humoral generada contra PPDa y PPDb en ratones BALB/c.** Con el objetivo de evaluar el reconocimiento y representación en las PPDs de los distintos antígenos descriptos previamente en este trabajo, se realizó un ensayo de inmunización en ratones. La respuesta frente a un determinado componente, sería indicador, además de la inmunogenicidad, de la presencia del mismo en la PPD analizada. Con ese fin, Se inocularon por vía intraperitoneal ratones hembra BALB/c con 25 µg de PPDa y PPDb (Biocor) y adyuvante incompleto de Freund (Sigma), bajo el esquema de inmunización descripto en Materiales y Métodos. Los ratones fueron sangrados por la vena caudal ventral y se utilizaron los sueros para identificar las proteínas del sobrenadante de cultivo y del extracto celular por *Western blot* (Figura 78).

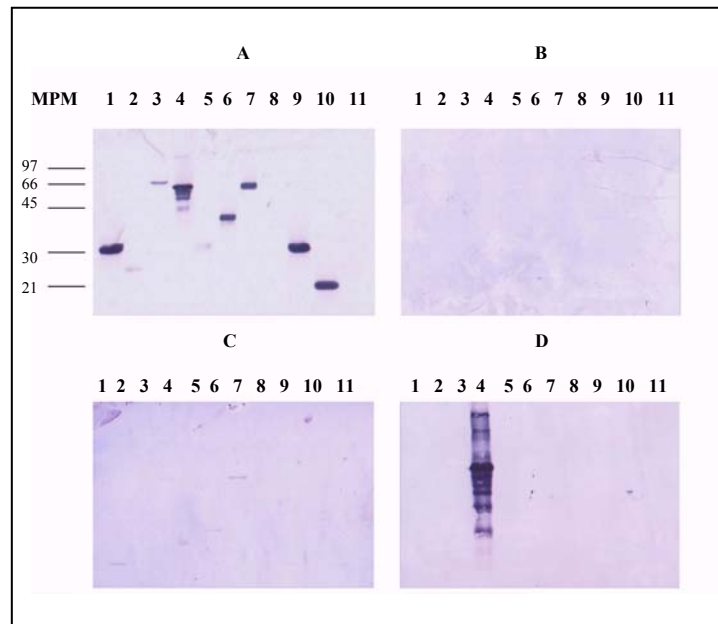


**Figura 78. Reconocimiento de proteínas de MPTB y *M. bovis* AN5 por los sueros de ratones inmunizados con los antígenos PPDa y PPDb (Biocor, CSL).** Se separaron electroforéticamente 10  $\mu$ g de proteínas del extracto celular (E) y del sobrenadante de cultivo (SN) de las distintas micobacterias, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y fueron evaluadas por *Western blot* utilizando los sueros de ratones inmunizados con las mezclas antigénicas respectivas. En la parte superior del gráfico, se indican los sueros con los que fueron evaluadas las membranas, se emplearon los sueros murinos en una dilución 1/50 y el anticuerpo secundario anti-IgG anti-murino conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1/3000. Se indica con números, la especie de origen de las proteínas: 1, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y 2, *M. bovis* AN5.

Se pudo observar que los ratones inmunizados con PPDa, reconocieron con intensidad 4 proteínas de aproximadamente 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa y 30 kDa en el extracto de MPTB (E 1, de la Figura 78), entre éstos, el antígeno de 40 kDa, también sería reconocido en el extracto de proteínas *M. bovis* (E 2). Cuando se estudió el mismo suero anti-PPDa frente a las proteínas del sobrenadante de MPTB (SN 1), estos reconocieron exclusivamente dos proteínas de tamaño próximo a 45 y 50 kDa, presentaron también reacción frente a dos proteínas de menor tamaño en el sobrenadante de *M. bovis* (SN 2). Al realizarse el mismo análisis con el suero anti-PPDb, este reconoció principalmente dos proteínas en el extracto celular de *M. bovis* AN5, una muy abundante que comigra con la proteína de 26 kDa del marcador de peso molecular y otra, con menor intensidad, de alrededor de 30 kDa. Estas mismas proteínas serían reconocidas, aunque mucho más débilmente, en el extracto de proteínas de MPTB. Se reconocieron en el sobrenadante de *M. bovis*, con el mismo antisuero anti-PPDb, dos proteínas, una proteína de aproximadamente 25 kDa y otra, de un tamaño aparente algo mayor (30 kDa). Este antisuero, también reconoció dos proteínas en el sobrenadante de MPTB, aunque difieren levemente en el tamaño. Considerando que la cantidad de proteínas de las micobacterias es igual para los ensayos, se puede concluir que en la PPDa se encuentra una mayor cantidad de proteínas de la membrana celular o del citosol (representados en el extracto celular) con capacidad inmunogénicas en el ratón que en la PPDb. Por otro lado, la respuesta frente a estas proteínas del extracto celular y que están representadas en las PPDs, muestran una respuesta diferencial, ya que el reconocimiento de proteínas de la otra especie es muy bajo o no se detectan.

En cuanto a las proteínas del sobrenadante, el perfil de reconocimiento de proteínas con los dos anti-sueros es también distinto. Este ensayo demostró que la reactividad cruzada, evaluado a partir del reconocimiento de epítopes B, entre las proteínas de *M. bovis* y *M. avium* es más evidente entre las proteínas del sobrenadante que entre las proteínas del extracto celular.

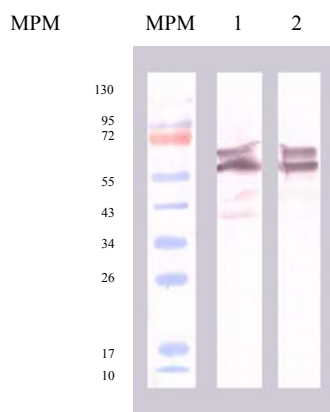
Con el objetivo de conocer si la identidad de estos antígenos presentes en las PPDs y reconocidos por los ratones, se correspondía con algún antígeno estudiado en el presente trabajo, se enfrentó estos sueros, anti-PPDa y anti-PPDb, al panel de proteínas recombinantes disponibles. Se realizó la evaluación por *Western blot* empleando la misma dilución de suero murino y condiciones de incubación del ensayo. Se evaluaron las proteínas Lpp34, BfrA, Hsp 70, ModD, LprG, Map860c, Ag85A, LppJ y LppE. Los resultados se muestran en la Figura 79.



**Figura 79. Análisis de la presencia de distintos antígenos en PPDa y PPDb.** **A.** Proteínas recombinantes en cada membrana contra las que se enfrentan los distintos anti-sueros, detectadas con el anticuerpo anti-Histidina: calle 1, Lpp34; calle 2, BfrA; calle 3, Hsp70; calle 4, ModD; calle 5, LprG; calle 6, Map860c; calle 7, Ag85A; calle 8, MBP (proteína de unión a maltosa, control de Ag85A); calle 9, LppE; calle 10, LppJ y calle 11, sin antígeno. **B.** Pool de sueros control (ratones inmunizados con PBS y adyuvante); **C.** Pool de sueros (1/50) de ratones inmunizados con PPDb. **D.** Pool de sueros (1/50) de ratones inmunizados con PPDa. Se empleó como anticuerpo secundario un anti-IgG anti murino. Todas las proteínas están expresadas en el vector pRSET con excepción de Ag85A, expresada en pMAL. MPM: marcador de peso molecular (Amersham-Biosciences), se indican los tamaños en kDa.

Se pudo observar que el suero anti-PPDa, reconoció de forma intensa, únicamente al antígeno ModD. En consecuencia, puede atribuirse el reconocimiento inicial de este suero en el sobrenadante de MPTB y *M. bovis*, a la presencia de anticuerpos anti-ModD. En consecuencia, este antígeno se encuentra presente en la mezcla antigénica PPDa. El suero anti-PPDb mostró el reconocimiento en forma muy ténue de distintos antígenos como BfrA, ModD, Map860c, Ag85A. Dado que, el reconocimiento de los antígenos por parte de los sueros en el extracto de las

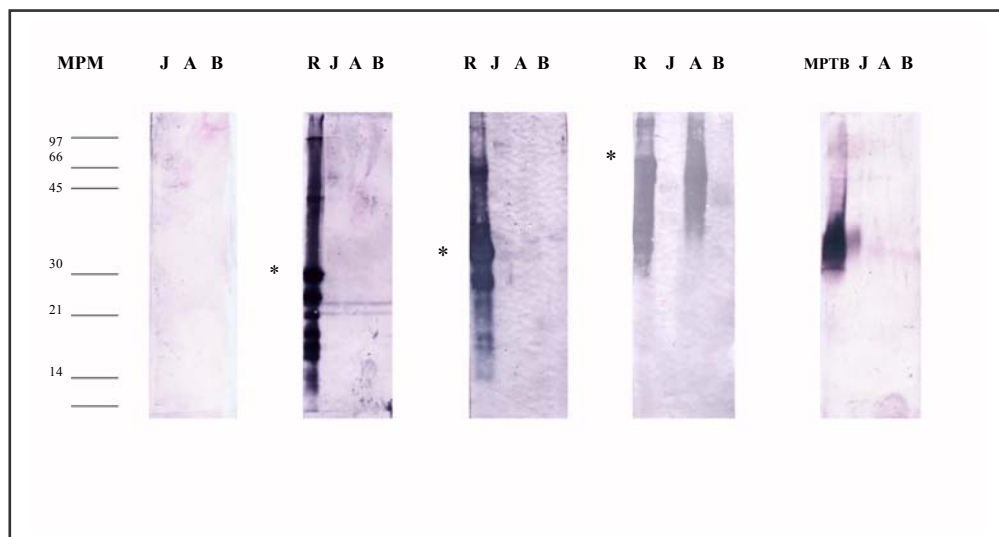
micobacterias, resultó con una señal importante, el reconocimiento débil en este ensayo por parte del suero anti-PPDb, puede deberse a algún tipo de reacción cruzada. Esto lo demuestra el reconocimiento del antígeno Map860c, cuyo gen sólo se encuentra en MPTB. Posteriormente, para demostrar que la proteína reconocida en el sobrenadante de MPTB por el anti suero anti-PPDa es ModD, se evaluó el reconocimiento del antígeno ModD en la fracción de proteínas del sobrenadante de cultivo de MPTB empleando el antisuero anti-ModD recombinante y el antisuero anti-PPDa. La Figura 80 muestra que los dos sueros hiperinmunes fueron capaces de identificar a la proteína en la fracción, confirmando la identidad de la señal generada con el suero anti-PPDa.



**Figura 80. Evaluación del antígeno ModD en las proteínas del sobrenadante de MPTB.** Se evaluó el reconocimiento del antígeno ModD por *Western blot*. Calle 1, suero anti-PPDa; calle 2, suero anti-ModD. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños en kDa.

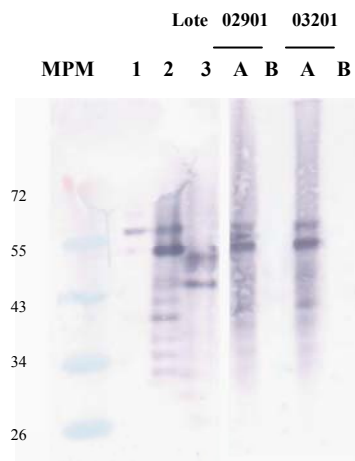
**4.4.2. Evaluación directa de antígenos presentes en las PPDs a partir de antisueros anti-antígeno específicos.** Con el objetivo de identificar y analizar comparativamente la presencia de los distintos antígenos en las distintas PPDs, se emplearon anticuerpos policlonales específicos para su detección por *Western blot*. Los antisueros anti-DnaK (Hsp70), BfrA, Lpp34, ModD, MAP860 y LprG de *M. avium* subsp *paratuberculosis*, fueron producidos en ratones BALB/c. Los antisueros dirigidos a LAM y al complejo del Ag85 de *M. tuberculosis* H37Rv fueron producidos en conejo, (gentilmente cedidos por el Dr. P. Brennan, Universidad de Colorado). Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, 10 µg de cada PPD y una alícuota del antígeno control (1µg). En este ensayo, se utilizaron las mezclas antigénicas PPDa y PPDb (Biocor, CSL) y la mezcla PPDj-IB, obtenida en nuestro laboratorio. Para poder visualizar las proteínas, usualmente degradadas como consecuencia del protocolo de preparación de las PPDs (ver Introducción y Materiales y Métodos) y presentes en bajas concentraciones, se emplearon tiempos de incubación con los anticuerpos de 3 h, así como un tiempo de revelado de la actividad de la fosfatasa alcalina de 10 min. Del análisis del reconocimiento de antígenos en las mezclas antigénicas por *immunoblot*, se pudo observar que,

no hubo un reconocimiento diferencial de los antígenos LprG, Hsp70 y Ag85. Contrariamente, el antisuero dirigido al antígeno ModD, reconoció de manera intensa al antígeno en la mezcla PPDa (Biocor), respecto de PPDb y PPDj. La Figura 81, muestra los ensayos representativos para algunos antígenos. Previamente hemos demostrado la existencia de reactividad cruzada entre las distintas proteínas ModD homólogas, permitiendo un reconocimiento sensible de la proteína de *M. bovis*, en consecuencia el reconocimiento diferencial del antígeno en PPDa, se debe a una concentración mayor de la proteína ModD en la mezcla antigénica respectiva. El antisuero anti-LAM mostró que la PPDj-IB se encuentra enriquecida en este componente, comparativamente a PPDa y PPDb (Figura 814). Los ensayos para detectar los antígenos BfrA, y Lpp34, evidenciaron una señal de reconocimiento muy baja, esto indicó un bajo contenido de estos antígenos en las muestras.



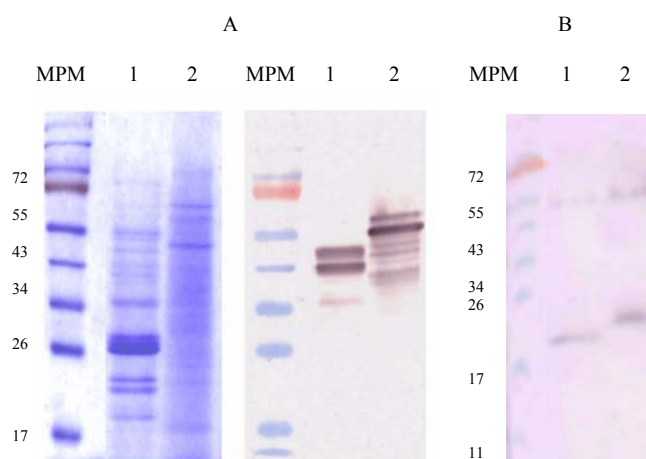
**Figura 81. Detección de antígenos en PPDa, PPDb y PPDj por Western blot.** Se sembraron 10  $\mu\text{g}$  de cada PPD por calle en un gel de poliacrilamida de 15 cm. Se detectaron los antígenos con una dilución 1/100 de cada antisuero específico. Se utilizó como anticuerpo secundario el monoclonal anti-IgG anti-ratón, o anti-IgG anti-conejo (Sigma), según el anticuerpo primario utilizado. Se muestran en la figura los resultados obtenidos para LprG, Lpp34, ModD y LAM. Las membranas fueron sobre-expuestas durante el revelado, para poder detectar la presencia de los posibles fragmentos de cada antígeno en las mezclas antigénicas. Se indican en la parte superior de la figura con la letra J, PPDj; con A, PPDa; con B, PPDb; R, proteína recombinante; MPTB, extracto de proteínas, (abundante en LAM) de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; MPM: marcador de peso molecular (Amerham-BioSciences), se indican los tamaños en kDa. Se indica con “\*” el tamaño de la proteína recombinante.

Para evaluar las posibles variaciones en los distintos lotes de producción, se evaluó comparativamente la detección de la proteína ModD en distintas partidas de PPDa y PPDb (Biocor). Previamente se cuantificó el contenido de proteínas en cada muestra por el método de BCA (Pierce). Adicionalmente, se evaluó en el mismo ensayo la capacidad del antisuero generado contra el ortólogo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, de detectar a la proteína de *M. bovis* y *M. avium* subsp. *avium*. En la Figura 82 se muestra que el antisuero anti-ModD fue capaz de detectar a las proteínas ortólogas en los sobrendantes de cultivo de las micobacterias, sin embargo, sólo detectó la presencia de este antígeno en PPDa y no en PPDb. Este reconocimiento fue independiente del lote analizado.



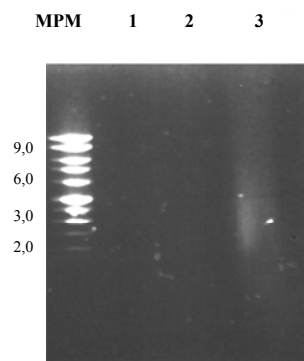
**Figura 82. Evaluación de la presencia de ModD en distintos lotes de producción de PPDa (Biocor, CSL).** Se evaluaron dos fracciones distintas de PPDs bovina y aviar de la misma empresa. Se evaluó la presencia de la proteína ModD por *Western blot* utilizando un antisuero anti-ModD (MPTB). Se estudió en el mismo ensayo el reconocimiento de los homólogos de *M. avium* y *M. bovis* por el mismo suero hiperinmune. Calle 1, proteínas de SN de *M. avium* subsp. *avium*; calle 2, proteínas de SN de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; calle 3, proteínas de SN de *M. bovis*. Se indica con la letra A, PPDa y con B, PPDb; fueron sembrados 10 µg de proteínas totales de cada PPD por cada pocillo. En la parte superior se indican los números de producción de cada lote analizado. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños de algunas proteínas representativas en kDa.

Con el objetivo de evaluar si esta composición diferencial para el antígeno ModD en las PPDa y PPDb es independiente del laboratorio de origen, se evaluaron fracciones de PPDs provenientes del SENASA, producidas para la prueba de tuberculinización de animales. Primeramente, para evaluar los niveles de la proteína presentes en los cultivos empleados para la preparación de las PPDs, se obtuvieron las proteínas a partir de 50 mL del sobrenadante de cultivo de las cepas de referencia *M. bovis* AN5 y *M. avium* subsp. *avium* D4, previamente filtrado. Se evaluó el perfil de expresión proteica por tinción con azul de *Coomassie* y se detectó la proteína ModD con el antisuero murino. Posteriormente, se utilizó para el ensayo de *Western blot*, la misma concentración de cada PPD y el mismo antisuero utilizado para la detección de las PPDs de Biocor CSL. Se obtuvo una intensidad de señal semejante, tanto en los sobrenadantes de cultivo como en las PPDs. Se pudo observar también, una importante degradación de las proteínas, ya que se detectó una banda, (Figura 83) de aproximadamente la mitad del tamaño de la proteína sin tratamiento térmico. Teniendo en cuenta que las cepas que se utilizan en los distintos laboratorios para la preparación de las PPDs son las cepas de referencia *M. avium* subsp. *avium* D4 y *M. bovis* AN5, se puede concluir que distintas variables como el número de repique de la cepa, las condiciones de cultivo empleadas, o el método de preparación de los Derivados Proteicos Purificados, pueden explicar las diferencias en la composición observadas.



**Figura 83. Evaluación de la presencia de ModD en PPDs de SENASA.** Se evaluaron con el mismo antisuero empleado para el análisis por *W. blot* de las PPDs de Biocor CSL, las PPDs producidas por el DILACOT (SENASA) y las proteínas del SN de los cultivos empleados para su producción. Los cultivos fueron incubados a 37 °C por 6 semanas en medio Dorset-Henley. **A.** Proteínas del sobrenadant. Calle 1, *M. bovis* AN5; calle 2, *M. avium* subsp. *avium* D4. **B.** PPDs. Calle 1, PPDa; calle 2, PPDb. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños de referencia en kDa.

Como se indicó en Introducción (sección 1.4.1), otro de los componentes de las PPDs son los ácidos nucleicos. Con el objetivo de evaluar las posibles diferencias en el contenido de ADN en las distintas PPDs, se analizó su presencia por electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio. Se pudo observar, luego de integrar la imagen con el programa de adquisición de imágenes *Fotodyne* que el contenido de ADN no era homogéneo (Figura 84). Mientras que en las PPDs comerciales no se observó señal fluorescente, en la PPDj-IB (INTA), se observó la presencia de ácidos nucleicos que mostraron un patrón típico de degradación.

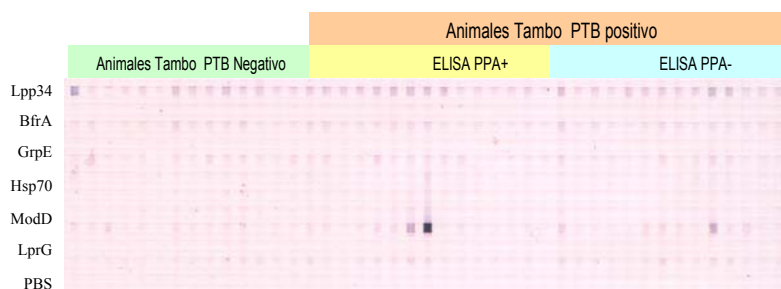


**Figura 84. Evaluación del contenido de ADN de las distintas PPDs.** Se sembraron 12  $\mu$ L de cada PPD en un gel de agarosa 0,8 % y se realizó una electroforesis para la visualización de los ácidos nucleicos por tinción con bromuro de etidio. Calle 1, PPDa (Biocor, CSL); calle 2, PPDb (Biocor, CSL); calle 3, PPDj-IB (INTA). MPM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega), se indican los tamaños de los fragmentos en kb.



#### 4.5. Selección “a campo” de un antígeno adecuado para evaluar la respuesta humoral.

Para conocer el comportamiento de la respuesta humoral de los animales frente a los antígenos, se evaluó en un ensayo multiantigénico (MAPIA) los sueros de distintos animales. Se adhirieron los antígenos Lpp34, BfrA, GrpE, Hsp70, ModD, LprG a una membrana PVDF y se evaluaron los sueros diluídos 1/100 (Figura 85).



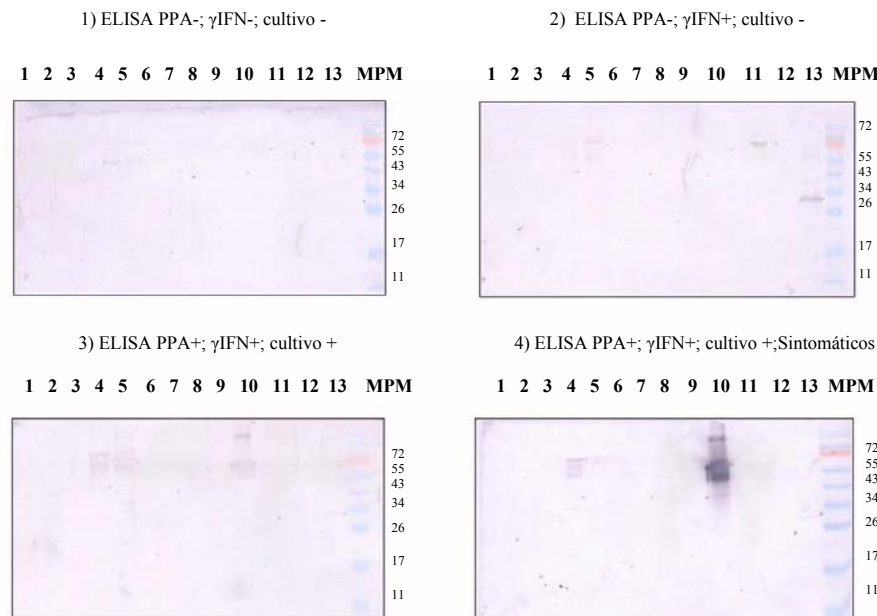
**Figura 85. MAPIA de los animales pertenecientes a los distintos Tambos.** Se adhirieron a la membrana los distintos antígenos resuspendidos en PBS (50-100 µg/ mL). Se realizó el inmunoblot incubando con los sueros bovino (1/100) por 1h a temperatura ambiente. Se utilizó como anticuerpo secundario, el monoclonal anti-IgG anti- bovino (Sigma) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Se evaluaron los sueros de los animales de los establecimientos de Suipacha, Lincoln e INTA.

Se pudo observar claramente el reconocimiento inespecífico de Lpp34, BfrA, GrpE y LprG. Se observó poca señal con Hsp70, mientras que tres animales del tambo PTB positivo reconocieron de forma intensa la proteína ModD. En otro ensayo, se evaluaron los antígenos potenciales PknB, LppE y LppJ, en ningún caso se identificó reconocimiento de los animales hacia las proteínas (no mostrado). Probablemente, exista un reconocimiento débil de los antígenos, que se pierde si existe interacción con algún componente de *E. coli* derivado de la purificación del antígeno. Con el objetivo de identificar los antígenos inmunodominantes, es decir, aquellos antígenos reconocidos por la mayor cantidad de animales y ver si existen diferencias en cuanto al estadio de la infección que presenta el animal, se seleccionaron animales que respondían a las pruebas diagnósticas en forma equivalente y se los agrupó en las siguientes categorías:

- 1) Animales de Tambo PTB positivo: ELISA PPA-;  $\gamma$ IFN-; cultivo -
- 2) Animales de Tambo PTB positivo: ELISA PPA-;  $\gamma$ IFN+; cultivo -
- 3) Animales de Tambo PTB positivo: ELISA PPA+;  $\gamma$ IFN+; cultivo +
- 4) Animales de Tambo PTB positivo: ELISA PPA+;  $\gamma$ IFN+; cultivo +; con sintomatología aguda de la enfermedad (emaciación, diarrea crónica).

Una vez seleccionados los animales representativos, cada grupo estuvo constituido por 10 animales, con excepción del grupo 5, que contó con tres animales, se formaron *pooles* con los sueros, y a partir de estos, se realizó una dilución 1/100 en TBS-leche. De esta manera se buscó

enriquecer la mezcla en aquellos anticuerpos que reconozcan un determinado epítipo en la mayoría de los animales, los de menor frecuencia de reconocimiento, se perderán en la dilución. Este suero representativo de cada grupo de animales, fue evaluado por *W. blot* frente al panel de antígenos. Se sembró la misma cantidad de cada antígeno recombinante en los distintos geles, se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE, se electrotrasfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se constató la presencia de proteínas por tinción con rojo *Ponceau*, previo a la realización del *Western blot*. Se procesaron las membranas en paralelo, para así someterlas a las mismas condiciones. Se reveló la reacción de la fosfatasa alcalina por un tiempo de 3 min en todas las membranas.



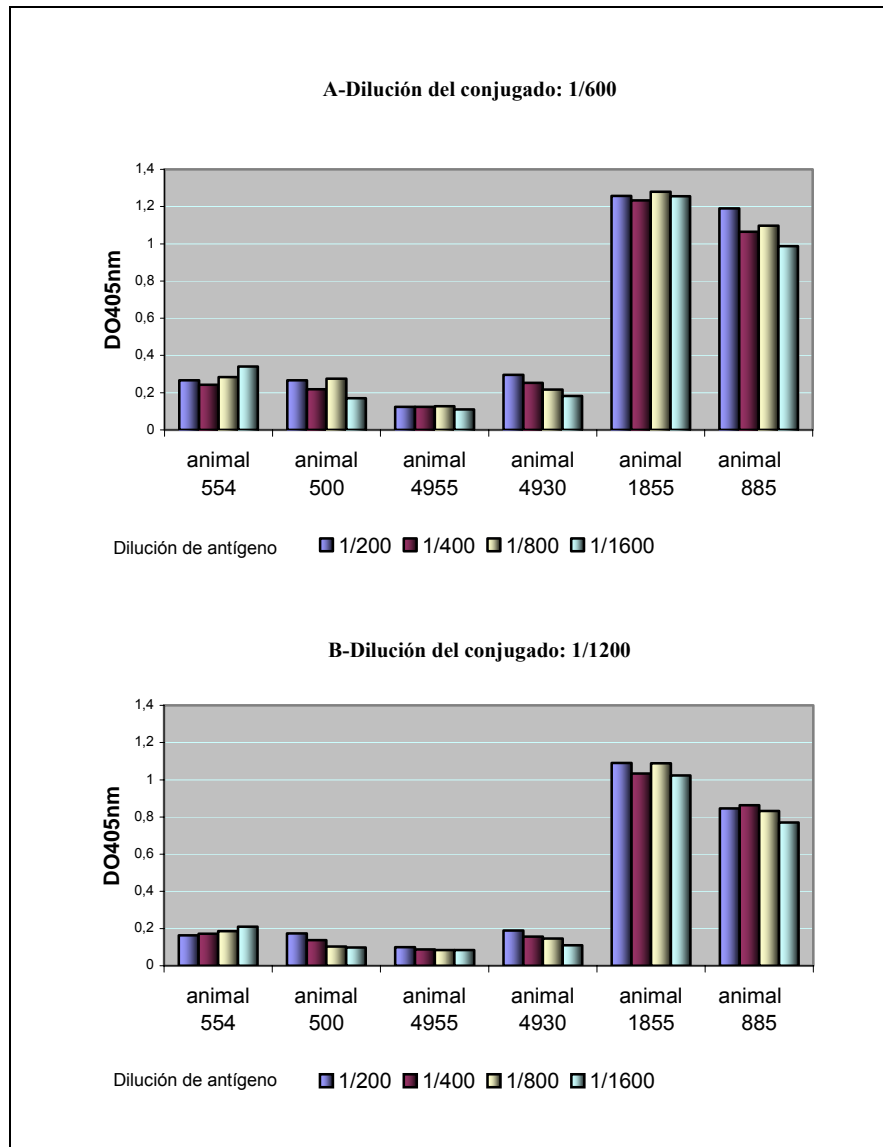
**Figura 86. Análisis de antígenos inmunodominantes por análisis de *pools* de sueros de animales con distinto resultado a las pruebas diagnósticas de cultivo, ELISA PPA y  $\gamma$ IFN PPDa.** Calle 1, LppE; calle 2, LppJ; calle 3, MPB83; calle 4; MBP; calle 5, Ag85A; calle 6, AceAa; calle 7, PknB; calle 8, GrpE; calle 9, LprG; calle 10, ModD; calle 11, Hsp70; calle 12, BfrA; calle 13, Lpp34. MPM: marcador de peso molecular (Fermentas), se indican los tamaños en kDa.

Se pudo observar que los únicos antígenos que fueron reconocidos por los sueros de los animales pertenecientes a cada clasificación fueron Lpp34, Hsp70 y ModD (Figura 86). Hubo señal positiva en las membranas en la calle correspondiente al antígeno 85A en todos los grupos, sin embargo, esta señal también se observó en la calle donde se sembró la proteína MBP como control, ya que el antígeno 85A está fusionado a esta proteína, por lo que la señal puede deberse al fuerte reconocimiento de los animales hacia proteínas de *E. coli* como lo es MBP. El reconocimiento del antígeno Lpp34 se dió con mayor intensidad en los animales del grupo 2), respecto de los grupos 3) y 4), que representarían animales en estadios más avanzados de la enfermedad. Los animales del grupo 2), también fueron los únicos que reconocieron al antígeno Hsp70. El antígeno ModD fue

reconocido en animales eliminadores que se corresponden a los animales con serología y respuesta celular positiva, grupo 3) y, más intensamente en el grupo 4), donde están agrupados los animales con sintomatología clínica notoria. Estos resultados indicarían que podría existir una cinética de la respuesta humoral diferencial durante el transcurso de la enfermedad frente a cada antígeno.

#### **ELISA anti-ModD recombinante**

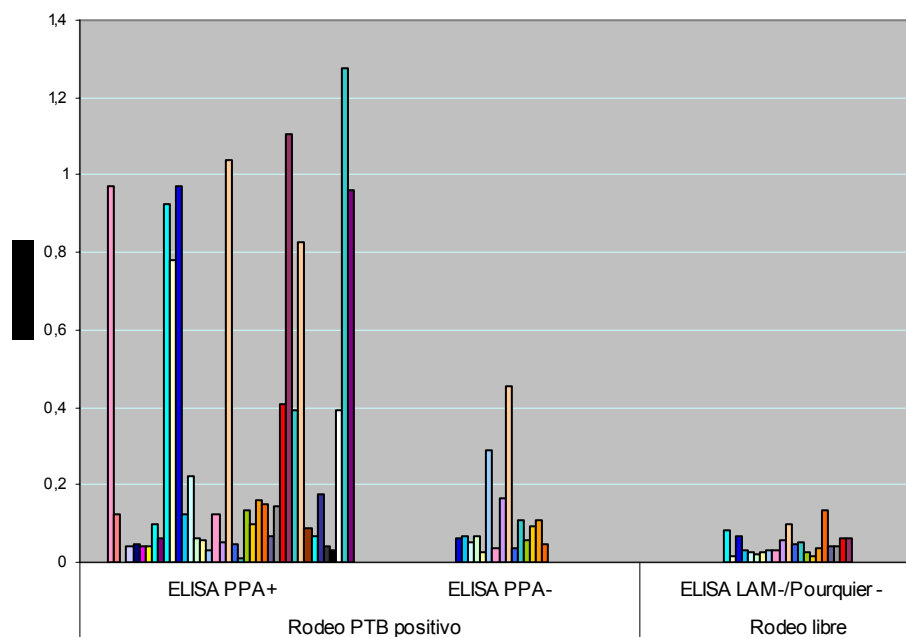
Los resultados previos del análisis de la respuesta humoral por *immunoblotting*, demostraron que ModD es un antígeno fuertemente reconocido al que los animales responden en los estadios asociados con estadios más avanzados. Con el objetivo evaluar el reconocimiento de esta proteína de una manera sensible y rápida en animales infectados, se evaluaron las condiciones para detectar los anticuerpos anti-ModD mediante el ensayo serológico de ELISA. Se utilizó una fracción de 0,7 mg/mL de la proteína recombinante expresada en *E. coli* BL21 y purificada por cromatografía de afinidad de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Se realizaron diluciones seriadas del antígeno en base 2 en buffer carbonato/bicarbonato y se sensibilizaron las placas con 100 µL de cada dilución. También se evaluaron distintas diluciones del anticuerpo conjugado a peroxidasa. Fueron analizados 4 animales provenientes de un rodeo con paratuberculosis, dos de los cuales (1855 y 885 resultaron ELISA-PPA positivos y además presentaron un buen reconocimiento de la proteína por *Western blot*, mientras que los animales 4930 y 4955 son ELISA-PPA positivo y negativo, respectivamente. Adicionalmente, se emplearon dos sueros de animales ELISA-PPA negativos, provenientes de un rodeo libre de la enfermedad. Se consideraron como óptimas las diluciones 1/1600 del antígeno y 1/1200 del conjugado ya que permitieron diferenciar los sueros positivos que presentaron respuesta de los negativos con una menor DO450nm para estos últimos, como se muestra en la (Figura 87).



**Figura 87. Puesta a punto del ELISA:ModD recombinante.** Fueron seleccionados 6 sueros para los ensayos preliminares: dos animales de rodeos libres de paratuberculosis (554 y 500) y 4 animales de un rodeo positivo a la enfermedad (4955, 4930, 1855 y 885). Se evaluaron los sueros en una dilución 1/200 frente a distintas concentraciones de antígeno (1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600) y dos concentraciones del conjugado. Fue seleccionada la condición mostrada en B, que emplea una dilución del conjugado 1/1200 con la dilución máxima de antígeno evaluada, 1/1600. Se muestra la densidad óptica del ensayo evaluada a 405 nm (DO405nm).

#### 4.5.1. Evaluación por ELISA del reconocimiento de ModD por bovinos paratuberculosos

Se clasificaron los sueros de acuerdo a su resultado por la prueba de ELISA que emplea el antígeno protoplasmático PPA. Se emplearon los sueros provenientes de los “rodeos problema” y se incluyeron adicionalmente animales provenientes de rodeos libres de la enfermedad de un país con baja incidencia (Bélgica), que fueron evaluados serológicamente por dos ELISAs distintos, uno comercial y otro basado en el antígeno LAM. Las muestras se evaluaron por duplicado. Los resultados se muestran en la (Figura 88). Se puede observar que los valores de DO405nm mayores a 0,3, se encuentran asociados a los animales ELISA-PPA positivos de los rodeos problema. Si bien los animales de estos rodeos ELISA-PPA negativos presentaron valores menores, existen dos animales con valores de DO405nm cercano a 0,3 y de 0,45. Como a estos animales, por pertenecer a un rodeo infectado, están expuestos a la bacteria, no se puede descartar una posible infección de los mismos, y que estos no sean detectados por el ELISA-PPA. En contraste, los animales no expuestos provenientes de los rodeos libres (ELISAs LAM y Pourquier negativos) mostraron las densidades ópticas más bajas.

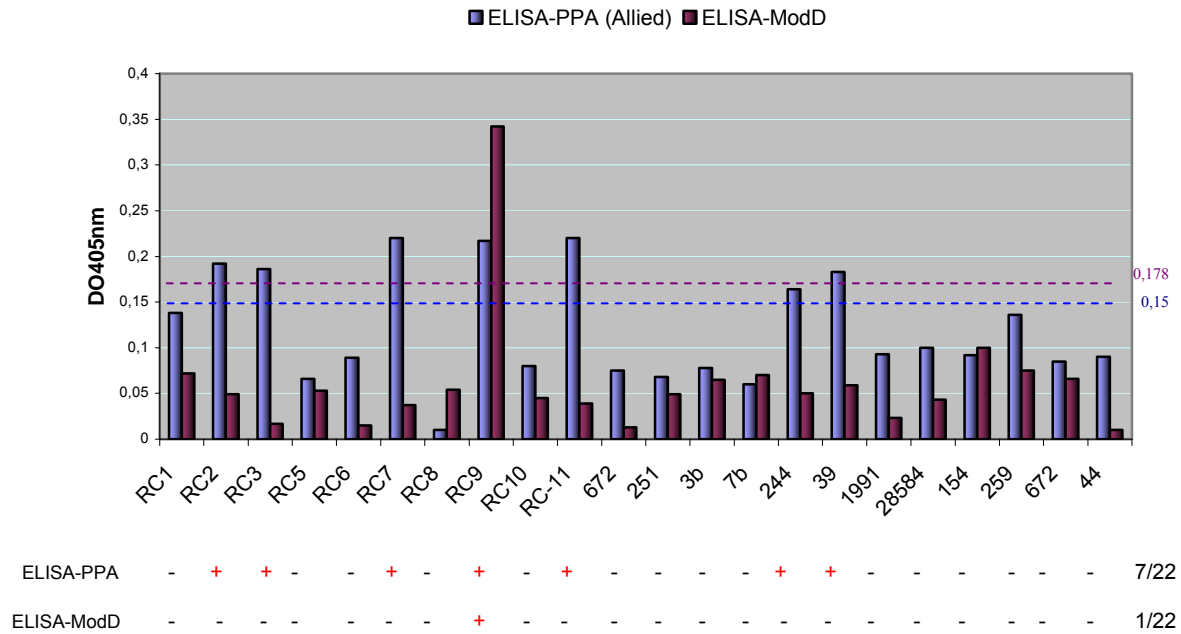


**Figura 88. ELISA:ModD recombinante.** Se evaluó el reconocimiento del antígeno por animales provenientes de rodeos infectados por la bacteria (rodeos PTB positivo) y de rodeos libres. Se muestra en el primer grupo el resultado comparativamente a los ELISA de referencia empleando como antígeno PPA. El rodeo libre fue analizado por dos ELISAs, uno basado en el antígeno LAM. Se muestran las densidades ópticas promedio de los duplicados a los cuales se les sustrajo el valor de absorbancia del blanco.

Se estimó un punto de corte para el ELISA recombinante por el método *gaussiano*, determinado como el promedio de DO405 de la prueba (0,071) en animales de rodeos libres de la enfermedad (n=30), sumados dos desvíos estándar (0,054). Este valor resultó 0,178. Los valores iguales o superiores a una DO405 de 0,178, fueron considerados positivos para esta prueba. En base a este punto de corte, se calculó el índice de concordancia  $\kappa$  entre las dos pruebas, en un total de 44 animales analizados, siendo este menor a 0,5. Este resultado está influenciado por el hecho de que no todos los animales presentan respuesta humoral contra el antígeno ModD, de 37 animales ELISA-PPA positivos, sólo el 37 % resultó positivo al ELISA recombinante.

#### **4.5.2. Evaluación por ELISA del reconocimiento de ModD por bovinos tuberculosos**

Se evaluaron comparativamente, el comportamiento de la prueba de ELISA-ModD recombinante con el ELISA que emplea el antígeno protoplasmático PPA (Allied), en rodeos infectados con *Mycobacterium bovis*. La primer tropa de animales, RC1 a RC11, son animales con diagnóstico de tuberculosis, confirmado por el aislamiento de la bacteria a partir de las lesiones encontradas luego del análisis patológico, como por las pruebas de tuberculinización con PPD<sub>b</sub>, y ensayo de la liberación de  $\gamma$ IFN por estimulación con los antígenos de referencia (PPD<sub>b</sub> y PPD<sub>a</sub>; Biocor, CSL). En la segunda tropa, los animales presentaron reacción positiva a la prueba de tuberculina. Los resultados se muestran en la figura. Todos los animales provenían de Río Cuarto (Córdoba). Dada la historia clínica del rodeo y la respuesta frente a la estimulación de la sangre entera con el antígeno PPD<sub>a</sub>, este rodeo se consideró libre de paratuberculosis bovina.



**Figura 88. Evaluación serológica comparativa por ELISA-PPA y ELISA-ModD en una tropa de animales con tuberculosis bovina.** Se muestran los promedios de  $DO_{405}$  obtenidos con la prueba de ELISA que emplea la mezcla antigénica PPA (Allied) y el ELISA con la proteína recombinante ModD. La prueba de ELISA-PPA emplea los sueros bovinos diluidos 1/400, preabsorbidos con *M. phlei* toda la noche. Este ensayo utiliza tiempos de incubación de 1 h, a una temperatura de 4 °C. Para la prueba de ELISA-ModD, se utilizó una dilución de los sueros, 1/200 sin preabsorber. Se indican los puntos de corte estimados para cada prueba, en color azul, para el ELISA-PPA (0,15); en color rojo, para el ELISA-ModD recombinante (0,178). En la parte inferior del gráfico, se indica el resultado de las pruebas para cada animal.

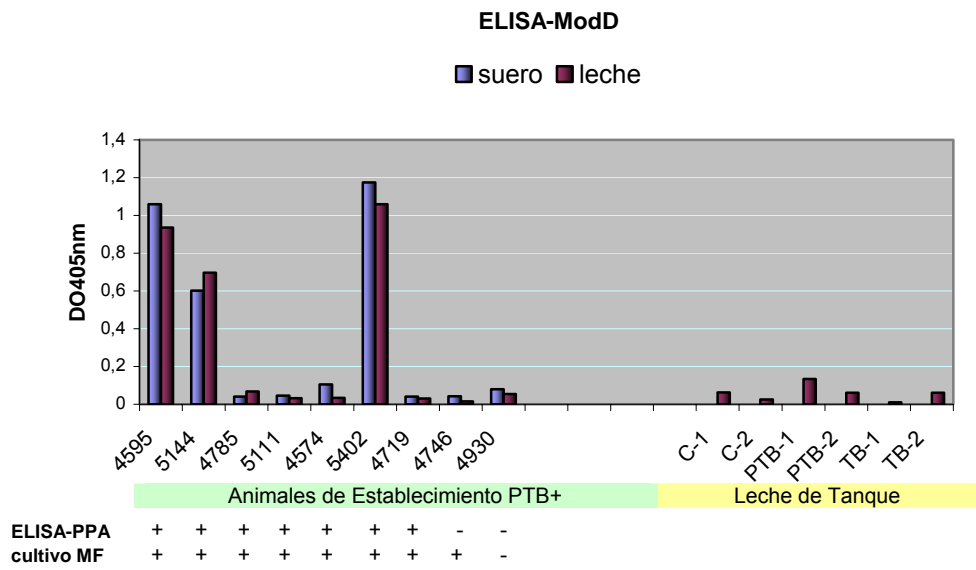
Se pudo observar que el ELISA con el antígeno de referencia PPA, detectó 7/22 animales, mientras que el ELISA que emplea el antígeno ModD, 1/22 (Figura 88). La presencia de antígenos conservados en las dos bacterias, representados en la mezcla antigénica, contribuirían a la detección de estos animales.

#### 4.5.3. Detección de IgG anti-ModD en leche.

Los bovinos transfieren una gran cantidad de inmunoglobulinas IgG desde la circulación sanguínea, atravesando la barrera mamaria, hacia el calostro. Como la obtención de leche en un tambo es una práctica de rutina y requiere de menor complejidad, sería beneficioso contar con una prueba que pueda evaluar directa o indirectamente la presencia de la micobacteria en el rodeo, reemplazando la toma de muestra de sangre o materia fecal por una muestra de leche. Con ese objetivo, se evaluó por la prueba de ELISA-ModD recombinante, la detección de IgG totales específicas en un grupo de animales, en los que se disponía de muestras de suero y leche (n=11). Se evaluó primeramente en estos animales la correlación entre la presencia de anticuerpos anti-ModD en sangre y leche. Se utilizaron los sueros diluidos 1/100 y las muestras de leche, previamente centrifugadas para separar los lípidos, diluída 1/2. La Figura 89, la respuesta de los animales fue semejante con los dos tipos de muestra. Dada la respuesta obtenida con algunos de los animales de los rodeos positivos, que presentaron valores de DO405nm cercanos a 1, (Figura 882 y Figura 893), se evaluó la detección de IgG anti-ModD en la leche del tanque de ordeño. Se evaluaron distintos establecimientos: dos establecimientos libres de tuberculosis y de paratuberculosis, dos establecimientos con paratuberculosis (con diagnóstico serológico y cultivo de la bacteria) y dos establecimientos con tuberculosis bovina, uno confirmado por tuberculinización de los animales y los dos por amplificación por PCR de la secuencia IS6110 en leche de tanque (Tesis doctoral, Martín Zumárraga).

Del análisis de la leche de tanque de los establecimientos, se pudo concluir que las condiciones empleadas no permitieron obtener valores de DO405 diferenciales entre los establecimientos infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se utilizó la muestra sin diluir, con idénticos resultados. Probablemente la técnica tenga validez solamente en aquellos establecimientos con una alta frecuencia de animales que respondan al antígeno, de lo contrario, los anticuerpos IgG anti-Mod se diluyen y la sensibilidad de la técnica no sería suficiente para detectarlos.





**Figura 89. Detección de IgG en leche.** Se evaluó por ELISA la presencia de inmunoglobulinas IgG anti ModD en suero de leche y de sangre de bovinos (n=9), y en suero de leche de tanque de distintos establecimientos. En el eje de la abscisa se indican los números de los animales y la categoría de los establecimientos: C, control; PTB, establecimiento con paratuberculosis; TB, establecimiento con tuberculosis bovina. En la parte inferior del gráfico se muestran los ensayos diagnósticos complementarios de cada animal. PPA: antígeno protoplasmático (Allied); MF: materia fecal; s: “sospechoso”, título de ELISA por debajo, pero cercano al punto de corte de la prueba.

## 5. DISCUSION

A poco más de un siglo de la primera descripción de la paratuberculosis bovina por Johne y Frothingham en 1895, se implementan en la actualidad un conjunto de metodologías tanto diagnósticas como de manejo en la producción animal con el objetivo de controlar la enfermedad. Sin embargo, esto se logra parcialmente ya que la erradicación de la misma es difícil una vez que se instala en los rodeos (Sharp *et al.*, 1997).

La identificación y caracterización de antígenos son esenciales para el entendimiento de los mecanismos patogénicos de las micobacterias y de la respuesta inmune contra ellas, permitiendo el desarrollo o mejoramiento de vacunas y de herramientas diagnósticas.

El tiempo de duplicación extremadamente lento y la patogenicidad de las micobacterias de interés para la Salud Pública y animal ha retrasado por años la identificación de antígenos y factores de virulencia. Las especies micobacterianas *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* fueron las bacterias pioneras en el estudio de la identificación de antígenos.

### **El sistema $\lambda$ -Zap como herramienta para la identificación de antígenos de MPTB.**

Los avances en las técnicas de biología molecular y en las técnicas inmunológicas contribuyeron de manera importante al conocimiento de distintos antígenos y de la respuesta inmune humoral y celular por ellos inducida. Dentro de estos avances, el clonado y expresión de ADN micobacteriano usando el sistema  $\lambda$ gt11, representó un logro significativo en el área (Young *et al.*, 1985a). Desde entonces, se ha implementado exitosamente el análisis inmunológico de genotecas de expresión para la detección de antígenos micobacterianos (Bigi *et al.*, 1997; El-Zaatari *et al.*, 1997; Triccas *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 2005).

En el presente trabajo, construimos una genoteca de expresión de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* por digestión parcial del genoma micobacteriano con la enzima *Eae* I y clonado de los fragmentos genómicos obtenidos en el vector de expresión  $\lambda$ -Zap II. El tamaño promedio de inserto de los clones analizado fue de 1,08 kb. En una primera etapa, se realizó el análisis de la genoteca con sueros bovinos. Estos sueros provenían de animales, muchos de los cuales, con paratuberculosis subclínica, con serología positiva por la prueba de ELISA que emplea el antígeno protoplasmático PPA de *M. avium subsp. avium* (ELISA-PPA) y con diagnóstico confirmatorio por cultivo de la bacteria. Con este sistema de evaluación, se detectó sólo un clon reactivo, que codificó para la subunidad de la bacterioferritina A.

Podemos atribuir esta baja eficiencia en la selección de clones a distintos factores. El principal, está dado por la dificultad de obtener sueros con títulos altos de anticuerpos contra la bacteria, capaces de reconocer proteínas en un *immunoblot*. Esto se puso en evidencia al analizar por *Western blot* los sueros con resultado positivo a la prueba de ELISA-PPA, donde se observó que muchos de ellos, reconocían un bajo número de proteínas o el reconocimiento era nulo. Esta observación se sustenta con el hecho que la prueba de *Western blot* tiene una sensibilidad menor que la prueba de ELISA.

Además, en la prueba de ELISA de rutina se emplean mezclas antigénicas y no antígenos individuales. Estas mezclas contienen, además de proteínas de la bacteria, distintos componentes no proteicos, constituyentes importantes de la pared micobacteriana, como el LAM, y que son moléculas altamente antigénicas. Por otro lado, dada la dificultad para la eliminación de los anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con proteínas de *E. coli*, no fue posible trabajar con diluciones menores de los sueros sin incrementar el *background* de los mismos. Por otro lado, la absorción exhaustiva de anticuerpos inespecíficos podría eliminar a los anticuerpos dirigidos contra proteínas de la micobacteria con epítopes relacionados, disminuyendo la sensibilidad del ensayo.

Durante muchas rondas de inmunoanálisis, se detectaron placas reactivas luego del revelado de las membranas, sin embargo, el repique de UFPs para su amplificación y re-selección, no permitió recuperar las UFP reactivas. Estos clones, que denominamos “fantasmas”, pudieron ser consecuencia de una incorrecta identificación de la placa de lisis inicial. Debido a la escasa detección de UFP reactivas con los sueros bovinos, se decidió emplear una estrategia alternativa para la evaluación de la genoteca de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Además de la utilización del suero del hospedador infectado (Bigi *et al.*, 1997), distintas estrategias han demostrado ser de utilidad en el análisis de genotecas de expresión, como los anticuerpos monoclonales (Young *et al.*, 1985) o el empleo de sueros hiperinmunes de animales de laboratorio (Young *et al.*, 1985; Thole *et al.*, 1985). Pese a que no se ha encontrado aún un modelo adecuado de infección de paratuberculosis, contrariamente a lo que ocurre con otras micobacterias, la estrategia de inoculación de animales de experimentación para la obtención de sueros capaces de seleccionar clones inmunoreactivos, ha sido implementada con éxito en trabajos previos (El-Zaatari *et al.*, 1997). En este trabajo, la utilización de sueros murinos hiperinmunes mostró una mayor eficiencia en cuanto al número de clones reactivos detectados. La identificación de antígenos de MPTB descritos con anterioridad, como Hsp 70, demostró que esta estrategia constituye un buen método de selección de clones. Sin embargo, hay que considerar que los ratones pueden desarrollar un repertorio de anticuerpos diferente al de los rumiantes con una infección micobacteriana activa. La estrategia de utilizar sueros de animales naturalmente infectados tiene la ventaja que es posible detectar moléculas inmunogénicas expresadas *in vivo* que pueden estar ausentes o ser expresadas en bajos niveles cuando la bacteria es cultivada *in vitro*. Una estrategia alternativa interesante es el sondeo de las genotecas con el suero del hospedador natural infectado experimentalmente. Sin embargo, como consecuencia del largo período que va desde la infección hasta la aparición de sintomatología y seroconversión del animal, estos trabajos pueden llevar un largo tiempo, además de requerir de condiciones de bioseguridad. Alternativamente, se podría considerar la inmunización de bovinos con las proteínas de la bacteria para la obtención del suero hiperinmune, que si bien en este caso no se reproduce el evento de infección natural, es una aproximación interesante a considerar, la cual no ha sido evaluada hasta el momento.

La utilización del vector  $\lambda$ -Zap permite la expresión de proteínas fusionadas a  $\beta$ -galactosidasa (polipéptido de 23 kDa). En este trabajo, detectamos clones que expresaron un tamaño de proteína de fusión menor al esperado según el tamaño del gen identificado por BLAST. La obtención de la secuencia completa del fragmento clonado y su posterior análisis, demostró que en la mayoría de los casos, el gen que se encontraba río abajo de  $\beta$ -gal estaba truncado. Este es el caso de los genes que codifican para las proteínas Hsp70, Bfr y Lpp34, que perdieron parte de una región terminal de la proteína.

Otro hecho llamativo fue la selección de clones (pBL-1, pBL-22) que en un mismo fragmento de ADN contenían genes que en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se localizan distantes. Dado el desconocimiento de la secuencia del genoma de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* al momento de realizado el trabajo, no podía descartarse un ordenamiento de genes distinto en esta bacteria respecto a *M. tuberculosis*. La finalización de la secuencia del genoma de MPTB demostró se trataba de clones “quimera” que surgieron como consecuencia de la ligación de los distintos fragmentos durante la construcción de la genoteca. Se obtuvieron clones que compartían el mismo tamaño de inserto y el mismo tamaño de proteína de fusión. Posteriormente, se confirmó mediante la secuenciación de los insertos, que estos clones eran redundantes. La redundancia de los clones puede ser favorecida por la amplificación de la genoteca previo a su análisis. Sin embargo, en trabajos donde no se realizó el paso de amplificación, también se identificaron clones redundantes. Este fue el caso del antígeno de 65 kDa, que fue identificado en 6/30 clones recombinantes de una genoteca de MPTB sin amplificar, construida en el vector pcDNAII (El-Zaatari *et al.*, 1994). Young *et al.*, (1987), encontraron que 22/29 clones pertenecientes a una genoteca de *M. tuberculosis*, expresaron tres antígenos (65kDa, Hsp70 y el antígeno de 14 kDa). En otro estudio donde se utilizó anticuerpos monoclonales para el inmunoanálisis, los mismos tres antígenos representaron 139/162 clones analizados (Young *et al.*, 1987). Esta alta frecuencia de clones redundantes, es justificada por los autores por la expresión de proteínas sin fusionar. Si las secuencias promotoras del gen heterólogo son reconocidas en *E. coli*, la expresión del ADN recombinante sería independiente de la orientación y marco de lectura del inserto. En nuestro caso, el análisis de la secuencia de los clones inmunoreactivos redundantes indicó que la multiplicidad de clones no era atribuida este evento. Una posibilidad, es que los sueros estén altamente enriquecidos en los anticuerpos que reconocen las proteínas expresadas por los clones. En este trabajo, los clones redundantes codificaban para Hsp70 y Lpp34. Como se trabajó con *pools* de sueros, se puede suponer que estas proteínas son inmunodominantes en el ratón.

### **Identidad de los antígenos seleccionados a partir del análisis de la genoteca $\lambda$ Zap:: *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.**

Las micobacterias patógenas presentan una diversidad compleja de antígenos de variada composición química y función. Stanford y Grange clasificaron en 1978 (Thole *et al.*, 1985) a los antígenos micobacterianos en 4 grupos de acuerdo a su especificidad: (i) antígenos comunes a todas las micobacterias y usualmente también presentes en *Listeria* sp., *Corynebacterium* sp. y *Nocardia* sp.; (ii) antígenos comunes o compartidos entre las micobacterias de crecimiento lento; (iii) antígenos comunes o compartidos entre las micobacterias de crecimiento rápido y (iv) antígenos especie-específicos, ausentes en otras especies. Se ha focalizado la atención en la búsqueda de antígenos secretados y aquellos localizados en la superficie celular, dado que estas proteínas son las que primero interactúan con el sistema inmunológico del hospedador, constituyen los antígenos más relevantes para la inducción de una respuesta inmune protectora (Grandi, 2005).

A partir del inmunoanálisis de la genoteca, pudimos identificar inicialmente distintas proteínas con potencialidad antigénica, entre ellas, dos proteínas de membrana, una conservada en micobacterias (PknB), y la otra especie-específica (Lpp34). Dos chaperonas citosólicas (Hsp70 y GrpE), conservadas en micobacterias, y una subunidad de una proteína relacionada al transporte de hierro en bacterias (BfrA), de localización citoplásmica.

Las distintas líneas de investigación se han volcado recientemente a la búsqueda de antígenos especie-específicos que permitan realizar un diagnóstico sensible y específico. Por este motivo, la detección del clon pBL24, que codifica para una proteína que denominamos Lpp34, resultó en un principio promisorio, ya que presentaba homología únicamente con una región de la secuencia parcial del genoma de *M. avium* subsp. *avium* 104. La detección del gen por PCR e hibridación con sondas, confirmó la presencia del mismo sólo en las micobacterias del complejo *M. avium*. Por análisis comparativo de la secuencia nucleotídica de la región promotora con los promotores micobacterianos descritos en la bibliografía, se identificaron dos posibles promotores y un sitio potencial de unión al ribosoma (RBS; GGAAGGGAG). Dada la localización del mismo, descartamos el codón GTG propuesto con la anotación del genoma de la bacteria y proponemos un ATG que se localiza 10 codones río arriba. La secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen indicó que la proteína tiene una masa molecular estimada de 20,8 kDa. Sin embargo, existe una discrepancia entre el tamaño esperado y el obtenido experimentalmente, tanto en la forma recombinante de la proteína como en la proteína nativa expresada en la bacteria, detectada por *Western blot* (PM=34 kDa). La secuenciación del gen y la deducción de la secuencia primaria indicó que la proteína tiene un contenido de prolina importante (11,3 %). Otros autores postularon que un alto contenido de prolina modifica el comportamiento electroforético, retardando la migración de la proteína por SDS-PAGE (Romain *et al.*, 1993; Thole *et al.*, 1990). Por lo tanto, el peso molecular de la proteína que se obtuvo cuando se la evaluó por *Western blot* puede ser consecuencia del alto contenido de prolina. Los análisis por *immunoblot* empleando el suero

hiperinmune anti-Lpp34, mostraron el reconocimiento de proteínas en *M. phlei* y *E. coli*. Dada la ausencia del gen en estas especies, podemos atribuir este reconocimiento a la reactividad de este suero anti-Lpp34 hacia otras proteínas. Esto podría deberse a la presencia de epítopes comunes en las especies *M. phlei* y *E. coli* y explicaría el amplio reconocimiento que mostraron los animales frente a esta proteína. Podemos especular que la presencia de estas bacterias en el ambiente (Eaton *et al.*, 1995; Falkinham, 2002), o en la flora intestinal de los animales o como agentes causales de enteritis durante el transcurso de su vida, contribuye al amplio reconocimiento de la proteína por los animales. Esta posibilidad fue corroborada con la absorción de los sueros, tanto con un extracto de proteínas de *E. coli* como con *M. phlei*, que puso en evidencia un reconocimiento diferencial entre un grupo de animales infectados y sanos por la técnica de ELISA. Esto indicaría que la proteína posee epítopes B específicos e inespecíficos. La localización de estos epítopes mediante estudios de péptidos sintéticos serían de utilidad diagnóstica. Por el ensayo de particionamiento de fases, demostramos que Lpp34 es una proteína asociada a la membrana. El análisis de la secuencia primaria mostró que la misma tiene el consenso de acilación (PS0013) descrito en PROSITE. La lipidación amino terminal es una modificación postraduccional que permite a la proteína anclarse a la envoltura celular (von Heijne *et al.*, 1989). El consenso presente en Lpp34 es similar al encontrado en el antígeno de 38 kDa de *M. tuberculosis*, pero que difiere en la posición -3 al aminoácido cisteína, que es el residuo acilado, donde hay una sustitución del aminoácido alanina por valina. El análisis *in silico* de las lipoproteínas caracterizadas bioquímicamente en un grupo de bacterias gram positivas, permitió la optimización del consenso del *lipo-box* (Sutcliffe y Harrington, 2002). La identificación de este consenso, permite la predicción de lipoproteínas por bioinformática con mayor certeza. El consenso de lipidación presente en Lpp34 es representativo de este patrón alternativo. Sin embargo, es necesaria la demostración experimental de la lipidación, a partir del marcado metabólico o la inhibición de la señal peptidasa II. Cumplimentar con análisis estructurales y funcionales en torno a esta proteína, contribuirá a dilucidar el rol de la misma.

Se sabe que la enfermedad de Johne se presenta con rasgos clínicos, patológicos y epidemiológicos diferenciales en bovinos y ovinos. Se ha reportado previamente en otras micobacterias como *M. bovis* y *M. tuberculosis*, la existencia de deleciones que involucran numerosos genes o genes puntuales, permitiendo la diferenciación entre especies y entre distintas cepas (Marmiesse *et al.*, 2004). Los estudios epidemiológicos en MPTB basados en RFLP-*IS900*, demostraron que los casos de paratuberculosis en bovinos y ovejas, son causados por distintos grupos identificados como cepas C (aislamientos bovinos) y S (aislamientos ovinos) (Collins *et al.*, 1990b). La escasa, caracterización de las diferencias a nivel genético entre las cepas ovinas y bovinas de MPTB, justificaron la evaluación de la presencia de este gen hipotético en distintos aislamientos. Se evaluó la presencia del gen por hibridación con sonda en distintos aislamientos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* incluyéndose aislamientos de origen bovino y de un mouflon (*Ovis musimon*) encontrándose el gen presente en todos los casos estudiados. Recientemente, estudios genómicos

comparativos entre las cepas S y C por análisis de restricción y microarreglos de ADN, mostraron la presencia de 3 deleciones en las cepas S. La denominada Delección 1 que comprende las bases 1625179-1633227, incluye los genes MAP1484c a MAP1491 (Marsh *et al.*, 2005). Esta región es vecina al gen MAP1473, que codifica a Lpp34 y podemos decir que se encuentra próxima al inicio de la delección.

Otro de los antígenos identificados en esta genoteca fue la bacterioferritina A. Como se mencionó anteriormente, fue el único antígeno que se identificó a partir del análisis con sueros de bovinos paratuberculosos. Las bacterioferritinas tienen un rol fundamental en la disponibilidad de hierro en la bacteria. Mientras que la micobactina forma parte del almacenamiento a corto plazo de hierro en la envoltura celular de las micobacterias, las bacterioferritinas, se encuentran en el citoplasma y participan del almacenamiento intracelular (Cole *et al.*, 2005). Las bacterioferritinas se encuentran descritas en muchas bacterias, incluidas las micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* subsp. *silvaticum* (Inglis *et al.*, 1994; Pessolani *et al.*, 1994). Difieren de las ferritinas animales en que tienen entre 8 y 12 grupos hemo unidos entre dos polipéptidos, constituyendo complejos de 24 subunidades. Cada subunidad tiene alrededor de 18 kDa. Dentro del espacio esférico que genera esta estructura, se encuentran unidos hasta 4.000 átomos de hierro como óxido férrico cristalino. La primera descripción de una bacterioferritina micobacteriana fue realizada por Brooks *et al.*, en 1991 y derivó de la caracterización de un antígeno inmunodominante de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, denominado Antígeno D, pero en ese trabajo no se describe aún la secuencia del gen. La primera descripción de los genes de bacterioferritina fue realizada en 1994 por Pessolani *et al.*, que secuenció el gen de *M. leprae*, y en el mismo año, Inglis *et al.*, dió a conocer la secuencia del gen de *M. avium* subsp. *silvaticum*. El trabajo que describe la bacterioferritina en *M. leprae*, también describe la presencia de homólogos del gen en otras micobacterias como *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum*. En 1998, con la publicación de la secuencia de *M. tuberculosis*, se conoció la presencia de dos bacterioferritinas: BfrA, de 18 kDa y codificada en el gen Rv1876, y BfrB, de 20 kDa y codificada en el gen Rv3841. En nuestro trabajo, describimos la detección de un clon cuya secuencia se correspondió con la del gen que codifica para la subunidad A de la bacterioferritina, que corresponde al antígeno D descrito anteriormente. La secuencia fue clonada, expresada exitosamente en pRSET y purificada por columna de afinidad. El desarrollo de antisueros específicos dirigidos contra BfrA permitió la detección de las proteínas homólogas en otras micobacterias, demostrando la existencia de epítopes compartidos entre ellas. A partir de los análisis de identidad con la totalidad de la secuencia primaria de BfrA de MPTB con los homólogos micobacterianos de secuencia conocida, pudimos observar una alta conservación de los aminoácidos a lo largo de toda la secuencia, compartiendo una identidad del 88 % con los homólogos del complejo *M. tuberculosis* y del 87 % con las micobacterias saprófitas. Sin embargo, el análisis de la respuesta inmune contra este antígeno por la técnica de *immunoblotting*, mostró que

el antígeno fue reconocido por los animales infectados con PTB, mientras que no fue reconocido por los animales infectados con *M. bovis* como tampoco por los animales sanos. Los anticuerpos anti-BfrA (MPTB), fueron capaces de reconocer a la proteína homóloga en el complejo *M. tuberculosis*, en consecuencia, la ausencia de reconocimiento hacia BfrA por parte de los animales infectados con *M. bovis*, podría explicarse por una respuesta inmunológica diferencial de acuerdo a la patología micobacteriana evaluada. La respuesta celular contra este antígeno resultó poco específica, dada la estimulación que presentaron una parte de los animales sanos frente a este antígeno. La presencia de epítopes T compartidos en bacterias de distintos géneros junto a la alta homología con los miembros del género *Mycobacterium*, podrían contribuir a este reconocimiento inespecífico.

Otra proteína identificada en este trabajo y seleccionada para su evaluación, fue la Hsp70. Las Hsps (*heat-shock proteins*) son una familia de proteínas evolutivamente conservadas, expresadas tanto en organismos eucariotas como en procariotas. Pese a que, originalmente se las identificó por su expresión aumentada durante el estrés térmico, otros tipos de condiciones como hipoxia, deprivación de nutrientes, radicales libres del oxígeno, infección viral y fagocitosis, también pueden inducir su expresión. La expresión de estas proteínas es inducida durante el estrés celular que ocurre, tanto en el hospedador como en el patógeno, en respuesta a la infección e inflamación (Koets *et al.*, 2006). La alteración en el ambiente celular del patógeno durante la infección, resulta en un incremento de la expresión de las Hsps. En condiciones normales estas proteínas pueden constituir el 5 % de la masa de proteínas intracelulares totales, sin embargo, bajo condiciones de estrés, pueden alcanzar hasta el 15 % del contenido celular de proteínas (Qamra *et al.*, 2005). Las Hsps derivadas del patógeno, constituyen un grupo importante de antígenos inmunodominantes que inducen una fuerte respuesta inmune, tanto humoral como celular en el hospedador. Las proteínas de estrés térmico han sido previamente descritas como antigénicas para otras infecciones micobacterianas como tuberculosis y lepra, tal es el caso Hsp70 y Hsp65 (Young, *et al.* 1988, Davenport *et al.*, 1992). Estas proteínas, funcionan como chaperoninas intracelulares durante la modificación postraduccional de las proteínas. Stewart *et al.*, (2001) sostienen que al mismo tiempo, estas moléculas podrían constituir una señal de alerta de la presencia del patógeno para el hospedador. Por otro lado, en el organismo eucariota, las Hsp ejercen un rol protector a través de su rol en el plegamiento de proteínas celulares, interceptando el desplegamiento incontrolado de proteínas en las células bajo condiciones de *estrés* (Qamra *et al.*, 2005). De esta manera las Hsps, juegan un rol dual en la infección. En suma a su abundancia en el hospedador infectado, la alta homología de secuencia que comparten entre diferentes especies también contribuye a su fuerte reactividad cruzada. Este alto grado de conservación, resulta en la presencia de epítopes comunes en las distintas Hsps. Debido a una amplia distribución en la naturaleza y su alta homología entre diferentes especies, representan componentes inmunogénicos importantes de diferentes patógenos. El sistema inmune, una vez que reconoce una Hsp de un patógeno en



particular, como consecuencia de la generación de una memoria inmunológica, también reaccionará frente a Hsps de otro organismo o del hospedador. El sistema inmune de esta manera, está capacitado para reaccionar rápidamente a una infección posterior, como para también generar una respuesta de hipersensibilidad contra proteínas propias (Qamra *et al.*, 2005). Distintos clones identificados en la evaluación de la genoteca con los sueros murinos, codificaron para la proteína de estrés térmico de 70 kDa (DnaK). La secuencia del gen no estaba completa en el clon caracterizado, de esta manera, la proteína expresada carecía del extremo amino terminal. Esta observación está de acuerdo a los estudios de Davenport *et al.*, (1992) en el homólogo de *M. lepra*, dado que demostraron que la respuesta humoral de la proteína se restringía al extremo carboxilo terminal de la proteína. El antígeno Hsp70 ha sido descrito como un poderoso inductor de la respuesta Th1. También se ha demostrado que la expresión de proteínas fusionadas al extremo amino terminal de Hsp70 de *M. tuberculosis* tiene un efecto estimulante polarizado hacia la producción de citoquinas Th1. Recientemente, se ha descrito que el péptido carboxilo terminal de Hsp70 tiene un efecto adyuvante que potencia la respuesta inmune específica dirigida a hacia los péptidos antigénicos fusionados a este (Ge *et al.* 2006). Otros trabajos reportaron que el homólogo Hsp 70 micobacteriano, une específicamente a receptores innatos en la superficie del macrófago y células dendríticas, lo que produce señales pro-inflamatorias, que en consecuencia aumentan la producción de  $\gamma$ IFN por las células T y *natural killers* (Bulut *et al.*, 2005; Langelaar *et al.*, 2005). También ha sido descrito este antígeno como inductor de la respuesta humoral en las infecciones micobacterianas (Bonorino *et al.*, 1998; Koets *et al.*, 2001). Recientemente, se reportó la utilización de Hsp70 recombinante como vacuna a subunidad contra la paratuberculosis bovina, que resultó promisorio ya que disminuyó la eliminación de la bacteria en los animales vacunados (Koets *et al.*, 2006). En nuestro análisis de la respuesta humoral, observamos un reconocimiento débil de la proteína Hsp70 por los animales con PTB. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente por Koets *et al.* (2001), quienes observaron que en animales naturalmente infectados la respuesta humoral a Hsp70 es generalmente baja. Estos autores sostienen también que este antígeno no permite discriminar entre infectados y no infectados. En nuestro estudio, también tuvimos animales no infectados que reconocieron a Hsp70 de MPTB. Dada la identidad promedio del 93 % a nivel de la secuencia primaria entre las proteínas homólogas micobacterianas, es de esperar la reacción frente a este antígeno por parte de los animales no infectados con MPTB, sensibilizados por el contacto con micobacterias ambientales o que probablemente cursen otra patología. El reconocimiento de las proteínas homólogas micobacterianas como de DnaK en *E. coli* empleando los sueros murinos hiperinmunes generados con Hsp70 de MPTB, sustentaría una baja especificidad de este antígeno. La ampliación de la cantidad de sueros evaluados, y la inclusión de sueros derivados de animales con distintas patologías de etiología bacteriana diversa, contribuirá a establecer la especificidad de la respuesta humoral dirigida hacia este antígeno.

A partir del análisis de *pools* de sueros de los animales pertenecientes a los tambos infectados, clasificados según los ensayos de  $\gamma$ IFN y ELISA-PPA, aislamiento y sintomatología clínica de los animales, Hsp70 fue reconocida solo en el grupo de animales con ELISA-PPA negativo y respuesta de  $\gamma$ IFN. Es interesante remarcar que el dogma de la respuesta celular en los estadios iniciales de la infección y el incremento de la respuesta humoral hacia finales de la infección, puede confirmarse para las mezclas antigénicas pero no para los antígenos individuales. Confirmando esto, Koets ha descrito una respuesta más temprana para Hsp70 que para otros antígenos. El trabajo de Konstantin *et al.*, (1998) en animales infectados con *M. bovis*, demostró también una cinética diferencial de respuesta para los distintos antígenos evaluados. Probablemente, la respuesta dirigida a Hsp70 sea un evento temprano en el desarrollo de la respuesta Th2, y el empleo de las mezclas antigénicas para el diagnóstico humoral no sea efectivo para la detección de esta respuesta temprana. También a partir del estudio de la respuesta celular T, se observó un comportamiento inespecífico como consecuencia de una alta conservación evolutiva (Koets *et al.*, 2001). En nuestro estudio de respuesta celular, pese a la relativa utilidad de Hsp 70 como antígeno planteada por otros autores, y pese a que algunos de los animales sanos presentaron respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN, Hsp70 fue capaz de discriminar los tambos infectados de los no infectados, consecuencia de los altos niveles de respuesta en los animales de los tambos con paratuberculosis.

En este trabajo, se describió también el estudio de GrpE como antígeno potencial. Esta proteína es co-chaperona de Hsp70 y se ha descrito que los niveles de GrpE disminuyen durante la privación de nutrientes (Rosenkrands *et al.*, 2000). Clonamos el gen *grpE* de MPTB y expresamos la proteína recombinante. El reconocimiento humoral de este antígeno por parte de los sueros de los animales naturalmente infectados fue muy bajo. Sin embargo, muchos de los animales paratuberculosos evaluados respondieron a la estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN con este antígeno, demostrándose la presencia de epítopes T. Esta respuesta celular fue muy específica ya que ninguno de los animales de los tambos negativos respondió a la estimulación con GrpE. Contrariamente a Hsp70, la variabilidad entre las proteínas GrpE homólogas es mayor, mostrando una baja conservación de la secuencia en los extremos amino y carboxilo terminales. La identidad con la proteína homóloga del complejo *M. tuberculosis* es del 74 % mientras que con las proteínas GrpE del resto de las micobacterias analizadas, la homología está entre el 59 % y el 68 %. Esta variabilidad puede involucrar a las regiones antigénicas de la proteína y disminuir las reacciones cruzadas con las bacterias ambientales.

## Estudio de proteínas homólogas descriptas en el complejo *M. tuberculosis*

### a) Antígeno P27.

Este antígeno fue inicialmente identificado en nuestro laboratorio a partir del análisis de una genoteca de expresión de *M. bovis* y ha sido caracterizado como un inductor tanto de la respuesta humoral como celular (Bigi *et al.*, 1997). Este antígeno está conservado en *M. tuberculosis* y se lo denomina LprG. El gen que codifica para esta lipoproteína en *M. tuberculosis* corresponde al Rv1411 en el banco de genes TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>). Dado que *lprG* codifica para una proteína de 27 kDa en las micobacterias del complejo tuberculosis, también se la llama LprG-P27 o P27. Río abajo del gen *lprG* hay un gen, Rv 1410, que codifica para una proteína de 55 kDa denominada P55 (Silva *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio, se ha demostrado que estos genes están organizados como un operón y que inducen una fuerte respuesta celular y humoral (Bigi *et al.*, 2000). En un trabajo en colaboración con Hovav *et al.*, (2003) se evaluó P27 en ratones, y se observó que su inoculación produce un aumento en la susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*. Adicionalmente, la protección conferida por BCG y otros antígenos fue completamente abolida cuando se incorporó a la proteína recombinante en la preparación vacunal. No se conoce el mecanismo para este efecto paradójico del antígeno, por el cual induce una respuesta del tipo Th1 y a la vez facilita la multiplicación intracelular del patógeno, exacerbando el curso de la infección. Recientemente, Gehring *et al.*, (2004) mostró que LprG es un ligando de TLR-2 (*Toll-Like Receptor* tipo 2) inhibiendo el procesamiento y presentación de antígenos por MHC II en macrófagos. Se han seleccionado muchos antígenos como candidatos a ser utilizados como vacunas, por su habilidad para inducir una respuesta Th1. P27 es un ejemplo de una proteína inductora de respuesta celular que no produce protección. Sin embargo, los ensayos con mutantes de *M. tuberculosis* defectivos en LprG-P27 realizados en nuestro laboratorio, mostraron una fuerte atenuación de la virulencia (Bigi *et al.*, 2004), por lo cual, estas mutantes se presentan como una alternativa vacunal potencial. Por estos antecedentes, decidimos estudiar el homólogo de esta proteína en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. En este trabajo, clonamos la secuencia del gen (*MAP1138c*) que codifica para el homólogo de MPTB y expresamos la forma recombinante de la proteína. El análisis de alineamiento global de secuencias mostró una identidad del 66 % con LprG de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Se analizó el reconocimiento de la proteína recombinante de MPTB, mediante la utilización de un suero hiperinmune de conejo, dirigido contra LprG de *M. bovis*. Se observó que la proteína de MPTB era reconocida, demostrándose la presencia de epítopes B compartidos. Solo un animal infectado con MPTB, mostró una fuerte reactividad humoral contra este antígeno por *immunoblot*. Al evaluar respuesta celular de los animales por estimulación de los linfocitos con LprG-MPTB recombinante no permitió diferenciar los tambos sanos de los infectados. Se pudo observar la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN en gran parte de los animales de los rodeos afectados por la enfermedad. Sin embargo, muchos de los animales pertenecientes a los establecimientos libres de la enfermedad presentaron una respuesta fuerte, demostrando una alta

inespecificidad de este antígeno. Recientemente, Hovav *et al.*, (2004) demostraron que LprG tiene actividad mitogénica, estos autores demostraron en ratones BALB/c, que la capacidad proliferativa estaba restringida a las células B (vírgenes). Es conocido que los mitógenos causan una respuesta amplia y no específica en el hospedador, por lo que de acuerdo a nuestros resultados de estimulación de la respuesta celular con este antígeno, podemos hipotetizar que LprG tenga una capacidad mitogénica en el bovino que involucre las células T u otros tipos celulares que pueden producir  $\gamma$ IFN, como las células NK (*natural killers*). Estudios futuros de citometría de flujo empleando marcadores de las poblaciones celulares, previa estimulación con este antígeno, contribuirán a dilucidar el posible rol mitogénico en el bovino.

Por el análisis de la presencia de la proteína en las bases de datos, se pudo constatar la presencia de homólogos potenciales en bacterias relacionadas, como las pertenecientes al género *Nocardia*. La presencia de homólogos potenciales en las bacterias cuyos genomas aún no se encuentran secuenciados, y sobre todo, en aquellas distribuidas en el ambiente, con las que pueden entrar en contacto los animales, como por ejemplo *M. phlei*, que es una bacteria que se encuentra en el suelo y en plantas, pudiéndosela aislar de la alfalfa, también podrían ser responsables de la respuesta inespecífica de los animales frente a este antígeno. Se obtuvieron sueros hiperinmunes en ratón contra la proteína recombinante de MPTB, y se detectó la presencia de los posibles homólogos en bacterias como *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y *M. phlei*. No observamos diferencias significativas en el peso molecular de las distintas proteínas detectadas. Por análisis de homología con la secuencia primaria de la proteína de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, disponible en el banco de genes, se pudo constatar una identidad del 50 % con el homólogo de MPTB, pese a esta baja homología, la proteína fue reconocida por el suero hiperinmune anti-LprG de MPTB, lo que demuestra que los sitios antigénicos de la secuencia se conservan.

#### **b) Antígeno de 45/47 kDa**

Esta proteína de unión a fibronectina ha sido identificada en numerosas especies del género *Mycobacterium* y tiene distintas nominaciones en la literatura: FAP (FAP, de *Fibronectin Attachment Protein*), Apa, ModD, MPT32, antígeno de 45/47 kDa o antígeno de 50/55 kDa. Está reportada su caracterización como una glicoproteína. Algunos procariotas, al igual que los eucariotas, tienen la capacidad de modificar las proteínas con una variedad de residuos glicosídicos (Benz y Schmidt; 2002). Los carbohidratos que “decoran” la superficie de distintos patógenos, como las micobacterias, son considerados motivos moleculares asociados al patógeno y son reconocidos por receptores específicos, como el receptor de manosa y DC-SIGN, ambos receptores esenciales para la invasión de macrófagos y células dendríticas, respectivamente (Karakousis *et al.*, 2004; Tailleux *et al.*, 2003). El fenómeno de glicosilación ha sido estudiado en *M. tuberculosis*, pudiéndose establecer la dependencia del proceso de O-manosilación (adición de oligosacáridos al grupo hidroxilo de los residuos treonina o serina) al de traslocación de proteínas (Sec dependiente),

sustentado por la presencia de un homólogo a las manosiltransferasas eucariotas en la membrana bacteriana (VanderVen *et al.*, 2005). Las micobacterias expresan distintos glicoconjugados inmunogénicos, como el LAM (glicolípido), y glicoproteínas que se encuentran en la superficie de la bacteria o en el medio extracelular. En distintos estudios se ha aprovechado la capacidad de unión a lectinas de los residuos  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa tanto para el aislamiento o purificación, como para la caracterización de las moléculas que presentan dicho motivo. De este modo, se han reportado distintos antígenos del filtrado de cultivo que unen lectinas como ConA y que resultaron inmunoreactivos en pacientes con tuberculosis (Espitia y Mancilla; 1989). Tanto el LAM como los antígenos MPT83 y Apa, conocido también como el antígeno de 50/55 kDa de *M. tuberculosis*, han demostrado ser glicoproteínas inmunoestimulantes tanto de la respuesta celular como humoral. En 1995, Espitia *et al.*, (Espitia *et al.*, 1995) demostraron la presencia de un homólogo a Apa en *M. bovis*, con una alta similitud estructural y antigénica. Asimismo Wieles *et al.* (1994) y Schorey *et al.* (1995), describen la antigenicidad del homólogo, denominado MPT32 en *M. leprae* y su participación en la invasión de células de Schwan, respectivamente. En *M. leprae*, MPT32 también se lo denomina FAP-L y antígeno 43L.

En el año 2001 Secott *et al.*, (Secott *et al.*, 2001) describieron el homólogo de FAP en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, demostrando su rol de adherencia a células eucariotas. Sin embargo, a la fecha no había sido descrito su rol antigénico en la paratuberculosis bovina.

En el presente estudio, se clonó el gen *modD* (correspondiente al marco de lectura abierto MAP1569 en el genoma de MPTB) y se sobreexpresó la proteína en el sistema *E. coli*-pRSET. Se obtuvo una proteína recombinante de un tamaño aproximado de 60 kDa, a la que denominamos ModD en concordancia con el nombre del gen. Parte de la diferencia con el peso molecular teórico (36 kDa) está dada por la etiqueta de polihistidina (6xhis) en la región N-terminal que aporta el vector pRSET-B. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, existen evidencias experimentales que demuestran que un alto contenido de residuos prolina, producen un retardo en la migración de las proteínas como consecuencia del incremento de la rigidez de la molécula (Romain *et al.*, 1993; Thole *et al.*, 1990). La presencia de un alto porcentaje de prolina en Mod-MPTB (20,38 %), explicaría la mayor masa observada por electroforesis en geles de poliacrilamida. El proceso de glicosilación ha sido descrito en *E. coli* (Benz y Schmidt; 2002), de acuerdo a los estudios de glicosilación por unión de lectinas realizados en la proteína recombinante, no tenemos evidencia de que la proteína expresada en *E. coli* incorpore residuos de manosa. Por este motivo, no podemos atribuir a la posible modificación postraduccional de la proteína en *E. coli*, la diferencia de peso molecular observada. La obtención de un antisuero anti-ModD en ratones, permitió localizar la proteína en *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Se demostró, que la proteína es secretada mayormente al medio extracelular, aunque, también se la detectó en menor proporción en el extracto de proteínas de la bacteria. Estudios de inmunofluorescencia realizados en la bacteria intacta o a las que se les extrajo la envoltura lipídica por tratamiento ácido, junto a

estudios de inhibición de unión de fibronectina con anticuerpos anti-FAP sugieren que la proteína no está expuesta en la superficie de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Secott *et al.*, 2001). Datos adicionales del mismo trabajo, derivados del fraccionamiento subcelular y análisis por *Western blot*, demostraron que se encuentra en citoplasma y sugiere que también reside entre la membrana citoplasmática y la capa de micelatos. Dada la naturaleza funcional del estudio, no se analizó la presencia de la proteína en el sobrenadante. En nuestro análisis de proteínas totales de *M. bovis* y MPTB por *Western blot*, sólo se detectaron trazas de la proteína en el extracto del aislamiento de *M. bovis*, en cantidades relativamente menores que en la misma fracción proteica de MPTB. Previamente, en el trabajo de Ratliff *et al.*, (1993) se localizó la proteína en la fracción correspondiente a la pared celular de *M. bovis* BCG. Esto permitiría inferir que pese a que la proteína es mayormente secretada, también se la localiza en la pared celular, probablemente asociada a algún componente de la misma. Tal como se ha descrito previamente en la bibliografía para las proteínas homólogas del complejo *M. tuberculosis*, el análisis por *Western blot* de la proteína nativa en MPTB mostró la presencia de dos bandas reactivas de tamaño aproximado de 50 y 55 kDa. Se ha especulado que la banda de mayor migración del antígeno de *M. tuberculosis* deriva del clivaje proteolítico del extremo C-terminal (Secott *et al.*, 2001) aunque estudios posteriores como el realizado por el grupo de Clara Espitia (Lara *et al.*, 2004), atribuyeron esta observación a diferencias en el patrón de glicosilación. En este trabajo, también demostramos por el ensayo de unión a concanavalina A, que ModD-MPTB está modificada con residuos de manosa y que ambos polipéptidos del complejo ModD unen ConA. Asimismo, las formas no secretadas, detectadas en el extracto celular, también presentaron la modificación post-traducciona. En el trabajo de Espitia, se evaluó la seroreactividad de pacientes tuberculosos frente a la forma recombinante glicosilada, expresada en *S. lividans*, y frente a una isoforma tratada previamente con  $\alpha$ -D-manosidasa, demostrando que la reactividad se perdía sin la glicosilación. En el presente trabajo, evaluamos por *Western blot* el reconocimiento de la proteína nativa, presente en el sobrenadante de MPTB, por parte de animales con paratuberculosis (serológicamente positivos) y luego se enfrentó los mismos sueros a la proteína recombinante expresada en *E. coli*, sin la modificación post-traducciona. En este último caso, la interacción no se perdió, demostrándose que la proteína recombinante expresada en el sistema heterólogo contiene epítopes B que son fuertemente reconocidos por los sueros bovinos, lo cual permitió continuar la evaluación de la respuesta humoral frente a la proteína producida en *E. coli*. Se demostró por *Western blot* que todos los animales infectados evaluados reconocieron a la proteína, mientras que solo algunos de los animales sanos lo hicieron débilmente. Contrariamente, los ensayos de respuesta celular mostraron que pocos animales respondieron al antígeno. Se demostró de esta manera que el antígeno de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* induce una respuesta Th2 más potente que la respuesta Th1. En algunos animales de los establecimientos sanos encontramos niveles elevados de  $\gamma$ IFN cuando se estimuló los linfocitos T de la sangre con este antígeno. Los análisis globales de secuencia

mostraron una identidad cercana al 50 % con las bacterias saprófitas y a partir de los anticuerpos policlonales anti-ModD, demostramos la expresión del posible homólogo en *M. phlei*. Probablemente la presencia de proteínas homólogas en distintas micobacterias ambientales contribuya a la reacción cruzada entre los mismos.

### **Potencialidad diagnóstica de los Derivados Proteicos Purificados y de los antígenos recombinantes.**

#### **a) Respuesta celular**

Uno de los principales desafíos que presenta la enfermedad de Johne, como otras enfermedades, es el diagnóstico de los casos subclínicos, para lo que se requiere de la detección de la respuesta inmunológica temprana del animal. Con este fin, se ha implementado en forma equivalente al diagnóstico de la tuberculosis bovina, la evaluación de la respuesta mediada por células cuantificando la liberación de  $\gamma$ IFN por estimulación específica de los linfocitos con los antígenos de referencia conocidos como Derivados Proteicos Purificados (PPD).

El Derivado Proteico Purificado (bovino o aviar) es una preparación obtenida por tratamiento térmico y lisis de los bacilos *M. bovis* o *M. avium* subsp. *avium* (según corresponda). Las tuberculinas que se utilizan en el diagnóstico de acuerdo con las regulaciones del comercio internacional de ganado, son la PPD<sub>b</sub> (bovina), elaborada con la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis* y la PPD<sub>a</sub> (aviar), elaborada con la cepa D4 de *M. avium* subsp. *avium*. Las distintas PPDs se obtienen a partir de fracciones hidrosolubles preparadas calentando en vapor libre y filtrando posteriormente los cultivos de las micobacterias crecidas en un medio sintético. La fracción del filtrado se precipita en medio ácido. La mezcla puede ser adicionada con un conservante antimicrobiano que no produzca reacciones positivas falsas, como el fenol. Las normas establecidas para la realización y la lectura de la prueba de intradermo-tuberculinización de animales están estandarizadas. Asimismo, dichas normas establecen la utilización de los mismos antígenos para la prueba de  $\gamma$ IFN, que se consigna como prueba suplementaria a la intradermoreacción ([www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar)). En la actualidad, no está comercialmente disponible una PPD preparada a partir de MPTB y se emplea el derivado proteico aviar en la prueba  $\gamma$ IFN para el diagnóstico de la paratuberculosis a partir de la evaluación de la respuesta celular. Esta PPD<sub>a</sub>, es comercializada por la misma empresa que provee el ELISA Bovigam (Biocor, CSL). Son escasos los reportes de la utilización de PPD producida a partir de una cepa de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, o PPD<sub>j</sub>, (*johnina*), como así también, existen pocos trabajos donde se compare la eficacia de las PPD<sub>a</sub> y PPD<sub>j</sub>. Jungersen *et al.* (2002) han realizado un estudio empleando la PPD<sub>a</sub> (Biocor) y una PPD de producción local a partir de un aislamiento denominado "Promise". En ese estudio tuvieron una sensibilidad menor cuando estimularon con PPD<sub>j</sub>, sin embargo, esta última fue preparada en el año 1975 y había sido conservada liofilizada durante al menos 20 años hasta su utilización. Koets *et*

*al.*, (1999), emplearon en un ensayo de proliferación celular utilizando células mononucleares de sangre periférica de animales con paratuberculosis, dos PPDs producidos a partir de la cepa 3+5/C de MPTB (que denominan PPDp) y la cepa de referencia D4 de *M. avium* subsp. *avium*. En este estudio obtuvieron una respuesta significativamente mayor cuando estimularon con PPDp. La gran similitud entre las bacterias de la especie *avium*, sustenta la implementación de la PPDa en el diagnóstico de la paratuberculosis. Sin embargo, la finalización de la secuenciación del genoma de la cepa K-10 de MPTB y la cepa 104 de *M. avium* subsp. *avium*, permitió conocer la existencia de genes diferenciales. Aunque muchos de estos genes, codifican para proteínas hipotéticas, Bannantine *et al.*, (2004) describieron algunos productos de estos genes diferenciales, como proteínas inmunoreactivas, capaces de ser reconocidos por los sueros de animales con PTB (Bannantine *et al.*, 2004). En este trabajo, expresamos y evaluamos el producto del gen anotado como *MAP860c* en el genoma de la micobacteria, descrito previamente como una secuencia diferencial de MPTB en el trabajo mencionado. Si bien la respuesta humoral contra esta proteína resultó nula en nuestros ensayos, cerca del 36 % de los animales infectados respondieron con niveles significativos de  $\gamma$ IFN y de forma específica. Es de esperar que la presencia de epítopes diferenciales en MPTB, respecto de *M. avium* subsp. *avium*, contribuya a una mejor capacidad estimulante de los linfocitos T por parte de una PPDj en los animales con paratuberculosis. Recientemente, Radosevich *et al.*, (2007) demostraron un perfil diferencial de expresión de proteínas entre la cepa de referencia MPTB K-10 y un aislamiento clínico, por este motivo, en este trabajo elaboramos un Derivado Proteico Purificado a partir de un cultivo del aislamiento de campo, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Malele-505. Denominamos a esta mezcla antigénica PPDj-IB y evaluamos la respuesta celular de los animales, estimulando con la misma concentración proteica de PPDa y PPDj-IB. La especificidad de la prueba empleando este antígeno fue la misma respecto de la estimulación con PPDa, pero a pesar que la proporción de animales reactivos a cada prueba fue semejante, la sensibilidad relativa entre las pruebas fue del 75 %, dado que en algunos casos, los animales identificados por cada prueba son distintos ( $\kappa=0,6$ ). Dos animales que respondieron en forma similar con PPDa y PPDb, respondieron con niveles superiores de estimulación con PPDj (animales 204 y 5369). Tres animales con paratuberculosis (5161, 5175 y 5585) respondieron solamente a PPDj. Estos animales (PPDa negativos-PPDj-IB positivos), también respondieron positivamente al antígeno Map860, mencionado con anterioridad, que es exclusivo de la subespecie *paratuberculosis*. Es probable que la respuesta de estos animales cuando son estimulados con PPDj, sea consecuencia, al menos en parte, de la presencia de este antígeno en la mezcla antigénica. Además de los antígenos proteicos que pueden constituir cada Derivado Proteico Purificado, están presentes también los antígenos no proteicos. Entre estos, se encuentran los glicolípidos, como el LAM, que es un componente esencial de la pared celular. A partir del análisis de los componentes de las mezclas antigénicas con anticuerpos específicos pudimos observar que el contenido del LAM, era superior en la mezcla PPDj respecto de PPDa y PPDb.



Probablemente, la respuesta superior en algunos animales, sea consecuencia de la estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN por el LAM.

Se reportaron en la literatura distintos componentes no proteicos fosforilados de bajo peso molecular, que son estimulantes potentes de los linfocitos  $T\gamma\delta$  en humanos. Estos compuestos se caracterizaron en *M. tuberculosis*, denominándose TUBag (de *tuberculous antigen*). Estas moléculas TUBag, cuyo rol celular es desconocido, se obtienen del extracto celular luego de un particionamiento en metanol-cloroformo, y por procesamiento de la fase acuosa por cromatografía de intercambio iónico. Están constituidas por un nucleótido fosfato, más un sustituyente no caracterizado. En el denominado TUBag4, el nucleótido es el 5' trifosfo-2'deoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil-1'-timina (Constant, *et al.*, 1995). Welsh *et al.*, (2002), demostraron la capacidad de inducir la proliferación de células  $T\gamma\delta$  de bovinos infectados por *M. bovis*, de dos fosfo-antígenos sintéticos, monometil fosfato e isopentenil fosfato. Sin embargo, no demostraron la estimulación de la producción de  $\gamma$ IFN, tal como se reportó para los antígenos TUBag en humanos. En la actualidad, no se reportaron las moléculas equivalentes a TUBag en *M. bovis*, aunque si se describió su presencia en otras micobacterias como *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium smegmatis*. Como consecuencia de la alta temperatura a la cual los cultivos son sometidos para la preparación de las PPDs, muchos de los componentes antigénicos se degradan. Es posible que debido a su bajo peso molecular estos compuestos sean más estables que las proteínas. Sin embargo, a la fecha, no existen reportes de la presencia de estos componentes en las PPDs. A partir del análisis del contenido de ADN de nuestra preparación de PPD se pudo observar un mayor contenido de ácidos nucleicos en la PPDj respecto de las comerciales, probablemente la presencia de ácidos nucleicos sea un marcador de la presencia de moléculas antigénicas como las TUBag.

Del análisis comparativo de la respuesta celular frente a los distintos antígenos, evaluados en tambos infectados con MPTB y libres de la enfermedad, se observó que el número de antígenos reconocidos como la magnitud de la respuesta fue variable en los distintos animales. Esto mismo observaron otros autores evaluando la respuesta humoral en bovinos infectados con *M. bovis* (Konstantin *et al.*, 1998) y en bovinos infectados con PTB (Rosseels *et al.*, 2006). Adicionalmente a estos reportes, no existen estudios con distintos antígenos recombinantes donde se detalle el reconocimiento antigénico por cada animal.

Se observó también, que el ensayo de estimulación de la liberación de  $\gamma$ IFN empleando la mezcla antigénica PPDa, identificó al 31 % de los animales infectados con una especificidad del 95,5 %. Esta baja sensibilidad se podría atribuir al estadio avanzado de la enfermedad que cursaban los animales, con predominio de la respuesta Th2, lo cual se sustenta con el alto porcentaje de animales seroreactivos detectados (51 %). Sin embargo, 11 animales adicionales (24 %) pudieron ser reconocidos exclusivamente midiendo la respuesta celular luego de la estimulación con los antígenos recombinantes. Algunos de estos antígenos recombinantes, resultaron muy específicos,

no siendo reconocidos por los animales sanos. Esto indicaría que la adición de antígenos a la PPD actualmente utilizada podría mejorar la sensibilidad, sin disminución de la especificidad. El empleo de distintos antígenos recombinantes en la evaluación de la respuesta celular, identificó animales con paratuberculosis en un rango de 13 a 31 % y con una especificidad de 86,7 % a 100 %. Los antígenos menos sensibles, fueron los que mostraron una mayor inespecificidad, lo que determinó puntos de corte mayores. Este fue el caso para los antígenos Lpp34, LprG y LppJ. Los antígenos más específicos fueron GrpE, LppE, el antígeno 85A, PknB y Map860. De estos, los que reconocieron la mayor cantidad de animales fueron GrpE (27 %) y Map860 (31 %). Siendo este último, el que permitió reconocer la misma cantidad de animales que PPDa con mejor especificidad (100 %). El antígeno Hsp 70 fue el que mostró una mayor sensibilidad respecto de PPDa, ya que resultaron positivos con este antígeno el 38 % de los animales, sin embargo, su especificidad fue menor (91 %). Koets *et al.*, (1999) describió que la respuesta celular por estimulación con Hsp70, disminuye cuando se comparan los estadios de infección asintomática con el sintomático. De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados demostraron que sólo 3/10 animales con sintomatología respondieron positivamente.

Distintos estudios demostraron la antigenicidad del complejo del antígeno 85 como también la capacidad de inducir una respuesta protectora contra *M. tuberculosis* y *M. ulcerans* en modelos de infección (Shin *et al.*, 2005). Shin *et al.*, (2005) tuvieron una buena respuesta celular específica en animales con PTB estimulando con los antígenos 85 A, 85 B y 85 C y demostraron que la inducción de la expresión génica de  $\gamma$ IFN y  $\alpha$ TNF por 85 A, se correlacionaba con el nivel de excreción de la bacteria. En nuestro trabajo pudimos confirmar la excreción de la bacteria por cultivo en 4 animales, de los cuales, solo 2 respondieron positivamente a la estimulación por el antígeno 85 A. Si consideramos los resultados de Ziehl Neelsen (ZN) en frotis de materia fecal como medida de secreción de la bacteria, el resultado es similar ya que 6/14 animales ZN+ respondieron frente a la estimulación con el mismo antígeno. El bajo nivel de detección de animales secretores es consecuencia de la dificultad del cultivo de esta bacteria y al problema de las contaminaciones fúngicas, comunes en los cultivos que requieren largos tiempos de incubación.

Pudimos observar que algunos animales sanos de los tambos no infectados presentaron valores de estimulación significativos con PPDa. Como se mencionó anteriormente, el problema de las reacciones cruzadas entre las distintas micobacterias, entre ellas las ambientales no es un problema menor en el diagnóstico de las patologías de origen bacteriano. Esta respuesta de estimulación frente a PPDa en animales no infectados, ha sido reportada previamente (Koets *et al.*, 1990; Jungersen *et al.*, 2002). En el trabajo de Jungersen (2002), estos animales fueron necropsiados. Tanto los resultados histológicos como el cultivo, resultaron negativos. Dada la condición de los tambos empleados como control en nuestro estudio, donde no se registra la enfermedad, al menos en un período de diez años, donde no hay reposición de animales desde otros establecimientos y no se aisló la bacteria por cultivo de materia fecal, consideramos que esta

reacción es consecuencia de reacciones cruzadas con las bacterias saprófitas, con las cuales los animales entran en contacto. *M. avium* subsp. *avium* ha sido frecuentemente aislado en el ganado aunque, generalmente causa lesiones menores no progresivas en los nódulos linfáticos mesentéricos. La sensibilización de los bovinos con esta bacteria, está frecuentemente asociada a la exposición de los animales a aves domésticas o salvajes infectadas. También puede darse ocasionalmente con la exposición a cerdos infectados con las bacterias del complejo *M. avium* (Brown *et al.*, 1981). Por lo tanto, la demostración de la antigenicidad de Map860, proteína que sería exclusiva de la subespecie paratuberculosis es muy promisorio. Las micobacterias ambientales interfieren en el diagnóstico como consecuencia de las reacciones cruzadas. Esta interferencia resultó significativamente mayor con la mezcla PPDa que con PPDb. Esto se evidenció claramente en los tambos libres de la enfermedad, donde la respuesta de los animales fue mayor cuando se estimuló con PPDa que cuando se estimuló con PPDb. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros trabajos donde se reporta que la interferencia de las reacciones cruzadas con otras micobacterias ambientales es especialmente perjudicial para la utilización de PPDa para el diagnóstico de paratuberculosis y en menor medida para la utilización de PPDb para el diagnóstico de tuberculosis bovina (Walravens *et al.*, 2002). Estas evidencias sugieren que este Derivado Proteico Purificado derivado de *M. avium* subsp. *avium* requiere ser mejorado.

Del análisis de la respuesta de liberación de  $\gamma$ IFN con el antígeno PPDb, pudimos observar que los animales de los tambos con PTB tuvieron una respuesta significativamente mayor que los animales de los tambos libres de la enfermedad. La respuesta de estimulación con este antígeno en animales con PTB, ha sido reportada previamente en Dinamarca, incluso con algunos animales que presentaron niveles de estimulación superiores a los obtenidos con PPDa, pese a ser este un país libre de tuberculosis bovina (Jungersen *et al.*, 2002). También pudimos observar que muchos de los animales que respondieron con índices elevados por estimulación con PPDa, son también los que presentaron una respuesta mayor de liberación de  $\gamma$ IFN frente a PPDb. El análisis de correlación entre las respuestas de estimulación con PPDa y PPDb, presentaron un grado de asociación positivo entre las dos variables ( $r=0,75$ ). Es conocida la presencia de antígenos homólogos entre *M. bovis* y *M. avium*, (Roseells *et al.*, 2006; Sechi *et al.* 2006, Koets *et al.*, 1999) lo cual explica la estimulación observada con el antígeno PPDb en los animales con PTB.

#### **a) Respuesta humoral**

En muchos países como Australia y Estados Unidos, donde se implementan programas oficiales de control, como en Argentina, donde el plan de control es voluntario, la técnica de ELISA es tan utilizada como el cultivo para el diagnóstico de rutina de la paratuberculosis (Huda *et al.*, 2004). Los ELISAs más difundidos son los que emplean preparaciones crudas o semipurificadas, muchas de ellas de la cepa 18 de *M. avium* subsp. *avium*, como el antígeno PPA (comercializado por Allied), mientras que el ELISA comercializado por CSL utiliza una

preparación citoplasmática de la cepa *M. avium* subsp. *paratuberculosis* VRI 316:102-2. También se ha empleado el lipoarabinomano (LAM) (Sugden *et al.*, 1997).

Las distintas formulaciones de los *kits* de ELISA, han demostrado respuestas muy distintas en el mismo animal (Collins *et al.*, 2005, Sugden *et al.*, 1997). Los animales pueden responder de manera diferente a la infección por MPTB o pueden estar cursando un estadio diferente de la enfermedad determinando diferencias en los antígenos reconocidos, generando anticuerpos que pueden ser detectados por un ensayo, pero no por el otro. Collins *et al.*, (2005), comparando distintos ELISAs comerciales en granjas diferentes observó que la especificidad de los distintos ensayos variaba. Si bien es difícil conocer las razones precisas de este resultado, los autores proponen como posible, las diferencias cualitativas y cuantitativas en la flora microbiana de los animales de las distintas granjas, estando expuestos a la presencia de diversas micobacterias. Entonces, la identificación de una diversidad de antígenos de *M. paratuberculosis* o epítopes que induzcan una respuesta humoral en bovinos, conducirían al mejoramiento de los *kits* diagnósticos, aunque es de esperar que los ensayos con un único antígeno purificado ocasione una disminución en la sensibilidad diagnóstica. Por eso la importancia de la identificación y estudio de antígenos inmunodominantes. Son pocos los antígenos recombinantes estudiados hasta el momento para la evaluación de la respuesta humoral. Uno de ellos es el antígeno de 34 kDa. En 1993, De Kesel *et al.*, (1993) identificaron un marco abierto de lectura que codificó para una proteína de 34 kDa. Si bien esta proteína tiene epítopes B no específicos, se identificó un epítope presente en la región carboxilo terminal de la proteína (a362), que se describió como específico de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Sin embargo cuando se comparó el ELISA basado en este epítope con los ELISA comerciales, su sensibilidad resultó menor (70 %, contra el 87 % del ELISA-Allied y 77 % del ELISA de CSL), y el 5 % de los animales tuberculosos, también resultaron positivos (Vannuffel *et al.*, 1994). Más tarde se demostró la existencia reactividad cruzada entre este epítope y una proteína de 38 kDa de *M. bovis* (Coetzier *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha evaluado la respuesta humoral con los antígenos recombinantes del complejo 85 y el antígeno de 35 kDa. El mejor candidato entre estos antígenos resultó ser el antígeno 35 kDa con una alta sensibilidad 93,3 % (86,4 % de especificidad), este valor fue similar al de la prueba comercial utilizada como referencia (Shin *et al.*, 2004).

Las proteínas que se identificaron o se seleccionaron para este estudio, también fueron evaluadas en su capacidad de inducir respuesta humoral en bovinos paratuberculosos. En una primera instancia los únicos antígenos que demostraron una reacción intensa de los animales fueron los antígenos Lpp34, Bfr, LprG y ModD. De los cuales, como se discutió anteriormente, Lpp34 tiene epítopes que reaccionan inespecíficamente y solamente preadsorbiendo se ponen en evidencia los anticuerpos dirigidos contra los epítopes específicos. De los tres antígenos restantes, nos interesó seleccionar los inmunodominantes en los distintos estadios de la enfermedad. Se utilizaron *pooles* de sueros de animales seleccionados de dos tambos con problemas de paratuberculosis de la

provincia de Buenos Aires, y se evaluó el reconocimiento de los distintos antígenos por *Western blot*. De esta manera, seleccionaríamos sólo aquellos que generen una respuesta humoral marcada o aquellos con la potencialidad de estimular la respuesta de anticuerpos en la mayoría de los animales. Con esta estrategia, seleccionamos al antígeno ModD. Pusimos a punto un ELISA, que nos permitió conocer que pese a que no es un antígeno reconocido por todos los animales, muchos de los animales respondieron con valores de DO405 muy altos. La sensibilidad de este ensayo, relativa al ELISA-PPA fue del 37 % y la especificidad del 95,9%. De los animales que resultaron positivos por el ELISA-ModD, y que no fueron detectados por el ELISA-PPA, uno perteneció al tambo infectado de Suipacha, y tenía sintomatología clínica y respuesta de  $\gamma$ IFN-PPDa positiva. De acuerdo al Manual de *tests* diagnósticos y Vacunas para Animales terrestres (OIE; 2007), la especificidad analítica se debe evaluar a partir del estudio de un panel de muestras derivadas de animales que han estado expuestos a organismos genéticamente relacionados y que pueden estimular la presencia de anticuerpos que reaccionen de forma cruzada. En nuestro estudio, utilizamos para evaluar la especificidad un panel de sueros de bovinos con diagnóstico de tuberculosis bovina. Un gran porcentaje de ellos, confirmado por la presencia de lesiones y aislamiento de la bacteria. Por los datos de la historia del rodeo al que estos animales pertenecían y los resultados de la liberación de  $\gamma$ IFN empleando los antígenos de referencia PPDa y PPD<sub>b</sub>, no estaban coinfectados con MPTB. De acuerdo a los resultados obtenidos solo 1/21 animales fue reconocido como positivo por el ELISA-ModD, presentando un valor de DO bajo, mientras que 7/21 (33,3 %), fue reconocido por el ELISA-PPA, con valores de DO tan altos como los obtenidos en los animales con PTB (no mostrado). Los anticuerpos generados por inmunización de ratones con ModD-MPTB, reconocieron el homólogo de *M. bovis* AN5, por este motivo, sabemos de la presencia de epítopes comunes. Por otro lado, se sabe del reconocimiento del antígeno homólogo por los animales infectados experimentalmente con *M. bovis* (Konstantin *et al.*, 1998). Es necesario implementar ensayos con péptidos sintéticos para evaluar los posibles epítopes diferenciales en los homólogos y poder establecer si la respuesta de los animales infectados con *M. bovis* se debe a un bajo reconocimiento del antígeno de MPTB o a una respuesta inmunológica humoral distinta en la infección natural.

Se ha propuesto a la toma de muestra de tanque de leche, para análisis directo o indirecto de la presencia de la bacteria, como medida factible a ser aplicada para el diagnóstico de tambos infectados, por su sencillez y debido a que esa muestra representa a la población de estudio. La detección directa de la bacteria por cultivo, es una metodología de baja sensibilidad y laboriosa que insume mucho tiempo. A pesar que las técnicas moleculares como PCR son de alta sensibilidad, en la experiencia de nuestro laboratorio, la detección directa de secuencias específicas de MPTB en leche resultó de menor sensibilidad que el cultivo de la bacteria a partir de la misma muestra (datos no publicados), sin embargo, la misma técnica molecular resultó útil para la detección de la secuencia de inserción IS6110 de *M. bovis* en leche de establecimientos con tuberculosis bovina

(Zumárraga *et al.*, 2005). Otra alternativa en el diagnóstico de paratuberculosis empleando muestras de leche, es detectar los anticuerpos que desarrolla el animal en respuesta a la infección bacteriana presentes en esta muestra. Las secreciones lácteas contienen principalmente 3 clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM e IgA. Las inmunoglobulinas son selectivamente transportadas desde el suero a la glándula mamaria, es así que las IgG1, llegan a constituir el 75 % de las Igs en el calostro, pese a que estos niveles decaen en pocos días, IgG1, continúa siendo la clase más importante durante todo el período de lactación (Korhonen *et al.*, 2000). Estudios como el de Chang *et al.*, (1981) demuestran que también puede existir una producción de inmunoglobulinas en la glándula mamaria del bovino como resultado de la estimulación antigénica local, detectándose principalmente IgA e IgG1. Teniendo en cuenta que se ha aislado *M. avium* subsp. *paratuberculosis* de muestras de leche así como de nódulo linfático supramamario (Streeter *et al.*, 1995; Sweeney *et al.*, 1992; Paolicchi *et al.*, 2003), es probable que la estimulación antigénica local en la paratuberculosis bovina juegue un rol importante en la producción de las inmunoglobulinas que se encuentran posteriormente en leche. La detección de inmunoglobulinas en leche constituye una herramienta valiosa en distintas afecciones en el bovino causadas por distintos microorganismos como lo son la anaplasmosis, brucelosis, paratuberculosis, neosporosis y salmonelosis, esto lo demuestran distintos trabajos (Vanzini *et al.*, 1998; Lombard *et al.*, 2006; Chanlun *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2006). Recientemente, en un trabajo de Lombard *et al.*, (2006) se realizó un estudio intensivo en más de 6000 animales para comparar la capacidad diagnóstica de la prueba de ELISA empleando muestras de leche y suero en rodeos infectados con MPTB. Pese a que los ensayos tuvieron una concordancia moderada, los niveles de sensibilidad y especificidad fueron comparables, haciendo a la detección de inmunoglobulinas contra la bacteria en leche una prueba confiable para el diagnóstico de la enfermedad de Johne. El nivel bajo de concordancia reportado por estos autores ( $\kappa=0,5$ ) implica una variación en la presencia de anticuerpos anti-MPTB en las muestras de leche y suero del mismo animal. Existen publicaciones recientes, donde la implementación de antígenos recombinantes, aparece como una alternativa útil para el diagnóstico en leche de anaplasmosis bovina (de Echaide *et al.*, 2005), pero no se encuentran descriptos en bibliografía antígenos recombinantes para el diagnóstico de paratuberculosis a partir de leche. En este trabajo, evaluamos la presencia de IgG anti-ModD recombinante en leche y suero de una tropa de animales (n=10). Pese a que es necesario contar con el análisis de un mayor número de animales, 3 de los 7 animales con cultivo y serología confirmada (ELISA-PPA +), reconocieron la proteína y lo hicieron tanto en suero como en leche. Sin embargo no se detectaron títulos apreciables en leche de tanque de los distintos establecimientos analizados. El mismo resultado fue obtenido empleando la leche de los mismos establecimientos, con los antígenos recombinantes 85A y 85B (no mostrado). Probablemente la respuesta sea dependiente del *estatus* de los animales representados en ese tanque, ya que si el porcentaje de animales que responden al antígeno es baja, el efecto de dilución impide la detección de los anticuerpos. Nuestros resultados

muestran que, si bien es difícil de implementar la prueba en leche de tanque, la leche individual puede ser un material alternativo para demostrar la presencia de anticuerpos anti-ModD de MPTB con igual sensibilidad que con la muestra de suero bovino.

Los resultados de distintos estudios realizados tanto en infecciones naturales como experimentales demostraron la variabilidad de la respuesta inmunológica del bovino frente a la infección micobacteriana. Konstantin *et al.*, (1998) realizaron un seguimiento de la respuesta humoral en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* evaluando el reconocimiento de un panel de 12 antígenos recombinantes. Los autores observaron no sólo la variabilidad de respuesta entre animales, sino también en el perfil de respuesta en cada animal, dado que estos respondían a distintos antígenos durante el transcurso de la infección, o con distinta magnitud frente al mismo antígeno. Huda *et al.*, (2003) realizaron un seguimiento de la respuesta celular en animales con paratuberculosis subclínica. A partir del análisis de la liberación de  $\gamma$ IFN en 3 muestreos sucesivos a intervalos de 5-8 semanas y observaron que la respuesta celular era variable, no siempre sostenida en el tiempo, dificultando el diagnóstico certero con un solo muestreo del animal. También es importante mencionar el componente genético de la respuesta inmunológica. Un estudio realizado en Etiopía, mostró que los animales de distintas razas (zebú y Holstein) bajo las mismas condiciones de cría, tenían una respuesta de  $\gamma$ IFN diferencial estimulando con los mismos antígenos. Estas variaciones pueden ser atribuidas a los distintos alelos BoLA en las dos razas, que podrían determinar el reconocimiento diferencial de los antígenos micobacterianos (Ameni *et al.*, 2006).

Estos factores que se mencionaron implican, que la estrategia de implementar pruebas serológicas o celulares, basadas en antígenos recombinantes deben contemplar la selección de antígenos múltiples. El contar con el repertorio completo de los antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, contribuye al diseño racional de la mezcla antigénica recombinante candidato para el mejoramiento del diagnóstico de la enfermedad. Como resultado de la caracterización antigénica de este trabajo, surgen los antígenos GrpE y Map860 como buenos candidatos para el mejoramiento del diagnóstico basado en la estimulación *ex-vivo* de la respuesta celular y el antígeno ModD para el diagnóstico humoral.

## 6-CONCLUSIONES

En base a los resultados derivados del presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

-El sistema de expresión en fago  $\lambda$ , aunque con baja eficiencia permitió la identificación de antígenos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MPTB). Para el análisis inmunológico de la genoteca se utilizaron tanto sueros bovinos como sueros hiperinmunes murinos, constituyendo estos últimos, un sistema de evaluación más sensible dado que permitió detectar una mayor cantidad de antígenos.

- Demostramos que Lpp34 es una secuencia restringida al complejo *M. avium* y mostró un buen reconocimiento por parte de los animales infectados con MPTB. Sin embargo, la respuesta no resultó específica, consecuencia de la presencia de epítopes conservados en proteínas distintas de otras bacterias.

-Los anticuerpos dirigidos a una única proteína, son capaces de reconocer a la bacteria por el ensayo de inmunohistoquímica. Los anticuerpos dirigidos al antígeno Lpp34 recombinante, permitieron la detección de señal por inmunohistoquímica en el tejido de animales con paratuberculosis. Esto abre el camino al desarrollo de anticuerpos contra proteínas que presenten mayor especificidad para la optimización de las técnicas de diagnóstico de rutina.

-Es conveniente la utilización de un Derivado Proteico Purificado preparado a partir de la bacteria que produce la enfermedad. La utilización de una PPD elaborada a partir de un aislamiento de MPTB para el estudio de la respuesta celular permitió identificar animales paratuberculosos, no detectados por el antígeno de referencia, PPD aviar. La presencia de proteínas subespecie-específicas inductoras de la respuesta celular, como MAP860 en dicha mezcla podrían contribuir a mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo.

-Una proteína identificada previamente como exclusiva de la subespecie *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, Map860, fue evaluada en animales con paratuberculosis. La alta especificidad de la respuesta de los animales frente a este antígeno, lo hacen un antígeno promisorio para el diagnóstico de esta enfermedad.

-El empleo de mezclas antigénicas recombinantes mejora los niveles de estimulación de la respuesta de  $\gamma$ IFN, respecto del antígeno recombinante utilizado en forma individual. Esta estrategia permitió la obtención de niveles de respuesta superiores a aquellos alcanzados por estimulación con la mezcla antigénica de referencia PPDa.



-Los antígenos homólogos a los presentes en el complejo *M. tuberculosis* también resultaron estimulantes de la respuesta inmunológica celular y humoral en los animales con paratuberculosis. En esta enfermedad, LprG se comportó principalmente como un inductor de la respuesta celular y el antígeno ModD como inductor de la respuesta humoral.

- El estudio de la presencia de ortólogos descritos previamente en otras especies micobacterianas contribuye al conocimiento del repertorio antigénico de la micobacteria. Adicionalmente, la presencia de epítopes diferenciales en dichos ortólogos pueden contribuir a una respuesta específica capaz discriminar la paratuberculosis de la infección causada por otras micobacterias, incluida *M. bovis*. El antígeno ModD mostró un reconocimiento diferencial entre los rodeos infectados con MPTB y *M. bovis*.

-Los estudios de la respuesta humoral de los animales mediante la técnica de ELISA basado en el antígeno ModD recombinante, demostraron que si bien no es un antígeno inmunodominante, la frecuencia y niveles de respuesta humoral en una población infectada permiten el diagnóstico positivo del rodeo.

-Las muestras de leche pueden reemplazar a las muestras de suero para el ensayo serológico basado en la detección de anticuerpos anti-ModD. Dado que el resultado de la prueba de ELISA basado en el antígeno ModD recombinante fue concordante en ambos tipos de muestras.

-Se identificó al antígeno ModD como un componente mayoritario de la mezcla antigénica PPDa. Dado que ModD estimula también la respuesta Th1, la respuesta celular con la mezcla antigénica de referencia PPDa, puede ser consecuencia de la presencia de dicho antígeno en la mezcla.

-La respuesta del bovino involucra un reconocimiento antigénico amplio y variable. La estrategia experimental de sustitución de las mezclas antigénicas PPD con proteínas recombinantes, deberá cumplimentarse por la búsqueda y selección de múltiples antígenos. Esto permitirá el diseño racional de la combinación adecuada que posibilitará el diagnóstico sensible y específico de la paratuberculosis bovina.

## 7-BIBLIOGRAFIA

**Aho** A., McNulty A. y Coussens P. 2003. Enhanced expression of interleukin1- $\alpha$  and TRAF1 in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 71: 6479-6486.

**Alito** A., Romano M.I., Bigi F., Zumárraga M. y Cataldi A. 1999. Antigenic characterization of mycobacteria from South American wild seals. *Vet. Microbiol.* 68: 293-299.

**Allen** S., Sotos J., Sylte M. y Czuprynski C. 2001. Use of Hoechst 33342 staining to detect apoptotic changes in bovine mononuclear phagocytes infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*; 2:460-464.

**Amara** R. y Satchidanandam V. 1996. Analysis of a genomic DNA expression library of *Mycobacterium tuberculosis* using tuberculosis patient sera: Evidence for modulation of host immune response. *Infection and Immunity*; 64 (9): 3765-3771.

**Ameni** G., Aseffa A., Engers H., Young D., Hewinson G., y Vordermeier M. 2006. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. *Clin. Vaccine Immunology*; 13(9): 1030-1036

**Aranaz** A., Cousins D., Mateos A. y Domínguez L. 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 (6): 1785-9.

**Aranaz** A., Liébana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blázquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G. y Domínguez, L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (3): 1263-73.

**Banasure** K.D., Banasure K.D., Basagoudanavar S.H., Chaudhury P., Tiwari V., Parihar N.S. y Goswami P.P. 2001. Identification and characterization of a gene encoding a 35-kDa protein from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196: 195-199.

**Bannantine J.P.**, Huntley J.F., Miltner E., Stabel J.R. y Bermudez L.E. 2003. The *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 35 kDa protein plays a role in invasion of bovine epithelial cells. *Microbiology*; 149: 2061-2069.

**Bannantine J.**, Hansen J., Paustian M., Amonsin A., Li L., Stabel J. y Kapur V. 2004. Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 42 (1): 106-114.

**Batoni G.**, Esin S., Harris R.A., Kallenius G., Svenson S.B., Andersson R., Campa M. y Wigzell H. 1998. Gammadelta+ and CD4+ alphabeta+ human T cell subset responses upon stimulation with various *Mycobacterium tuberculosis* soluble extracts. *Clin. Exp. Immunol.* 112: 52-62.

**Bauerfeind R.**, Benazzi S., Weiss R., Schliesser T., Willems H. y Baljer G. 1996. Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to insertion element *IS900*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1617-1621.

**Benz I.** y Schmidt A. 2002. Never say never again: Protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology*; 45(2):267-276.

**Bernardelli A.**, Zumárraga M., Alonso B., Romano M.I., Gioffré A., Etchehoury I., Sanguinetti R., Zenobi C., Balzano R. Paratuberculosis in Mouflon (*Ovis musimon*). 2005. 8° International *Colloquium on Paratuberculosis*. Copenhagen, Dinamarca.

**Bigi F.**, Espitia C., Alito A., Zumárraga M., Romano M.I., Cravero S. y Cataldi A. 1997. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology*; 143, 3599-3605.

**Bigi F.**, Alito A., Romano M.I., Zumárraga M., Caimi K. y Cataldi A. 2000. P27 lipoprotein and a putative antibiotic resistance gene form an operon in *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *Microbiology*; 146:1011-1018.

**Bigi F.**, Gioffré A., Klepp L., Santangelo M.P., Alito A., Caimi K., Meikle V., Zumárraga M., Taboga O., Romano M.I. y Cataldi A. 2004. The knockout of the *lprG-Rv 1410* operon produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*; 6: 182-187.

**Bigi F.**, Gioffre A., Klepp L., Santangelo MP., Velicovsky C., Giambartolomei G., Fossati C., Romano M., Mendum T., McFadden J. y Cataldi A. Mutation in the P36 gene of *Mycobacterium bovis* provokes attenuation of the bacillus in a mouse model. 2005. Tuberculosis (Edinb). 85(4):221-6.

**Bisen P.**, Garg S., Tiwari R., Tagore R., Chandra R., Karnik R., Thaker N., Desai N., Ghosh P., Fraziano M. y Colizzi V. 2003. Analysis of the shotgun expression library of the *Mycobacterium tuberculosis* genome for immunodominant polypeptides: potential use in serodiagnosis. Clin. Diag. Lab. Immunology; 10 (6): 1051-1058.

**Boisvert H.** 1966. Identification of *Mycobacterium bovis*, BCG and *Mycobacterium microti*. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 111 (2): 180-192.

**Bonorino C.**, Nardi N.B., Zhang X. y Wysocki L.J. 1998. Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement. J. Immunol. 161: 5210-5216.

**Boom W.**, Chervenak K., Mincek M. y Ellner J. 1992. Role of the mononuclear phagocyte as an antigen-presenting cell for human gamma delta T cells activated by live *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 60(9): 3480-3488

**Bordier C.** 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J. Biol. Chem. 256: 1604-1607.

**Brooks B.**, Young N., Watson D., Robertson R., Sugden E., Nielsen K. y Becker S. 1991. *Mycobacterium paratuberculosis* antigen D: characterization and evidence that is a bacterioferritin. J. Clin. Microbiol. 29: 1652-1658.

**Brosch R.**, Gordon S., Garnier T., Eiglmeier K., Frigui W., Valenti P., Dos Santos S., Duthoy S., Lacroix C., Garcia-Pelayo C., Inwald J., Golby P., Nuñez Garcia J., Glyn Hewinson R., Behr M., Quail M., Churcher C., Barrell B., Parkhill J., y Cole S. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. PNAS; 104 (13), 5596–5601.

**Brown J.**, McDaniel H., Hornsny P. y Dreesen D. 1981. Sensitivity to avian purified protein derivative in cattle from farms having a high prevalence of swine mycobacteriosis. Appl. Environ. Microbiol. 41: 552-554.

- Bulut** Y., Michelsen K.S., Hayrapetian L., Naiki Y., Spallek R., Singh M. y Arditì M. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J. Biol. Chem.* 280: 20961-20967.
- Cameron** R., Stevenson K., Inglis N., Kalusen J. y Sharp J. 1994. Identification and characterization of a putative serine-proteasa expressed *in vivo* by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology* 140: 1977-1982.
- Chan** A.C., Irving B.A., Fraser J.D. y Weiss A. 1991. The zeta chain is associated with a tyrosine kinase and upon T-cell antigen receptor stimulation associates with ZAP-70, a 70-kDa tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9166-9170.
- Chang** C.C., Winter A.J. y Norcross N.L. 1981. Immune response in the bovine mammary gland after intestinal, local, and systemic immunization. *Infect. Immun.* 31(2): 650-659.
- Chanlun** A., Emanuelson U., Aiumlamai S. y Bjorkman C. 2006. Variations of *Neospora caninum* antibody levels in milk during lactation in dairy cows. *Vet. Parasitol.* 141(3-4):349-355.
- Chiodini** R., Van Kruiningen H., Merkal R., Thayer W. y Coutu J. 1984. Characteristic of unclassified *Mycobacterium* species isolated from patient with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 20: 966-971.
- Chiodini** R., Van Kruiningen H., Thayer W. y Coutu J. 1986. Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn disease. *J. Clin. Microbiol.* 24 (3): 357-363.
- Chiodini** R.J. y Hermon-Taylor J. 1993. The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 629-631.
- Chiodini** R. 1993a. The history of paratuberculosis (Johne's disease). A review of the literature 1895-1992. *Int. Assoc. Paratuberculosis, Inc. Publ:* 1- 658.
- Chiodini** R. 1993b. Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1956-1958.

- Cirone** K., Morsella C., Romano M. y Paolicchi F. 2007. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. Rev. Arg. Microbiol. 39: 57-68.
- Cobb** A. y Frothingham R. 1999. The GroES antigens of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. Veterinary Microbiology; 67, 31-35.
- Coetsier** C., Havaux X., Mattelard F., Sadatte S., Cormont F., Buergelt K., Limbourg B., Latinne D., Bazin H., Deneff J.-F., y Cocito C. 1998. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5:446-451.
- Cole** S., Davis Eisenach K., McMurray D. y Jacobs W (Eds.). 2005. Tuberculosis and the tubercle bacillus. ASM press. Washington DC.
- Cole** S., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. 3<sup>rd</sup>, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. y Barrell B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature; 393: 537-544.
- Collins** D., Gabric D., y de Lisle G. 1989. Identification of repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. 51: 175-178.
- Collins** M., Kenefick K., Sockett D., Lambercht R., McDonald J. y Jorgensen J. 1990. Enhanced radiometric detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by using filter-concentrated bovine faecal specimens. J. Clin. Microbiol. 28: 2514-2519.
- Collins** D., Gabric D. y De Lisle G. 1990b. Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 18: 1591-1596.
- Collins** D.M., Stephens D.M. y de Lisle G.W. 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Vet. Microbiol. 36: 289-299.

**Collins** M.T., Lisby G., Moser C., Chicks D., Christensen S., Reichelderfer M., Hoiby N., Harms B.A., Thomsen O.O., Skibsted U. y Binder V. 2000. Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in patients with inflammatory bowel disease and in controls. J. Clin. Microbiol. 38: 4373-4381.

**Collins** M., Wells S., Petrini C., Collins J., Schultz R. y Whitlock R. 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clin. Diag. Lab. Immunology; 12 (6): 685-692.

**Committee on Diagnosis and Control of Johne's disease.** 2003. Johne's disease and Crohn's disease. En: Diagnosis and Control of Johne's Disease. Report for the National Research Council of the National Academy of Science: 104-120. Washington DC, The National Academies Press.

**Constant** P., Poquet Y., Peyrat M.A., Davodeau F., Bonneville M. y Fournie J.J.. 1995. The antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG vaccine is an attenuated mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic antigens for human gamma delta T cells. Infect. Immun. 63: 4628-4633.

**Cousins** D.V., Williams S.N., Reuter R., Forshaw D., Chadwick B., Coughran D., Collins P. y Gales N. 1993. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. Aust. Vet. J. 70: 92-97.

**Cousins** D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumárraga M. y Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(5): 1305-14.

**Coussens** M.P. 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. Anim. Health Res. Rev. 2: 141-161.

**Coussens** P., Colvin A., Abouzied K., Wiersma K. y Sipkovsky S. 2002. Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells from cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Infect. Immun. 70: 5494-5502.

**Coussens P.**, Colvin C., Rosa, J., Perez-Laspuir J. y Elftman M. 2003. Evidence for a novel gene expression program in peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium paratuberculosis*-infected cattle. *Infect. Immun.* 71: 6487-6498.

**Coussens P.**, Verman N., Coussens M. y McNulty A. 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues from cattle infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun.* 72: 1409-1422.

**Coussens P.** 2004a. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun.* 72: 3089-3096.

**Crohn B.B.**, Ginzburg L. y Oppenheimer G.D. 1932. Regional ileitis, a pathologic and clinical entity. *J. Am. Med. Assoc.* 99: 1323-1329.

**Daffé M.** y Draper P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 131-203.

**Danborn C.J.** y Grange J.M. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* 149(5): 405-17.

**Davenport M.P.**, McKenzie K.R., Basten A. y Britton W.J. 1992. The variable C-terminal region of the *Mycobacterium leprae* 70-kilodalton heat shock protein is the target for humoral immune responses. *Infection and Immunity*; 60: 1170-1177.

**de Echaide S.**, Bono M., Lugaresi C., Aguirre N., Mangold A., Moretta R., Farber M. y Mondillo C. 2005. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 10;106(3-4):287-292.

**De Kesel M.**, Gilot P., Coene M y Cocito C. 1992. Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 36: 201-212.

**De Kessel M.**, Gilot P., Misonne M., Coene M. y Cocito C. 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 (4): 947-954.



**Dietrich J.**, Vingsbo C. y Andersen P. 2006. TB vaccine strategies-What is needed to solve a complex problem?. *Tuberculosis* 86, 163-168.

**Dillon D.C.**, Alderson M.R., Day C.H., Bement T., Campos-Neto A., Skeiky Y.A., Vedvick T., Badaro R., Reed S.G. y Houghton R. 2000. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3285-3290.

**Eaton T.**, Falkinham J.O., Aisu T.O. y Daniel T.M. 1995. Isolation and characteristics of *Mycobacterium avium* complex from water and soil samples in Uganda. *Tuber. Lung. Dis.* 76: 570-574.

**Eckstein T.**, Chandrasekaran S., Mahapatra S., McNeill M., Chatterjee D., Rithner C., Ryan P., Belisle J. y Inamine J. 2006. A major cell wall lipopeptide of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 281:5209-5215.

**El-Zaatari F.**, Naser S., Engstrand L., Hachem C. y Gram. D. 1994. Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E. coli*. *Current Microbiology*; 29, 177-184.

**El-Zaatari F.**, Naser S., y Graham D. 1997. Characterization of a specific *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant clone expressing 35,000-molecular-weight antigen and reactivity with sera from animals with clinical and subclinical Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 35 (7): 1794-1799.

**Espitia, C.**, y Mancilla R., 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteins antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 77:378-383.

**Espitia C.**, Espínola R., Saavedra R., Mancilla R., Romain F., Laqueyrierie A. y Moreno C. 1995. Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50 to 55 kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45 to 47 kilodalton antigens. *Infect. Immun.* 63: 580-584.

**European Commission. Directorate-General Health and Consumer Protection.** Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis. 2000. Reporte del *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*. Disponible en [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out38\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out38_en.pdf)

**Falkinham** J.O. 3<sup>rd</sup>. 2002. Nontuberculous mycobacteria in the environment. Clin. Chest. Med. 23: 529-551.

**Finn** R.D., Mistry J., Schuster-Böckler B., Griffiths-Jones S., Hollich V., Lassmann T., Moxon S., Marshall M., Khanna A., Durbin R., Eddy S.R., Sonnhammer E.L.L. y Bateman A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. Nucleic Acids Research; 34: D247-D251.

**Fleischman** R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J., DeBoy R., Dodson R., Gwinn M., Haft D., Hickey E., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T., Weidman J., Khouri H., Gill J., Mikula A., Bishai W., Jacobs Jr. W.R. Jr., Venter J.C. y Fraser C.M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J. Bacteriol. 184: 5479-5490.

**Flesch** I.E. y Kaufmann S.H. 1994. Role of macrophages and alpha beta T lymphocytes in early interleukin 10 production during *Listeria monocytogenes* infection. Int. Immunol. 6: 463-468.

**Flynn** J.L. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. Tuberculosis; 84: 93-101.

**Garnier** T., Eiglmeier K., Camus J., Medina N., Mansoor H., Pryor M., Duthoy S., Grondin S., Lacroix C., Monsempe C., Simon S., Harris B., Atkin R., Dogget J., Mayes R., Keating L., Wheeler P., Parkhill J., Barrell B., Cole S., Gordon S. y Hewinson R. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS; 100 (13): 7877-7882.

**Ge** F., Qiu Y., Gao X., Yang, Y. y Chen P. 2006. Fusion expression of major antigenic segment of JEV E protein-hsp70 and the identification of domain acting as adjuvant in hsp70. Vet. Immunol. Immunopathol. 113: 288-296.

**Gehring** A., Dobos K., Beslile JT., Harding C. y Boom, W. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR- 2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. J. Immunol. 173 (4): 2660-2668.

**Gilot** P. y Cocito C. 1993. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. FEMS Microbiol. Lett. 110: 307-311.

**Gómez**, M. y Smith I. 2000. Determinants of mycobacterial gene expression. En: Molecular

Genetics of Mycobacteria. Hatfull H. y Jacobs W. R. Jr (eds.), pp. 111–129. ASM Press, Washington,DC.

**Grandi G.** 2001. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. Trends in Biotechnology, 19 (5): 181-188.

**Grant I.R., Hitchings E.I., McCartney A., Ferguson F. y Rowe M.T.** 2002. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cow's milk. Appl. Environ. Microbiol. 68: 602-607.

**Grant I.** 2005. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. J. Applied Microbiol. 98: 1282-1293.

**Greig A., Stevenson K., Henderson D., Perez V., Hughes V., Pavlik I., Hines M.E.** 2nd, McKendrick I. y Sharp J.M. 1999. Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland. J. Clin. Microbiol. 37: 1746-1751.

**Hansen K.R., Nielsen L.R. y Lind P.** 2006. Use of IgG avidity ELISA to differentiate acute from persistent infection with *Salmonella* Dublin in cattle. J. Appl. Microbiol. 100(1): 144-52.

**Harris B. y Barletta R.** 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clin. Microbiol. Reviews; 14 (3): 489-512.

**Hermon-Taylor J.** 2001. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: the nature of the problem. Food Control; 12: 331-334.

**Hofmann K. y Stoffel W.** 1993. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166.

**Hope A.F., Tulk P.A. y Condrón R.J.** 1996. Investigation of the thermal death of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. In Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Colloquium on Paratuberculosis, pag. 372-382. International Association for Paratuberculosis. Madison, WI, USA.

**Hovav A., Mullerad J., Davidovitch L., Fishman Y., Bigi F., Cataldi A. y Bercovier H.** 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27- kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. Infect Immun. 71 (6) : 3146-54.

**Hovav** AH., Davidovitch L., Nussbaum G., Mullerad Jishman Y. y Bercovier H. 2004. Mitogenicity of the recombinant mycobacterial 27-kilodalton lipoprotein is not connected to its antiprotective effect. *Infect Immun.* 72(6):3383-3390.

**Huda** A., Lind P., Christoffersen A., Jungersen G. 2003. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet. Immunol. Immunopathology*; 94: 95-103.

**Huntley** J., Stabel J. y Bannantine J. 2005. Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19 kDa lipoprotein. *BMC Microbiology*; 5:3 doi: 10.1186/1471-2180-5-3. Disponible en <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/3>

**Inglis** N., Stevenson K., Hosie H. y Sharp J. 1994. Complete sequence of the gene encoding the bacterioferritin subunit of *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*. *Gene*; 150: 205-206.

**Jacobson**, R. H. 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17:469–486.

**Jark** U., Ringena B., Franz B., Gerlach F., Beyerbach M. y Franz B. 1997. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* 57: 189-198.

**Jungersen** G., Huda A., Hansen J.J. y Lind P. 2002. Interpretation of the Gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 453-460.

**Kabelitz** D., Glatzel A. y Wesch D. 2000. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122: 1-7.

**Kantor** I.N. 1988. *Bacteriología de la Tuberculosis Humana y Animal*. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS.

**Kaplan** G., Gandhi R.R., Weinstein D.E., Levis W.R., Patarroyo M.E., Brennan P.J. y Cohn Z.A. 1987. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation *in vitro*. *J. Immunol.* 138: 3028-3034.

**Karakousis** P., Bishai W. y Dorman S. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*; 6(2), 105–116.

**Koets A.**, Rutten V., Bakker D., van Zijderverld F., Muller K. y van Eden W. 1999. Heat-shock-protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 70 (1-2): 105-115.

**Koets A.**, Ruten V., de Boer M., Bakker D., Valentin Weigand P. y van Eden W. 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): 1492-1498.

**Koets A.**, Hoek A., Langelaar M., Overdijk M., Santema W., Franken P., Eden W. y Rutten V. 2006. Mycobacterial 70 kD heat-shock protein is an effective subunit vaccine against bovine paratuberculosis. *Vaccine*; 24: 2550-2559.

**Konstantin L.**, Pollock J., Colangeli R., Gennaro ML. 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Inf. Immun.* 66 (11): 5344–5349

**Korhonen H.**, Marnila P, y Gill H.S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br. J. Nutr.* 84 1:S75-80.

**Kremer K.**, van Soolingen K., van Embden J., Hughes S., Inwald J. y Hewinson G. 1998. *Mycobacterium microti*: More widespread than previously thought. *J. Clin. Microbiol.* 36: 92793-2794.

**Krogh A.**, Larsson B., von Heijne G. y Sonnhammer L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*; 305 (3): 567-580.

**Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*; 227:680-685.

**Langelaar M.**, Hope J., Rutten V., Noordhuizen J., van Eden W. y Koets A. 2005. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recombinant heat shock protein 70 interaction with different bovine antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.* 61 (3): 242-250.

**Laqueyrie** A., Militzer P., Romain F., Eiglmeier K., Cole S. y Marchal G. 1995. Cloning, sequencing and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47 kilodalton secreted antigen complex. *Infection and Immunity*; 63: 4003-4010.

**Lara** M., Servín-Gonzalez L., Singh M., Moreno C., Cohen I., Nimtz M. y Espitia C. 2004. Expression, secretion and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 679-685.

**Lee** B., Hefta S. y Brennan P. 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 60 (5): 2066-2074.

**Lee** H., Stabel J.R. y Kehrl M.E. Jr. 2001. Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82: 73-85.

**Li** L., Bannantine J.P., Zhang Q., Amonsin A., May B.J., Alt D., Banerji N., Kanjilal S. y Kapur V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PNAS*; 102: 12.344-12.349.

**Lombard** J., Byrem T., Wagner B. y McCluskey B. 2006. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(5): 448-458.

**Maeda** N., Nigou J., Herrmann J.L., Jackson M., Amara A., Lagrange P.H., Puzo G., Gicquel B. y Neyrolles O. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* 278: 5513-5516.

**Marchler-Bauer** A., Anderson J.B., Cherukuri P.F., DeWeese-Scott C., Geer L.Y., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thiessen P.A., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D. y Bryant S.H. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* 33:D192-196.

**Marmiesse** M., Brodin P., Buchrieser C., Gutierrez C., Simoes N.,<sup>2</sup> Vincent V., Glaser P., Cole S., y Brosch R. 2004. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex *Microbiology*; 150: 483-496

**Marri P.**, Bannantine J. y Golding G. 2006. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 906–925.

**Marsh I.**, Bannantine J., Tizard M. y Whittington R. 2005. Genomic and proteomic comparative study of the sheep and cattle strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Proceedings of 8ICP. Copenhagen, Denmark. Editor: E. Manning Nielsen S. 381-392.

**Mazanec M.**, Coudret C. y Fletcher D. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. 1995. *J. Virol.* 69:1339-1343.

**McFadden J.**, Butcher P., Chiodini R. y Hermon T. 1987. Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 25: 796-801.

**McFadden J.J.** y Fiddler H.M. 1996. Mycobacteria as possible causes of sarcoidosis and Crohn's disease. *Soc. Appl. Bacteriology Symp. Ser.* 25: 47S-52S.

**Mehrotra J.**, Mittal A., Dhindsa M. y Sinha S. 1997. Fractionation of mycobacterial integral membrane proteins by continuous elution SDS-PAGE reveals the immunodominance of low molecular weight subunits for human T cells. *Clinical & Experimental Immunology*; 109 (3), 446-450.

**Mijs W.**, de Haas P., Rossau R., Van Der Laan T., Rigouts L., Portaels F. y van Soolingen D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates an '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*; 52: 1505-1518.

**Momotani E.**, Whipple D.L., Thiermann A.B. y Cheville N.F. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25: 131-137.

**Monaghan M.L.**, Doherty M.L., Collins J.D., Kazda J.F. y Quinn P.J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40: 111-124.

**Moreira** A.R., Paolicchi F., Morsella C., Zumárraga M., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Overdum P., van Soolingen D. y Romano M.I. 1999. Distribution of *IS900* restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet. Microbiol.* 70: 251-259.

**Motiwala** A.S., Janagama H.K., Paustian M.L., Zhu X., Bannantine J.P., Kapur V. y Sreevatsan S. 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect. Immun.* 74: 6046-6056.

**Mullerad** J., Hovav A.H., Fishman Y., Barletta R.G. y Bercovier H. 2002. Antigenicity of *Mycobacterium paratuberculosis* superoxide dismutase in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 81-88.

**Mustafa** A. y Shaban F. 2005. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 86 (2):115-124.

**Mutharia** L.M., Moreno W. y Raymond M. 1997. Analysis of culture filtrate and cell wall-associated antigens of *Mycobacterium paratuberculosis* with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 65: 387-394.

**Nackmoon** S., Takayama K. y Collins M.T. 2004. Possible association of GroES and antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environmental Microbiology*; 70: 1688-1697.

*National Association for colitis and Crohn's disease*. 2003. Reporte de expertos del NACC. Disponible en <http://www.nacc.org.uk/downloads/MApver9.pdf>

**Nagata** R., Muneta Y., Yoshihara K., Yokomizo Y. y Mori Y. 2005. Expression and cloning of gamma interferon-inducing antigens of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*; 73(6): 3778-3782.

**Naser** S.A., Schwartz D. y Shafran I. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 95: 1094-1095.



**Niemann S.**, Richter E. y Rusch-Gerdes S. 2002. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 433-436.

**OIE (2007).** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Capítulo 1.1.3. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Disponible en: [http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A\\_00013.htm](http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_00013.htm)

**Okada M.**, Kita Y., Nakajima T., Kanamaru N., Hashimoto S., Nagasawa T., Kaneda Y., Yoshida S., Nishida Y., Fukamizu R., Tsunai Y., Inoue R., Nakatani H., Namie Y., Yamada J., Takao K., Asai R., Asaki R., Matsumoto M., McMurray D., Dela Cruz E., Tan E., Abalos R., Burgos J., Gelber R. y Sakatani M. 2007. Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine*; 20;25(16):2990-2993.

**Olsen I.**, Reitan L., Holstad G. y Wiker H. 2000. Alkyl hidroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* 68: 801-808.

**O'Reilly C.E.**, O'Connor L., Anderson W., Harvey P., Grant I.R., Donaghy J., Rowe M. y O'Mahony P. 2004. Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5138-5144.

**Osterstock J.B.**, Fosgate G.T., Norby B., Manning E.J., Collins M.T. y Roussel A.J. 2007. Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230: 896-901.

**Paolicchi F.**, Zumárraga M., Gioffré A., Zamorano P., Morsella C., Verna A., Cataldi A. y Romano M.I. 2003. Different methods for the diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a dairy cattle herd in Argentina. *J. Vet. Medicine "B"*; 50: 20-26.

**Paolicchi F.**, Vagnozzi A., Morsella C., Verna A., Massone A., Porstiansky E., Gimeno E. 2001. Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus*): an immunohistochemical study. *J. Vet. Medicine "B"*. 48(4): 241-340.

**Pavlik I.**, Bejckova L., Pavlas M., Rozsypalova Z. y Koskova S. 1995. Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* 45: 311-318.

**Pavlik I.**, Horvathova A., Dvorska L., Bartl J., Svastova P., du Maine R. y Rychlik I. 1999. Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Microbiol. Methods.* 38: 155-167.

**Pavlik I.**, Bartl J., Dvorska L., Svastova P., du Maine R., Machackova M., Yayo Ayele W. y Horvathova A. 2000. Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995-1998. *Vet. Microbiol.* 77: 231-251.

**Pessolani M.**, Smith D., Rivoire B., McCormick J., Hefta S., Cole S. y Brennan P. 1994. Purification, characterization, gene sequence and significance of a bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*. *J. Exp. Med.* 180: 319-327.

**Pfyffer G.E.**, Auckenthaler R., van Embden J.D. y van Soolingen D. 1998 *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 4 (4): 631-4.

**Primm T.**, Lucero C. y Falkinham III O. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin. Microb. Rev.* 17 (1): 98-106.

**Qamra R.**, Mande S., Coates A. y Henderson B. 2005. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*; 85: 385-394.

**Radosevich T.**, Reinhardt T., Lippolis J., Bannantine J. y Stabel J. 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.

**Ratliff T.**, McCarthy W., Telle W. y Brown E. 1993. Purification of a mycobacterial adhesin for fibronectin. *Infect Immun.* 61: 1889-1894.

**Roholl P.**, Herrewegh A. y van Soolingen D. 2002. Positive *IS900 in situ* hybridization signals as evidence for role of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in etiology of Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3112-3113.

**Romain F.**, Laqueyrie A., Militzer P., Pescher P., Chavarot P., Lagranderie M., Auregan G., Gheorghiu M. y Marchal G. 1993. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect. Immun.* 61: 742-750.

**Romain F.**, Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., Barzu O. y Marchal G. 1999. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses. *Infect. Immun.* 67: 5567-5572.

**Romano M.I.**, Alito A., Bigi F., Fisanotti J.C. y Cataldi A. 1995. Genetic characterization of mycobacteria from South American wild seals. *Vet. Microbiol.* 47: 89-98.

**Rosenkrands I.**, King A., Weldingh K., Moniatte M., Moertz E. y Andersen P. 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*; 21: 3740-3756.

**Rosseels V.**, Marché S., Roupie V., Govaerts M., Godfroid J., Walravens K. y Huygen K. 2006. Members of the 30- to 32 kilodaltons Mycolil Transferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are immunodominant th1 type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Inf. Immun.* 74(1): 202-212.

**Ryan P.**, Bennett M.W., Aarons S., Lee G., Collins J.K., O'Sullivan G.C., O'Connell J. y Shanahan F. 2002. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection. *Gut*; 51: 665-670.

**Sambrook J.**, Fritsch E. y Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2ª edición.

**Sandor M.**, Weinstock J. y Wynn T. 2003. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends in Immunology*; 24(1): 44-52.

**Sathish M.**, Esser R.E., Thole J.E. y Clark-Curtiss J.E. 1990. Identification and characterization of antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* that react with antibodies in sera of leprosy patients. *Infect. Immun.* 58: 1327-1336.

**Schorey J.**, Li Q., McCourt D., Bong-Mastek M., Clark-Curtiss J., Ratliff T. y Brown E. 1995. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infection and Immunity*; 63: 2652-2657.

**Schorey J.**, Holsti M., Ratliff T., Allen P. y Brown E. 1996. Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Molecular Microbiology*; 21 (2), 321-329.

**Schultz J.**, Milpetz F., Bork P. y Ponting C.P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5857-5864.

**Sechi L.**, Mura M., Lissia A., Fadda G. y Zanetti S. 2001. Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4514-4517.

**Sechi L.**, Mura M., Tanda E., Lissia A., Fadda G. y Zanetti S. 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples of Crohn's disease patients. *Microbiologica*; 27: 75-77.

**Sechi L.A.**, Gazouli M., Ikononopoulos J., Lukas J.C., Scanu A.M., Ahmed N., Fadda G. y Zanetti S. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, genetic susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the way ahead. *J. Clin. Microbiol.* 44: 1204-1205.

**Sechi L.**, Niyaz A., Felis G., Duprè I., Cannas S., Fadda G., Bua A. y Zanetti S. 2006. Immunogenicity and cytoadherence of recombinant heparin binding haemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Functional promiscuity or a role in virulence?. *Vaccine*; 24, 236-243.

**Sechi L.**, Mara L., Cappai P., Frothingam R., Ortu S., Leoini A., Ahmed N. y Zanetti S. 2006b. Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 response type immune response in lans and protects against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Vaccine*; 24: 229-235.

**Secott T.**, Lin L. y Wu C. 2001. Fibronectin attachment protein homologue mediates fibronectin binding by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infection and Immunity*; 69 (4): 2075-2082.

**Senaratne R.H.**, Mobasheri H., Papavinasundaram K.G., Jenner P., Lea E.J. y Draper P. 1998. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Bacteriol.* 180: 3541-3547.

**SENASA.** 2000. Manual de Actualización en tuberculosis bovina. Subcomisión Nacional de tuberculosis bovina. Ed. Isabel Kantor.

**Sharp S.E.**, Lemes M., Erlich S.S. y Poppiti R.J. Jr. 1997. A comparison of the Bactec 9000MB system and the Septi-Chek AFB system for the detection of mycobacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28: 69-74.

**Shin S.**, Yoo H., McDonough S., Chang Y. 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(2):111-117.

**Sigur-Dardottir O.G.**, Press C.M. y Evensen O. 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet. Pathol.* 38: 184-189.

**Silva P.**, Bigi F., Santángelo M. de la P., Romano M. I., Martin C., Cataldi A. y Ainsa J. 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45 (3): 800-804.

**Stabel J.** 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microb.* 77: 465-473.

**Stabel J.**, Wells S., y Wagner B. 2002. Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test. Results for Johne's Disease in US Dairy Herds. *J. Dairy Sci.*; 85:525-531

**Stahl P.** y Ezekowitz R. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 50-55.

**Stevenson K.**, Inglis N.F., Rae B., Donachie W. y Sharp J.M. 1991. Complete nucleotide sequence of a gene encoding the 70 kd heat shock protein of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res. 19: 4552.

**Stewart G.R.**, Snewin V.A., Walzl G., Hussell T., Tormay P., O'Gaora P., Goyal M., Betts J., Brown I.N. y Young D.B. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. Nat. Med. 7: 732-737.

**Streeter R.N.**, Hoffsis G.F., Bech-Nielsen S., Shulaw W.P. y Rings M. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. 56: 1322–1324.

**Sudhir S.**, Kosalai K., Arora S., Namane A., Sharma P., Gaikwad, A., Brodin P. y Cole S. 2005. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by Proteomics. Microbiology; 151, 2411–2419.

**Sugden E.**, Corner A., Samagh B., Brooks B., Turcotte J., Nielsen K., Stewart R. y Duncan J. 1989. Serodiagnosis of ovine paratuberculosis using lipoarabinomana in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 6, 850-854.

**Sugden E.**, Brooks B., Young N., Watson D., Nielsen K., Corner A., Turcotte C., Michaelides A. y Stewart B. 1991. Chromatographic purification and characterisation of Antigens A and D from *Mycobacterium paratuberculosis* and their use in enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of paratuberculosis in sheep. J. Clin. Microbiol. 29: 1659-1664.

**Sugden E.**, Stilwell K. y Michaelides A. 1997. A comparison of lipoarabinomannan with other antigens used in absorbed enzyme immunoassays for the serological detection of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. 9:413–417.

**Sung S.**, Chang C., Chang C., McDonough S., Thompson B., Yoo H y Chang Y. 2005. *In vitro* cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Inf. Immun. 73(8): 5074-5085.

**Sutcliffe I.C.** y Harrington D.J. 2002. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. Microbiology; 148: 2065-2077.

**Sweeney** R.W., Whitlock R.H. y Rosenberger A.E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. 30: 166–171.

**Tailleaux** L., Schwartz O., Herrmann J.L., Pivert E., Jackson M., Amara A., Legres L., Dreher D., Nicod L.P., Gluckman J.C., Lagrange P.H., Gicquel B. y Neyrolles O. 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. J. Exp. Med. 197: 121-127.

**Telenti** A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E.C. y Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 31 (2): 175-8.

**Thoen** C.O., Mills K. y Hopkins M.P. 1980. Enzyme-linked protein A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculosis exotic animals. Am. J. Vet. Res. 41(5): 833-835.

**Thole** J., Dauwerse H., Das P., Groothuis D., Schouls L. y van Embden J. 1985. Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigens in *Escherichia coli*. Infection and Immunity; 50: 800-806.

**Thole** J.E., Schoningh R., Janson A.A., Garbe T., Cornelisse Y.E., Clark-Curtiss J.E., Kolk A.H., Ottenhoff T.H., De Vries R.R. y Abou-Zeid C. 1990. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. Mol. Microbiol. 6: 153-163.

**Thorel** M.F., Krichevsky M. y Levy-Frebault V.V. 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 254–260.

**Tortoli** E., Rindi L., García M.J., Chiaradonna P., Dei R., Garzelli C., Kroppenstedt R.M., Lari N., Mattei R., Mariottini A., Mazzarelli G., Murcia M.I., Nanetti A., Piccoli P y Scarparo C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1277-1285.

**Trias** J., Jarlier V. y Benz R. 1992. Porins in the cell wall of mycobacteria. Science; 258: 1479-1481.

- Triccas J.**, Winter N., Roche P., Gilpin A., Kendrick K. y Britton W. 1998. Molecular and immunological analysis of the *Mycobacterium avium* homolog of the immunodominant *Mycobacterium leprae* 35-kilodalton protein. *Infection and Immunity*; 66 (6): 2684-2690.
- Turenne C.**, Semret M., Cousins D., Collins D. y Behr M. 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subset of the *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2): 433-440.
- VanderVen B.C.**, Harder J.D., Crick D.C. y Belisle J.T. 2005. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science*; 309: 941-943.
- van Embden J.D.**, van Soolingen D., Small P.M. y Hermans P.W. 1992. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Res. Microbiol.* 143 (4): 385-91.
- van Soolingen D.**, Hoogenboezem T., de Haas P.E., Hermans P.W., Koedam M.A., Teppema K.S., Brennan P.J., Besra G.S., Portaels F., Top J., Schouls L.M. y van Embden J.D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (4): 1236-45.
- van Soolingen D.**, van der Zanden A., de Haas P., Noordehoek G., Kiers A., Foudraine N., Portaels F., Kolk A., Kremer K. y van Embden J. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 36 (7): 1840-1845.
- Vansnick E.**, Vercammen F., Bauwens L., D'Haese E., Nelis H. y Geysen D. 2005. A survey for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the Royal Zoological Society of Antwerp. *Vet. J.* 170: 249-256.
- Vannuffe P.**, Gilot P., Limbourg B., Naerhuyzen B., Dieterich C., Coene M., Machtelinckx L. y Cocito C. 1994. Development of species-specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Johne's Disease in Cattle. *J. Clin. Microbiol.* 32(5): 1211-1216.
- Vanzini V.**, Aguirre N., Lugaresi C., de Echaide S., de Canavesio V., Guglielmone A., Marchesino M. y Nielsen K. 1998. Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 1; 36(3):211-217.
- von Heijne G.** 1989. The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Eng.* 2: 531-534.



**Vordermeier H.**, Whelan A., Cockle P., Farrant L., Palmer N. y Hewinson R. 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.* 3:571-378.

**Vordermeier M.**, Whelan A. y Hewinson G. 2003. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infection and Immunity*; 71 (4): 1980-1987.

**Walravens K.**, Marché S., Rosseels V., Wellemans V., Boelaert F., Huygen K. y Godfroid J. 2002. IFN- $\gamma$  diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet. Immun. Immunopathology*; 87 (3-4): 401-406.

**Weiss D.J.**, Evanson O.A., McClenahan D.J., Abrahamsen M.S. y Walcheck B.K. 2001. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 69: 1002-1008.

**Weiss D.J.**, Evanson O.A., Moritz A., Deng M.Q. y Abrahamsen M.S. 2002. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 70: 5556-5561.

**Welsh M.D.**, Kennedy H.E., Smyth A.J., Girvin R.M., Andersen P. y Pollock J.M. 2002. Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 70: 6114-6120.

**Wentink G.H.**, Bongers J.H., Zeeuwen A.A. y Jaartsveld FH. 1994. Incidence of paratuberculosis after vaccination against *M. paratuberculosis* in two infected dairy herds. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41: 517-522.

**Wiele B.**, van Agterveld M., Janson A., Clark-Curtiss J.E., Rinke de Wit T.F., Harboe M. y Thole J. 1994. Characterization of a *Mycobacterium leprae* antigen related to the secreted *Mycobacterium tuberculosis* protein MPT32. *Infect. Immun.* 62: 252-258.

**Whipple D.**, Calliham L. y Jarnagin J. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3: 368-373.

**Whittington** R.J., Marshall D.J., Nicholls P.J., Marsh I.B. y Reddacliff L.A. 2004. Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 70: 2989-3004.

**Whittington** R.J., Marsh I.B. y Reddacliff L.A. 2005. Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. Appl. Environ. Microbiol. 71:5304-5308.

**WHO/FAO/OIE**. 2004. Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases (pg. 54). Switzerland.

**Wilks** C., Taylor T., Russel E. y Thurston T. 1981. Isolation of mycobacteria inducing cross-reaction in the complement fixation test for Johne's disease. Res. Vet. Sci. 30: 323-327.

**Wood** P., Corner L. y Plackett P. 1990. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of interferon-gamma. Res. Vet. Sci. 49: 46-49.

**Wood** P., Corner L., Rothel J., Ripper J., Fifis T., McCormick B., Francis B., Melville L., Small K., Dewitte K., Tolson J., Ryan T., De Lisle G., Cox C. y Jones S. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology; 31: 71-79.

**Wu** C., Secott T. y Lin T. 2005. Identification and subspeciation of *Mycobacterium avium* complex isolates by PCR amplification of a fibronectin-attachment protein gene element. Proceedings of 8ICP. Copenhagen, Denmark. Editor: E. Manning Nielsen S. 381-392.

**Xiaofei** L., Feng Z., Harris B., Cirillo J., Bercovier H. y Barletta R. 2001. FEMS Microbiol. Letters; 202, 233-238.

**Yayo Ayee** W., Machacková M. y Pavlík I. 2001. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet. Med.-Czech; 46 (7-8): 205-224.

**Young** R., Bloom B., Grosskinsky C., Ivanyi J., Thomas D. y Davis R. 1985a. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigen using recombinant DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82: 2583-2587.

**Young** R., Mehra V., Sweetser D., Buchanan T., Clark-Curtiss J., Davis R. y Bloom B. 1985b. Genes for the major antigens of the leprosy parasite. Nature (London); 326: 450-452.

**Young D.B.**, Kent L. y Young R.A. 1987. Screening of a recombinant mycobacterial DNA library with polyclonal antiserum and molecular weight analysis of expressed antigens. *Infect. Immun.* 55: 1421-1425.

**Young D.**, Lathigra R., Hendrix R., Sweetser D. y Young R.A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 85: 4267-4270.

**Zinsser**, Joklik, Willett, Amos. *Zinsser Microbiología*. 18ª edición. Ed. Médica Panamericana.

**Zumárraga M.J.**, Bernardelli A., Bastida R., Quse V., Loureiro J., Cataldi A., Bigi F., Alito A., Castro Ramos M., Samper S., Otal I., Martín C. y Romano M.I. 1999. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. *Microbiology*; 145 (9): 2519-26.

**Zumárraga M.J.**, Resoagli E.H., Cicuta M.E., Martínez A.R., Ortiz de Rott M.I., de Millan S.G., Caimi K., Gioffré A., Alito A., Bigi F., Cataldi A.A. y Romano M.I. 2001. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (PRA) of *Mycobacterium leprae* from human lepromas and from a natural case of an armadillo of Corrientes, Argentina. *Int. J. Lepr. and other mycobac. Diseases*; 69 (1): 21-25.

**Zumárraga M.J.**, Meikle V., Bernardelli A., Abdala A., Tarabla H., Romano M.I. y Cataldi A. 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 232-238.