Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dra. Angara H. Zambrano
Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias

Profesor Copatrocinante
Dr. Juan D. Kruze
Instituto de Microbiología
Facultad de Ciencias

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de ***Licenciado en Bioquímica*** y Título Profesional de ***Bioquímico***

MARÍA CLARA JARA WILDE

VALDIVIA – CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a toda la gente del Instituto de Microbiología, que me recibió y acogió durante estos meses. Especialmente a la Dra. Zambrano y al Dr. Kruze quienes me dieron la oportunidad de realizar mi tesis como parte del proyecto que ellos desarrollan.

También quiero agradecer muy especialmente a todos mis amigos y compañeros que compartieron conmigo estos 7 años. Sin ellos no habría sido tan entretenido. Gracias Magaly, Annette, Annesi, Jocelyn, Carlos, Franz y Paula.

A mis amigos en el laboratorio, con los cuales compartí innumerables momentos de alegría y que hicieron que este tiempo sea inolvidable: Mónica, Loretto, Angara, Armin, Paulina y Nancy.

Muy especialmente quiero agradecer a mi familia, que me entregó las herramientas que me permitieron llegar hasta aquí.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1050639.

Para Jarita, un padre maravilloso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Materiales	16
3.1.1 Reactivos químicos	16
3.1.2 Instrumentos	18
3.1.3 Material biológico	19
3.1.3.1 Cepas micobacterianas	19
3.1.3.2 Sueros bovinos	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Cultivo de micobacterias y curvas de crecimiento	21
3.2.2 Dilución y preadsorsión de sueros	22
3.2.3 Obtención de proteínas de *Map*	23
3.2.4 Determinación de proteínas de *Map*	23
3.2.5 Isoelectroenfoque (IEF)	24
3.2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	26
3.2.7 Inmunodetección	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Cultivos líquidos y curvas de crecimiento	28
4.2 Patrones inmunogénicos en una dimensión	34

4.2.1 Determinación de proteínas inmunogénicas pertenecientes al FC de la cepa de referencia de *Map* 34

4.2.2 Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con suero pre-adsorbido con *M. phlei* y suero negativo 36

4.2.3 Determinación de proteínas inmunogénicas pertenecientes a los FC de la cepa de campo de *Map* 36

4.2.4 Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* con suero pre-adsorbido con *M. phlei* y suero negativo 42

4.3 Patrones inmunogénicos en electroforesis bidimensional 42

4.3.1 Patrón inmunogénico bidimensional de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* 42

4.3.2 Patrón inmunogénico bidimensional de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* 45

5. DISCUSIÓN 49

6. BIBLIOGRAFIA 57

7. ANEXOS 73

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1: Cultivos líquidos en medio Middlebrook 7H9-OADC 29

Figura 2: Cultivos de *Map* 30

Figura 3: Curva de crecimiento de la cepa de campo de *Map* 31

Figura 4: Curva de crecimiento de la cepa de referencia de *Map* 32

Figura 5: Curva de crecimiento de *M. phlei*. 33

Figura 6: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con sueros positivos. 35

Figura 7: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con sueros pre-adsorbido y negativo. 37

Figura 8: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* con sueros positivos 39

Figura 9: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo *de Map* con sueros pre-absorbido y negativo 43

Figura 10: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero positivo 44

Figura 11: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero negativo 46

Figura 12: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero positivo 47

Figura 13: Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* separadas por electroforesis bidimensional, con suero negativo 48

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla1: Características de los sueros utilizados para los ensayos de Inmunodetección 20

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA : Albúmina sérica de bovino

EDTA : Acido etilendiamino tetracético

ELISA : Enzimo inmuno ensayo

FC : Filtrado de cultivo líquido

IEF : Isoelectroenfoque

kDa : Kilo Dalton

Map : *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MHC : Complejo mayor de histocompatibilidad

PBS : Tampón fosfato salino

PCR : Reacción polimerasa en cadena

SDS-PAGE : Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes

S/P : Densidad óptica corregida con los controles positivos en un ELISA

TEMED : N, N, N´, N´ - tetrametilendiamina

Tris : Tris-(hidroximetil)-aminometano

Triton X-100 : Octal fenoxi polietoxietanol

1. RESUMEN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa crónica e incurable del intestino, causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). La enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial y es de alta prevalencia en los rebaños lecheros originando cuantiosas pérdidas especialmente por menor producción. No más del 5% de los animales infectados desarrollan signos clínicos dificultando el diagnóstico, siendo la prueba de ELISA el método más utilizado a nivel de rebaño, a pesar de su baja sensibilidad. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de proteínas inmunogénicas de *Map* secretadas en medios líquidos para ser utilizadas como antígenos en la prueba de ELISA y mejorar así la sensibilidad diagnóstica.

Se utilizaron dos cepas de *Map*, una cepa de campo aislada en el Laboratorio de Paratuberculosis, UACh y una cepa de referencia (ATCC 19698), las que se cultivaron en medio líquido de Middlebrook 7H9-OADC. La extracción de las proteínas se realizó por centrifugación y la separación por electroforesis en una y dos dimensiones. Para la inmunodetección se usaron sueros de bovinos infectados.

Las proteínas secretadas al medio por las dos cepas fueron reconocidas por 4 sueros bovinos de animales infectados con *Map*. Sólo aquellas proteínas con peso molecular entre 20 y 40 kDa fueron expresadas por ambas cepas en diferentes fases del crecimiento bacteriano.

Estos resultados permiten concluir que proteínas de secreción de *Map* con peso molecular entre 20 y 40 kDa, podrían ser buenas candidatas para ser utilizadas como antígenos de fase sólida de una prueba de ELISA más sensible.

SUMMARY

Bovine paratuberculosis is a chronic, enteric, incurable disease caused by *Mycobacterium. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*). The disease is worldwide distributed, with high herd-prevalence in dairy herds, causing great economical losses to the dairy industry mainly for reduced milk production. Less than 5% of infected animals develop clinical signs of the disease. The ELISA test is the most widely used laboratory test to detect infected animals at herd-level, despite its low sensitivity. The aim of this study was to detect immunogenic proteins released for *Map* in liquid media to be used as antigens in the ELISA test in order to improve the test sensitivity.

Two *Map* strains were used: one field strain isolated at the Paratuberculosis Laboratory, UACh, and a reference strain (ATCC 19698), which were cultured in Middlebrock 7H9-OADC medium. Protein extraction and separation were performed, respectively, by centrifugation and electrophoresis in one and two dimensions. Finally, *Map*-positive and negative bovine sera were used for immunodetection of the more immunogenic proteins.

The proteins released into the liquid medium by the two *Map* strains were recognized by four positive sera from *Map*-infected animals. Only those proteins with molecular weight between 20 and 40 kDa were expressed by both *Map*-strains at different phases of the bacterial growth.

These results suggest that *Map*-proteins between 20-40 kDa could be good candidates to be used as solid phase antigens in a more sensitive ELISA test.

2. INTRODUCCIÓN

La paratuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa que produce enteritis crónica, disminución de la producción láctea, diarrea intermitente y pérdida de peso progresiva, culminando con la muerte del animal afectado (Cocito y col 1994). Esta enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial causando cuantiosas pérdidas económicas en la industria lechera (Hutchinson 1996, Van Schaik y col 1996), estimándose una pérdida anual de más de 200 millones de dólares sólo en Estados Unidos (Ott y col 1999). El agente etiológico es un bacilo Gram positivo descrito originalmente como *Mycobacterium paratuberculosis*; sin embargo, debido a la alta homología de su DNA (> al 90%) con el DNA de *Mycobacterium avium*, es actualmente denominado *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) (Chiodini 1989, 1990; Thorel y col 1990). Este bacilo se caracteriza, además, por ser ácido alcohol resistente, parásito intracelular obligado y de lento crecimiento en medios de cultivo (12-16 semanas). Puede ser diferenciado de otras especies de *Mycobacterium* por ser micobactina dependiente (Merkal y Curran 1974) y genotípicamente por poseer múltiples copias de un elemento de inserción en su DNA denominado *IS900* (Collins y De Lisle 1986).

Aunque no existen antecedentes oficiales de prevalencia en Chile se sabe que la paratuberculosis está presente en nuestro país y fue descrita por primera vez en 1958 en Valdivia (Grinbergs y Caorsi 1958). Desde entonces se han reportado numerosos casos clínicos y recientemente se ha podido aislar el bacilo a partir de muestras de material fecal (Soto y col 2002).

Basado en antecedentes epidemiológicos que sugieren un carácter zoonótico (Delprete y col 1998, Suenaga y col 1999, Bannantine y col 2004-a) y en la mayor termotolerancia de *Map* al proceso de pasteurización (Sung y Collins 1998, Stabel y Lambertz 2004) en los últimos años se ha atribuido a este patógeno un probable rol etiológico en la enfermedad de Crohn en el hombre (Collins 2004), enfermedad intestinal crónica e incurable con características similares a la paratuberculosis, adquiriendo una vital importancia en el ámbito de la salud pública (Chamberlin y col 2001, Grant 2005).

2.1 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y VÍAS DE TRANSMISIÓN

De acuerdo con Whitlock y Buergelt (1996), la enfermedad clínica se presenta y progresa a través de cuatro estados: subclínico, subclínico excretor, clínico y clínico avanzado, estados que están estrechamente relacionados con la excreción de *Map* por las heces y con el diagnóstico de la enfermedad. En 1975, Larsen y colaboradores postularon una asociación entre la edad del ganado y la susceptibilidad a la infección con *Map*. Casi dos décadas más tarde, en 1994, Cocito y colaboradores explicarían esta asociación aludiendo al incompleto desarrollo del sistema inmune en los neonatos. A pesar de que la infección es adquirida por los animales en edades tempranas (< 6 meses), los signos clínicos sólo aparecen varios años después, generalmente después del segundo o tercer parto (Stabel 1998).

Entre las manifestaciones clínicas más importantes están una diarrea profusa e intermitente al comienzo y continua con el paso del tiempo, edema submandibular

difuso, disminución de la producción láctea, anemia y una progresiva pérdida de peso corporal que termina con la muerte del animal (Stabel 1998).

Los animales en estadios clínicos de la enfermedad eliminan la bacteria por las deposiciones y, en un 35% de los casos, las vacas en etapa clínica eliminan *Map* también por la leche (Sweeney 1996). Esto supone que las principales vías de transmisión son la ruta fecal-oral por la ingestión de agua o alimentos contaminados y en los neonatos, la ingestión de leche y calostro de vacas infectadas (Sweeney 1996). También se ha descrito una forma de transmisión vertical de la paratuberculosis ya que se ha logrado aislar el bacilo a partir de úteros, tejido fetal y semen (Sweeney 1996, Harris y Barletta 2001).

Una vez ingerido el alimento contaminado, la vía de entrada de *Map* al sistema linfático es a través de las células M de las placas de Peyer presentes en gran cantidad en la mucosa del íleon (de manera similar a la de otros patógenos como *Salmonella*), continuando con la fagocitosis de la micobacteria (Momotani y col 1988). Los macrófagos activados estimulan a su vez a las células T desencadenando una respuesta inmune de tipo celular (Cohen 1990).

En el caso de la infección con *Map,* en la fase temprana o subclínica, el tipo de respuesta inmune que predomina es la mediada por células y se caracteriza por el desarrollo de una fuerte reacción de hipersensibilidad tipo IV, respuesta linfoproliferativa a mitógenos y células T activadas productoras de citoquinas (Stabel 2000). Con el progreso de la enfermedad esta respuesta de tipo celular se hace débil y comienza a predominar la respuesta inmune humoral. Sin embargo, los anticuerpos producidos en esta etapa no son capaces de proteger al animal, al contrario, es la respuesta inmune

celular la que parece ser esencial para mantener la infección controlada (Stabel 2000). Por el contrario, en los estados finales de la enfermedad existe una respuesta de tipo celular deficiente, pudiendo incluso existir anergia, lo cual permite la rápida diseminación del bacilo en el huésped (Benedixen 1978). Confirmando lo anterior, Sweeney y colaboradores (1998) han observado que la expresión de INF-γ, una citoquina estimulatoria de la respuesta inmune celular, en tejido ilieal y nódulos linfáticos cecales es significativamente mayor en vacas con paratuberculosis subclínica que en animales con signología clínica. Esto se relaciona perfectamente con lo descrito por Stabel (1996) sobre la respuesta de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frente a la estimulación con mitógenos o con un extracto sonicado de *Map.* En su estudio, Stabel observa una secreción significativamente mayor de INF-γ por parte de PBMC de vacas en estado subclínico en comparación con los niveles de secreción de PBMC de vacas control no infectadas y vacas clínicamente infectadas.

Estos cambios en la respuesta del huésped frente a la infección por *Map* tendrían estrecha relación con el progreso clínico de la enfermedad (Coussens 2004). A nivel histológico, se describe principalmente una lesión del tipo granulomatosa crónica, que puede presentarse de manera discreta (tuberculoide) y está asociada con la fuerte respuesta inmune celular en las etapas tempranas de la infección. En estados más avanzados, se encuentran lesiones lepromatosas (difusas), asociadas con la respuesta inmune humoral (Chiodini y col 1984, Pérez y col 1999).

2.2 DIAGNÓSTICO

Actualmente se dispone de varias alternativas para el diagnóstico de la paratuberculosis. Existen pruebas que confirman la presencia de *Map* en el animal afectado, como son el cultivo fecal y la prueba de PCR, y existen también pruebas serológicas como el ELISA, fijación de complemento e inmunodifusión en gel agar (Collins 1996, 2004). La prueba del INF-γ, cuyo objetivo es demostrar la existencia de una respuesta inmune celular contra el bacilo en animales en estados subclínicos, debe ser aún optimizada y no tiene aún aplicación diagnóstica (Billman y col 1992, McDonal y col 1999).

El diagnóstico de la paratuberculosis en animales con signos clínicos no presenta mayor dificultad y se realiza principalmente mediante cultivos fecales y pruebas serológicas de ELISA (Vannuffel y col 1994, Whitlock y col 2000, Whittington y col 2000).

El cultivo fecal para el aislamiento del bacilo es el método de referencia o “prueba de oro” para el diagnóstico de esta enfermedad, con una especificidad superior al 99%. Sin embargo, la sensibilidad no supera el 50% ya que no detecta animales en etapas subclínicas, los cuales excretan en baja cantidad o de manera intermitente la bacteria, además de ser una técnica laboriosa, lenta (12 a 16 semanas de incubación), costosa (Collins 1996, Stabel 1998), y es utilizada principalmente para el diagnóstico a nivel individual.

La otra prueba ampliamente usada para el diagnóstico de la paratuberculosis es la prueba serológica de ELISA. Los “tests” de ELISA usados comúnmente en los

laboratorios de diagnóstico han demostrado eficacia en los programas de control de varios países (Kennedy y Allworth 1999, Benedictus y col 2000, Kennedy y Benedictus 2001), siendo en la actualidad la prueba más utilizada en el monitoreo de rebaños infectados, dada su rapidez, simplicidad y bajo costo (Vannuffel y col 1994).

Aunque ha demostrado tener una especificidad superior al 90%, la sensibilidad de esta prueba es baja (45% en promedio) debido a que los anticuerpos séricos aparecen tardíamente en los animales infectados, poco antes de la aparición de los signos clínicos (Cocito y col 1994, Collins 1996, Whitlock y Buergelt 1996, Stabel 1998). La variación de la sensibilidad de las pruebas de ELISA comerciales tiene directa relación con los estadíos de infección, siendo de un 15 % para animales bajos eliminadores y de un 87 % en el caso de animales clínicos (Sweeney y col 1995). Además, se han encontrado resultados disímiles obtenidos para una misma muestra de suero cuando es evaluada con distintos “kits” comerciales de ELISA (Cox y col 1991, Bannantine y col 2004-b). Esto podría deberse a la presencia de una amplia variedad de proteínas recuperables desde cultivos líquidos de *Map* dependiendo de los medios de cultivo usados (Sung y Collins 2003), lo cual hace muy probable que los distintos “kits” de ELISA utilicen distintos antígenos en la fase sólida. Otro aspecto a considerar es que las pruebas comerciales de ELISA utilizan un extracto crudo de *Map* para la fase sólida (Collins y col 1991, Molina y col 1991, Cocito y col 1994), lo cual puede causar una disminución de la especificidad de los “kits”, por cuanto se ha incorporado un paso previo de preadsorción de los sueros con antígenos de *M. phlei* a la mayoría de estos análisis (Milner y col 1987, 1990; Bech-Nielsen y col 1992).

Houghton y colaboradores (2002) han propuesto que en el caso de la detección serológica de *M. tuberculosis* el uso de múltiples antígenos puede facilitar el desarrollo y aumentar la sensibilidad de la prueba. Así mismo, Willemsen y su equipo (2006) han propuesto que las proteínas de secreción de *Map* representan un blanco frecuente de la respuesta inmune frente a la infección provocada por esta micobacteria, por lo que serían buenas candidatas para el serodiagnóstico.

Por otra parte, y gracias al avance en los análisis genómicos de las micobacterias, y a la identificación del elemento de inserción *IS*900, específico de *Map*, se ha podido implementar un PCR que permite identificar a este patógeno mediante la detección de su DNA y específicamente de este elemento de inserción (Vary y col 1990, Bull y col 2000, Englud 2003). A pesar de la alta especificidad, sensibilidad y rapidez de la técnica de PCR, el uso de ésta se limita fundamentalmente a la confirmación de la presencia del bacilo en cultivos puros y en muestras de tejido como mucosa intestinal y nódulos linfáticos (Wittington y col 1998). La implementación de esta técnica como un examen diagnóstico rutinario aplicable a muestras biológicas (como fecas y leche) se ve limitada por la presencia de elementos inhibidores de la reacción en las muestras, además de la necesidad de personal capacitado para desarrollar los protocolos y los altos costos que estos implican (Collins 1996).

2.3 PROTEINAS INMUNOGÉNICAS DE *Map*

Hasta la fecha se han descrito varias proteínas inmunogénicas de *Map* pero ningún antígeno específico y no más de 20 han sido identificadas completamente (Bannantine y col 2004-b). La mayoría de estas proteínas presentan una alta homología con antígenos de otras micobacterias como por ejemplo GroES y GroEL, ambas proteínas de “shock” térmico.

GroES es altamente conservada y se encuentra tanto en bacterias como en eucariontes (Cobb y Frothingham 1999). Tiene un peso molecular de 10 kDa y actúa como chaperona. Se postula que esta proteína podría participar también como regulador de transmembrana (Legname y col 1996) y en el mecanismo de resistencia de *Map* al calor (Sung y col 2004). GroES ha sido descrita como un antígeno inmunodominante, secretado en grandes cantidades por las micobacterias. Se ha determinado que su secuencia codificante en *Map* y *M. avium* presenta un 100% de identidad y codifica para un péptido de 100 aminoácidos, además de tener un 90% de identidad con las secuencias de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, encontrándose sólo 3 aminoácidos diferentes (Cobb y Frothingham 1999).

GroEL es también una proteína de “shock” térmico y tiene importancia en la estimulación de las respuestas inmune celular y humoral contra las micobaterias (Thole y col 1987, Shinnick 1987). Esta proteína tiene un peso molecular de 65 kDa y se ha descrito que presenta una homología del 98,8% con *M. avium*; 89,6% con *M. tuberculosis* y 86,6% con *M. leprae* a nivel de DNA (El-Zaatari y col 1995). No se ha encontrado una correlación entre los distintos estadios de la enfermedad y la

inmunoreactividad de esta proteína frente a sueros de animales infectados (El-Zaatari y col 1995).

Otra proteína descrita como inmunogénica para *Map* es una lipoproteína de 19 kDa, también altamente conservada dentro de las micobacterias, con una identidad aminoacídica del 95% con *M. avium* (Huntley y col 2005). En células mononucleares de sangre periférica de animales infectados con *Map*, se ha demostrado un aumento en la producción de INF-γ cuando se estimula con la proteína de fusión MBP-19 kDa, pudiendo diferenciarse entre animales no infectados (control) e infectados. Esta proteína de fusión también sería capaz de inducir una respuesta inmune humoral, pero en ambos casos las respuestas son muy débiles, por lo que no podrían aplicarse para ensayos diagnósticos (Huntley y col 2005).

Las alquil hidroperóxido reductasas C y D (AhpC y AhpD) son proteínas homólogas a las AhpC y AhpD de *M. tuberculosis*, con pesos moleculares de 45 y 24 kDa, respectivamente (Olsen y col 2000-a). Corresponden a enzimas detoxificantes que protegen contra metabolitos oxidativos, por lo que podrían ser importantes en los procesos de adaptación de las micobacterias y en su virulencia. Ambas son expresadas principalmente en *Map* y capaces de inducir una respuesta inmune celular y producción de INF-γ por lo que podrían ser útiles en el desarrollo de vacunas contra la enfermedad. Por otro lado, AhpC es inmunodetectada por sueros de animales con paratuberculosis por lo que sería capaz de inducir una respuesta inmune del tipo humoral (Olsen y col 2000- a).

En 1991, Brooks y col. describieron un antígeno D de *Map*, detectado con frecuencia por sueros de animales infectados. Este antígeno, compuesto por una

proteína de 400 kDa formada por tres subunidades con un peso molecular entre 17 y 20 kDa y con un grupo hemo en su estructura, es muy similar a la bacterioferritina de *E. coli*, por lo que podría tener una función parecida en las micobacterias. Además, posee una conformación muy estable que le permite resistir tratamientos con proteasas, pudiendo estar relacionada con algún mecanismo de sobrevivencia de *Map* (Brooks y col 1991).

Posteriormente Koets y col. (1999) describen una nueva proteína inmunogénica de *Map* conocida como proteína de shock térmico Hsp70. Estos autores demostraron que la respuesta inmune celular desarrollada por el animal contra este antígeno de 70 kDa disminuye con el avance clínico de la paratuberculosis. También ha sido determinada la existencia de una interacción específica entre las células presentadoras de antígeno (APC) y Hsp70, lo que provocaría un fenómeno de “presentación cruzada”. Esto significa que la Hsp70 puede ser presentada por el MHC, tanto por moléculas del tipo I como del tipo II, y por lo tanto desencadenar ambos tipos de respuesta inmune (Langelaar y col 2002).

Otras proteínas inmunogénicas de *Map* descritas hasta la fecha son: una serin proteasa de 34 kDa expresada *in vivo* (Cameron y col 1994); un antígeno de 14 kDa descrito por Olsen y colaboradores (2001) que presenta un homólogo en *M. tuberculosis*, contra el cual los sueros de animales con tuberculosis no presentan reacción cruzada (Olsen y col 2000-b, 2001); un antígeno de 32 kDa que corresponde a una proteína de secreción capaz de unir fibronectina, molécula importante para la adherencia entre células eucarióticas y microorganismos (Abou-Zeid y col 1991; El-Zaatari y col 1994); un antígeno de 34 kDa, perteneciente al complejo antigénico A36 y

que contiene por lo menos 3 epítopes de células B específicos de *Map*, que pueden ser reconocidos por sueros de bovinos infectados (De Kesel y col 1993, Ostrowski y col 2003) y que han sido ampliamente usados en el diagnóstico histológico de paratuberculosis (Coetsier y col 1998).

Aunque muchos de estos antígenos han demostrado tener buenas expectativas para detectar infección por *Map*, ninguno ha sido incorporado aún en las pruebas diagnósticas de rutina, probablemente debido a su baja especificidad ya que la mayoría de ellos se encuentran presentes en varias especies de micobacterias (Harris y Barletta 2001). Estudios recientes demuestran que al menos algunos de estos antígenos purificados son potencialmente útiles para el desarrollo de futuras vacunas y ensayos diagnósticos. Sin embargo, muchos de ellos no son detectados por el suero de animales en diferentes etapas de la enfermedad, sugiriendo tal vez la utilización de una mezcla de estos, más que la de un antígeno único (Bannantine y col 2004-b).

Estudios realizados por Cho y Collins (2006), demuestran que las proteínas secretadas por *Map* en el medio de cultivo son más inmunogénicas que las proteínas propias de la bacteria. Por otra parte, se ha reportado que son las proteínas de secreción las que estimularían de mejor manera al sistema inmune de animales infectados y, por lo tanto, serían de gran interés en el mejoramiento de técnicas diagnósticas basadas en serología (Willemsen y col 2006).

Tomando en consideración estos últimos antecedentes, las investigaciones más recientes han centrado sus esfuerzos en determinar cuáles de estas proteínas serían los antígenos más adecuados para ser aplicados a pruebas diagnósticas de rutina, lo cual abre un amplio campo de investigación en la identificación de estas proteínas.

2.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el caso específico de la paratuberculosis, la especificidad y la sensibilidad de la prueba serológica de ELISA dependen directamente de los antígenos de *Map* utilizados, ya que una respuesta inmunológica no puede ser detectada si el antígeno que la originó no es un componente de la prueba. Los protocolos de elaboración de antígenos para las actuales pruebas de ELISA no han priorizado la sensibilidad; por el contrario, son fabricados con extractos crudos de *Map* (Yokomizo y col 1985, Cox y col 1991). Estudios preliminares han demostrado que un cuidadoso y exhaustivo análisis de electroforesis bi-dimensional de proteínas de *Map*, seguido de ensayos de serorreactividad permite identificar aquellos antígenos capaces de discriminar mejor entre animales infectados y no infectados con *Map*. Por esto es de vital importancia el análisis tanto de las proteínas de la bacteria como de las liberadas al medio de cultivo, para establecer cuáles serían las proteínas óptimas para utilizar en el serodiagnóstico.

2.5 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Proteínas de *Map* pueden ser detectadas a través de electroforesis bidimensional al reaccionar con sueros de animales en distintos estadios de infección.

2.6 OBJETIVOS

2.6.1 Objetivo general

Establecer patrones diferenciales, mediante análisis de *western blot*, entre los sueros de animales infectados con *Map* y sueros de animales control.

2.6.2 Objetivos específicos

- Evaluar las proteínas en cuanto a su relevancia como posibles antígenos para el inmunodiagnóstico.
- Identificar aquellas proteínas directamente relacionadas con la sensibilidad y especificidad diagnóstica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos Químicos

De Allied Monitor, Inc. se obtuvo Micobactina J.

De Amersham Biosciences se obtuvo el reactivo quimioluminiscente, ECL.

De Becton Dikinson and Company se obtuvo el suplemento Middlebrook OADC Enrichment (Cloruro de sodio 8,5g, Fracción V de albúmina bovina 50g, Dextrose 20g, Catalasa 0,03g y Acido oléico 0,6ml; por litro).

De BioAxis se obtuvo el estándar de peso molecular, rango 20-120 kDa.

De Bio-Rad se obtuvieron los siguientes reactivos: Agarosa, Anfolitos de rangos 3-10 y 5-7, Bradford Protein Assay, Dodecil sulfato de sodio, *SDS*, Estándar 2-D SDS-PAGE, N, N, N´N´ - tatrametilendiamina, *TEMED*, Membranas de nitrocelulosa Trans-Blot®, 0,2 um de poro y Urea ultra pura.

De Calbiochem se obtuvo el Tris/ Base.

De Difco™ Laboratorios se obtuvieron la Leche descremada y el Medio de Cultivo Middlebrook 7H9 Broth.

De Equilab se obtuvo Metanol.

De Merck, Darmstadt se obtuvieron los siguientes reactivos: Acrilamida, Azul de bromofenol, 2-Mercaptoetanol, Bisacrilamida, Cloruro de sodio, *NaCl*, Cloruro de

potasio, *KCl*, Glicina, Glicerol, Hidróxido de sodio, *NaOH*, Fosfato ácido sódico, Na_2HPO_4, Persulfato de amonio $(NH_4)_2S_2O_8$, Sulfato de amonio, $(NH_4)_2SO_4$ y Tween® 20.

De Rockland se obtuvo el anticuerpo Anti-IgG bovino conjugado a peroxidasa.

De Sigma Chemical Co. se obtuvo Diaminobencidina.

De Winkler se obtuvo Albúmina sérica de bovino, *BSA*.

3.1.2 Instrumentos

Agitador VRN 480, Gemmy Orbital Shaker.

Baño termorregulado GFL modelo 1013.

Centrífuga refrigerada Heraeus Biofuge *fresco*.

Centrífuga Sorvall *Legend RT.*

Cámara de Bioseguridad II A2 Thermo Forma.

Espectrofotómetro UV/VIS V-530, Jasco.

Filtros de 0,2 µm, Millipore.

Fuente de poder, Power PAC 300, Biorad.

Estufa de cultivo Shel Lab.

pHmetro ORION *model* 420

Sistema de electroforesis Protean II xi 2D de BioRad.

Sistemas Protean II y Mini protean II, BioRad.

Sistemas de transferencia Transblot y Mini-Transblot, BioRad.

Tubos Centricon MWCO 3kDa, Millipore.

Vortex Mixer VM-300.

3.1.3 Material biológico

3.1.3.1 Cepas micobacterianas

Se utilizó una cepa de campo de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* aislada e identificada (mediante PCR del inserto IS900) en el Laboratorio de Paratuberculosis del Instituto de Microbiología y una cepa de referencia de *M. paratuberculosis* ATCC 19698 de origen bovino.

Para realizar los ensayos de preadsorción de los sueros se utilizó una cepa de *Mycobacterium phlei* ATCC 11758, proporcionada por el Dr. M.T. Collins, director del Johne's Disease Center, Universidad de Wisconsin-Madison, EE.UU.

3.1.3.2 Sueros bovinos

Para los ensayos de inmunodetección se utilizaron 4 sueros bovinos de animales con paratuberculosis clínica y resultados ELISA y cultivo fecal positivo, además de un suero control negativo, obtenido de un animal perteneciente al Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile con estatus no infectado de acuerdo a exámenes anuales para paratuberculosis a través de la prueba de ELISA (Tabla 1).

SUERO	CULTIVO FECAL	S/P ELISA
1	Positivo	1,122
2	Positivo	2,976
3	Positivo	2,406
4	Positivo	1,596
negativo	No determinado	0,007

Tabla 1. Características de los sueros utilizados para los ensayos de inmunodetección.

El valor S/P corresponde a la densidad óptica de los sueros corregida con los sueros controles positivos al realizar un ELISA. En este caso, las muestras fueron analizadas con el “kit” comercial de IDEXX (IDEXX Laboratorios Inc., USA)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo de micobacterias y curvas de crecimiento

Todas las cepas de *Map* fueron cultivadas en botellas de cultivo de 75 cm^2 conteniendo 25 mL de medio líquido Middlebrook 7H9-OADC (Difco) suplementado con micobactina J (Allied Monitor Inc., USA). El pH del medio fue ajustado a 6,0 y la incubación se realizó a 37° C, por un mínimo de 4 semanas. La cepa de *M. phlei* fue cultivada en este mismo medio pero sin micobactina J, por un periodo de 2 semanas y media.

Las lecturas para confeccionar las curvas de crecimiento fueron semanales para el caso de *Map* (cepas de campo y de referencia) y cada 12 horas para *M. phlei*. Para realizar las lecturas, se tomó una alícuota de 1 mL de cada cultivo líquido, previamente homogeneizado, la que fue puesta en una cubeta de plástico de 1 mL con tapa. La absorbancia de cada muestra fue leída a 630 nm contra un blanco, correspondiente al medio de cultivo sin inóculo. Las lecturas registradas de esta manera (anexos 7.1 y 7.2) fueron graficadas mediante una regresión sigmoidea en el programa Graph Pad 2.0.

3.2.2 Dilusión y preadsorción de sueros

Después de los primeros ensayos de inmunodetección realizados en una dimensión, se seleccionó el suero positivo número 2 para los ensayos posteriores de preadsorción de sueros y electroforesis bidimensional, debido a que reconoce una mayor variedad de proteínas inmunogénicas.

La preadsorción del suero 2 se realizó con las células bacterianas de la cepa de *M. phlei*. Estas bacterias fueron sometidas a ebullición durante 30 minutos para producir su inactivación y lisis parcial y, posteriormente, lavadas con buffer fosfato salino (PBS) (NaH_2PO_4 15 mM y NaCl 150 mM, pH 7,4). Esta suspensión bacteriana fue centrifugada a 16000xg por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. De este concentrado celular se agregaron 40 mg de peso húmedo a cada mililitro (Milner y col 1987) de una dilución 1:10 del suero y se incubó la mezcla por 1 h a temperatura ambiente (Yokomizo y col 1985). Con esta mezcla se incubaron las membranas para los análisis posteriores de inmunodetección. Adicionalmente, se realizaron pruebas de preadsorción utilizando el concentrado celular de *M. phlei* y el sobrenadante de su propio cultivo líquido para diluir el suero número 2.

3.2.3 Obtención de proteínas de *Map*

Los cultivos de las cepas de campo y de referencia de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC 19698) fueron traspasados a tubos falcon de 50 mL y centrifugados a 3000xg durante 20 minutos a 10 ℃. El sobrenadante fue filtrado para esterilizar y asegurar la eliminación total de las bacterias de la muestra. Las bacterias fueron posteriormente lavadas 3 veces con PBS mediante sucesivas centrifugaciones a 16000xg por 15 minutos.

Las proteínas presentes en el filtrado (proteínas FC) fueron precipitadas con $(NH_4)_2SO_2$ 4 M, resuspendidas en PBS y luego reconcentradas por centrifugación en tubos Centricon MWCO 3 kDa (Millipore). Las muestras fueron mantenidas a -20°C.

3.2.4 Determinación de proteínas de *Map*

Una vez obtenida la muestra proteica, la concentración de las proteínas en ella fue determinada según el método de Bradford (1976). Se construyó una curva de calibración entre 0,32 y 1,44 μg/μl usando como estándar albúmina sérica de bovino y el reactivo comercial de Bradford. Tanto las muestras proteicas como los estándares de la curva de calibración fueron leídos a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras de proteínas del filtrado del cultivo presentaron concentraciones cercanas a los 10 μg/μl.

3.2.5 Isoelectroenfoque (IEF)

Esta técnica se realizó según el procedimiento descrito en *Currents Protocols in Protein Science* (Harper y col 1998). Para la preparación de 20 geles para IEF se utilizaron los siguientes reactivos: urea ultra pura (8,45 g), acrilamida/bisacrilamida 30/0,8 (2 mL), Tritón X-100 al 20%(1,5 mL), agua desionizada (3,75 mL), anfolitos del rango 3-10 (0,75 mL) y anfolitos del rango 5-7 (0,75 mL).

Esta mezcla fue filtrada y luego se agregó 94 µl de persulfato de amonio al 2,5% y 21,5 µl de TEMED. Cuando fue necesario, la mezcla se colocó en un baño a 37 ℃ para ayudar a disolver la urea antes de agregar el persulfato de amonio y el TEMED.

Con ayuda de una jeringa de 5 mL se procedió a depositar la muestra en el interior de tubos de vidrio de 13 cm de largo con un diámetro interno de 2 mm (previamente lavados con una solución de HCl y etanol 2:3) sellados con parafilm en un extremo, hasta una altura de 11,5 cm. En seguida se cubrió la mezcla con 50 µl de urea 8 M recién preparada y se dejó polimerizar como mínimo tres horas.

Una vez polimerizados los geles se retiró la solución de urea y se reemplazó por 50 µl de tampón de lisis (urea 13,5 M, β-mercaptoetanol 1,13 M, anfolitos rango 3-10 2%, anfolitos rango 5-7 2 %, Tritón X-100 6,35 %). Los geles fueron montados en el sistema de corrida que contenía en la cámara inferior o ánodo H_3PO_4 0,1 M y en la cámara superior o cátodo NaOH 0,1 M. Para crear el gradiente de pH se pre-corrieron los geles durante 30 min a un voltaje constante de 500 volt. Hecho esto, se removieron las soluciones de hidróxido y de tampón de lisis que cubrían los geles y se volvió a

cubrir cada gel con 50 µl de tampón de lisis por 2 min como una forma de remover restos de NaOH que pudieran afectar posteriormente a la muestra. Pasados estos dos minutos, y retirado el tampón de lisis se procedió a cargar las muestras (aproximadamente 500 µg de proteínas), cubrirlas con tampón de lisis diluido en agua (8:2) y montar nuevamente el sistema de corrida. El IEF duró un total de 18 h a un voltaje constante de 667 volt.

Después de la corrida, los geles fueron extraídos de los tubos de vidrio con ayuda de una jeringa de 5 mL, inyectando agua entre el tubo y la superficie del gel. Los geles se guardaron en tubos de ensayo a -20 ℃ hast a realizar el SDS-PAGE de la segunda dimensión.

Para la estandarización de la técnica de electroforesis bidimensional se utilizó un estándar de punto isoeléctrico y peso molecular.

Para determinar el gradiente de pH formado en cada gel IEF, por cada corrida se dejó un gel al cual no se agregó muestra y que posteriormente fue cortado cada 0,5 cm. Estos pedazos de gel fueron puestos en tubos eppendorf con 1 mL de agua desionizada y agitados por 30 minutos para lograr la difusión de los electrolitos. Finalmente se midió el pH de cada uno de los tubos (O'Farrel 1975).

3.2.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%, de acuerdo al procedimiento de Laemmli (1970). Para preparar el gel separador se utilizaron los siguientes reactivos. Las siguientes cantidades corresponden a las utilizadas para preparar el gel separador para la segunda dimensión: agua destilada (23,7 ml), acrilamida/bisacriamida 30/0,8 (30,6 ml), Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8 (18,16 ml), persulfato de amonio al 1 % (3 ml) y TEMED (46 µl). El gel espaciador se preparó con la siguiente mezcla: agua destilada (4,55 ml), acrilamida/bisacrilamida 30/0,8 (1,12 ml), Tris/HCl 0,4 % SDS pH 6,8 (2,20 ml), persulfato de amonio al 1% (0,875 ml) y TEMED (10,5 µl).

La peineta usada para la segunda dimensión posee 2 pocillos, uno de 0,4 mm de ancho y otro de 14 cm de ancho. Una vez montado el sistema electroforético, el gel IEF se descongeló en una estufa a 37 ℃ por 15 min y fu e puesto en el surco mayor del gel para la segunda dimensión y cubierto con un buffer de corrida con alto porcentaje de SDS (Tris 0,5 M, Glicina 0,768 M, SDS 2 %) en la cámara superior. Con ayuda de una pipeta se retiraron las burbujas y la cámara inferior se llenó con buffer de corrida común (Tris 0,5 M, Glicina 0,768 M, SDS 0,4 %). En el segundo pocillo se cargaron 20 µl de estándar de peso molecular preteñido de rango 120-20 kDa y el sistema se precorrió por 20 min a 20 mA para asegurar la denaturación de las proteínas en el gel IEF (O'Farrel 1975). Luego se cambió el buffer de la cámara superior por el mismo utilizado en la cámara inferior y la corrida se realizó a 30 mA, demorando aproximadamente 5 h.

Los geles unidimensionales fueron preparados con las misma mezclas descritas para la segunda dimensión, pero en proporción 10 veces menor. La corrida se realizó a 30 mA y demoró 1 h aproximadamente.

3.2.7 Inmunodetección (WESTERN BLOT)

Para realizar la inmunodetección, las proteínas resueltas en SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Towbin y col 1979). En el caso de los geles unidimensionales, la transferencia se realizó por 15 h a 40 mA, para los geles en dos dimensiones la transferencia se realizó por 15 h a 60 mA con buffer de transferencia (buffer de corrida, 20% metanol). Las membranas fueron dejadas en solución de bloqueo (PBS 1 %, Tween 20 0,3 %, leche descremada 5% y BSA 1 %) con agitación constante por 1 h y luego incubadas con los sueros correspondientes en dilución 1:10 por un mínimo de 4 h con agitación. Luego de tres lavados con PBS-Tween 20 0,3%, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario por un mínimo de 2 h con agitación. Este anticuerpo corresponde a un anti-IgG bovino conjugado a peroxidasa y fue usado en una dilución 1:5000 ($2x10^{-4}$ μg/μl). Finalmente, las membranas se lavaron tres veces más con PBS-Tween 20 0,3% y reveladas con un reactivo quimioluminiscente.

4. RESULTADOS

4.1 CULTIVOS LÍQUIDOS Y CURVAS DE CRECIMIENTO

Las características de los cultivos líquidos de la cepa de campo de *Map* en medio Middlebrook 7H9-OADC se muestra en la Figura 1. Esta imagen fue tomada cuando se alcanzaron las 4 semanas de incubación. En ella se pueden observar los típicos cúmulos de células formados por la micobacteria durante su crecimiento. Los cultivos fueron incubados en botellas de cultivo de 75 cm^2 de superficie y mantenidos en una estufa de cultivo a 37 ℃ (Figura 2).

Las curvas de crecimiento tanto para las cepas de *Map* como para la cepa de referencia de *M. phlei* en medio de cultivo Middlebrook 7H9-OADC, fueron confeccionadas de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos (sección 3.2). En la curva de crecimiento de la cepa de campo de *Map* (Figura 3) se pueden observar las fases de crecimiento típicas: latencia, exponencial y estacionaria. Se puede apreciar que la fase de crecimiento exponencial se extiende entre la 3^a y la 8^a semana de incubación aproximadamente, antes de pasar a la fase estacionaria. En la curva de crecimiento de la cepa de referencia de *Map* (Figura 4) no es posible observar estas distintas fases, observándose más bien una fase de latencia después de la 4^a semana de incubación y luego una nueva fase exponencial a partir de la 7^a semana.

En la curva de crecimiento de la cepa de *M. phlei* (Figura 5) también se pueden observar las etapas o fases de crecimiento típicas del crecimiento bacteriano: latencia, exponencial y estacionaria, determinándose que para esta

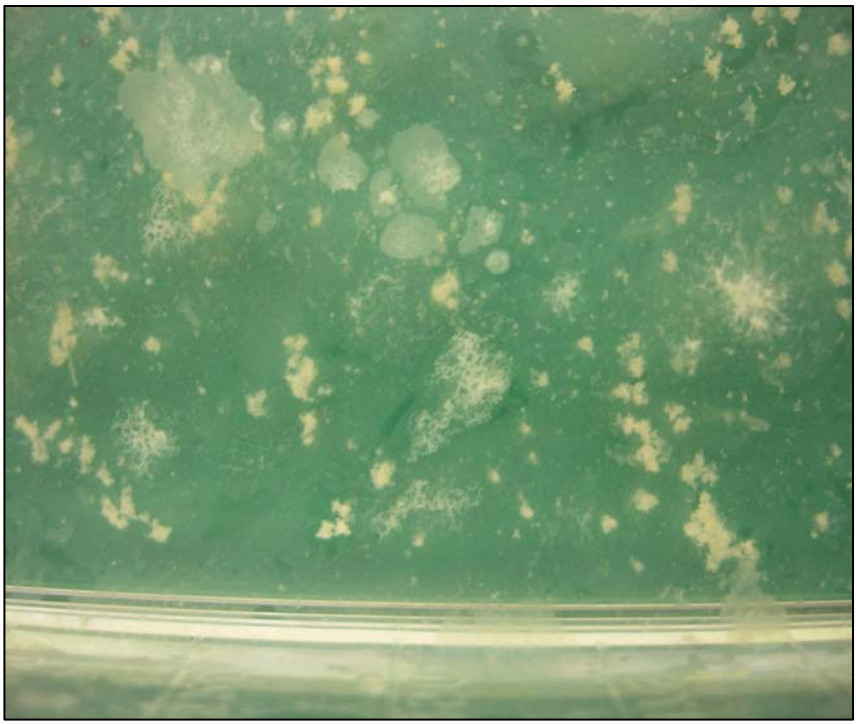


Figura 1. Cultivos líquidos en medio Middlebrook 7H9-OADC. La figura muestra el crecimiento de una cepa de campo de *Map* en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9-OADC después de un mes de incubación.

Figura 2. Cultivos de *Map*. Incubación de los cultivos de *Map* en medio líquido a 37℃.

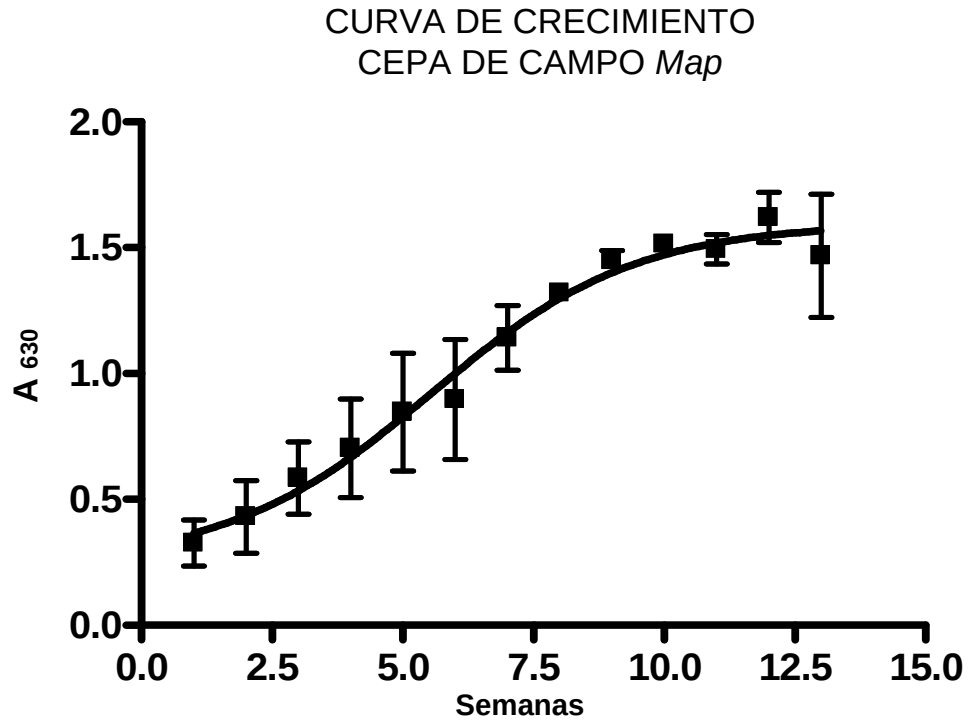


Figura 3. Curva de crecimiento de la cepa de campo de *Map*. La cepa de campo fue cultivada en medio líquido Middlebrook 7H9-OADC por un total de trece semanas. La curva representa el promedio de crecimiento de tres cultivos en paralelo e independientes.

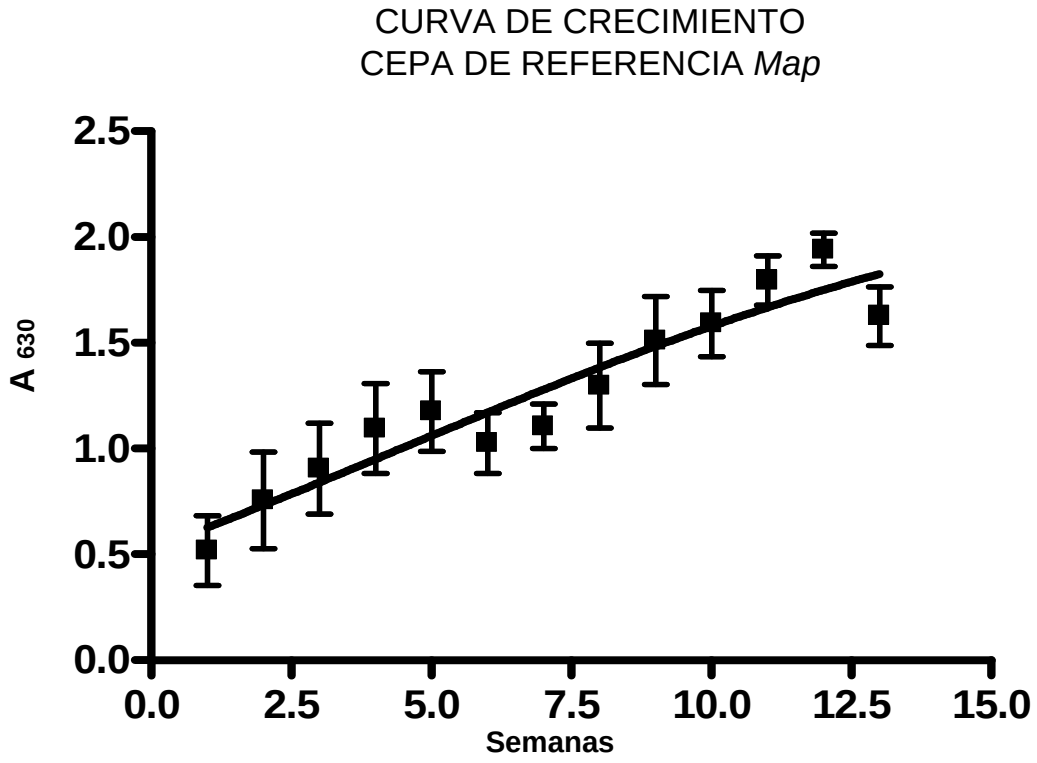


Figura 4. Curva de crecimiento de la cepa de referencia de *Map*. La cepa de referencia fue cultivada en medio líquido Middlebrook 7H9-OADC por un total de trece semanas. La curva representa el promedio de crecimiento de tres cultivos en paralelo e independientes.

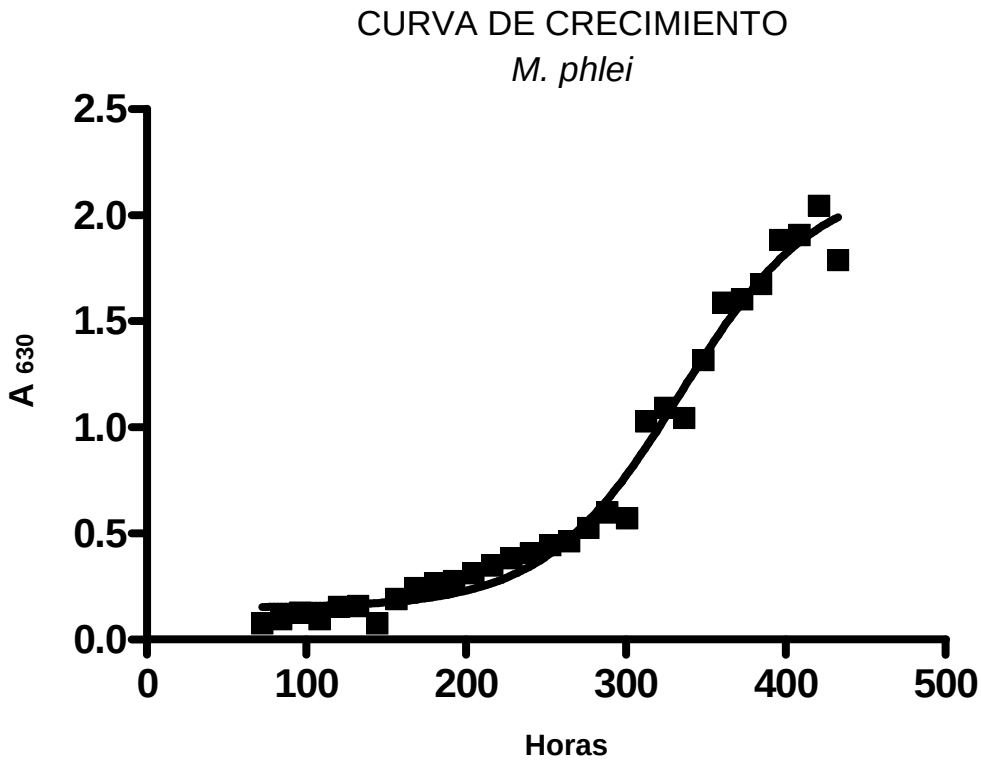


Figura 5. Curva de crecimiento de *M. phlei*. La cepa de *M. phlei*, fue cultivada en medio líquido Middlebrook 7H9-OADC por un total de trece días (432 horas).

micobacteria y en el medio de cultivo utilizado, la fase de crecimiento exponencial se presenta entre los 10 y 16 días de incubación (250 y 400 horas).

4.2 PATRONES INMUNOGÉNICOS EN UNA DIMENSIÓN

4.2.1 Determinación de proteínas inmunogénicas pertenecientes al FC de la cepa de referencia de *Map*

Las distintas proteínas inmunogénicas del FC de la cepa de referencia de *Map* ATCC19698 fueron determinadas utilizando los sueros positivos números 2, 3 y 4. En la Figura 6 se observan los distintos patrones inmunogénicos para cada suero. En el caso de la inmunodetección con el suero número 2 las proteínas observadas tienen masas moleculares aproximadas de 49, 37, 35, 27, 18, 14 y 12 kDa, Cuando la inmunodetección se realizó con el suero número 3, se observaron proteínas de masas moleculares 49, 37, 35, 27 y 18 kDa aproximadamente. Por otro lado, el suero número 4, reconoció proteínas de masas moleculares de 49, 37, 35 y 27 kDa.

Es de interés que las proteínas encontradas dentro del rango de 27 a 49 kDa fueron reconocidas por los tres sueros utilizados.

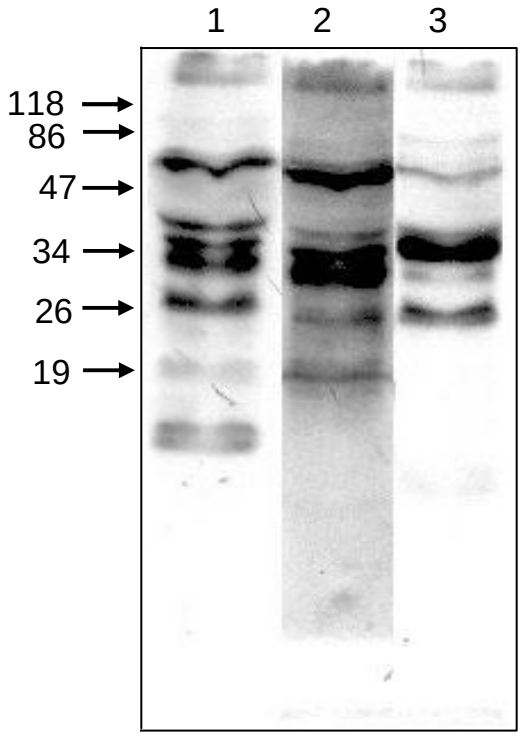


Figura 6. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con sueros positivos. Se realizaron inmunodetecciones de las proteínas obtenidas del medio de cultivo filtrado con tres sueros positivos distintos, sueros; 2 (carril 1), 3 (carril 2) y 4 (carril 3). A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. En todos los carriles se cargaron 50 µg de proteínas totales.

4.2.2 Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con suero preadsorbido con *M. phlei* y suero negativo

Al realizar la imunodeteción de las proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* utilizando el suero número 2 con y sin preadsorción previa con *M. phlei* (Figura 7), se determinó que no existen diferencias significativas en los patrones inmunogénicos obtenidos. Esto indicaría una alta especificidad de las proteínas FC, ya que no existirían epítopes compartidos con las proteínas de *M. phlei*. Se puede observar, además, que existe sólo una banda, correspondiente a una proteína de masa molecular aproximada de 12 kDa, que no es inmunodetectada por el suero luego de la preadsorción con la micobacteria ambiental. Por otra parte, al realizar la inmunodetección de las proteínas FC con el suero negativo, no se observa inmunorreacción (Figura 7).

4.2.3 Determinación de proteínas inmunogénicas pertenecientes a los FC de la cepa de campo de *Map*

Las proteínas FC de los cultivos líquidos de la cepa de campo en medio Middlebrook 7H9-OADC, fueron analizadas con sueros provenientes de distintos bovinos con paratuberculosis clínica (sueros números 1, 2, 3 y 4) (Tabla 1).

Con la finalidad de analizar si existía algún tipo de cambio en las proteínas liberadas al medio por *Map* durante las distintas fases de su crecimiento, la cosecha de estos cultivos se realizó a distintos tiempos de incubación, correspondientes a las semanas 4, 6, 8 y 10. Las proteínas FC fueron obtenidas como se describe en

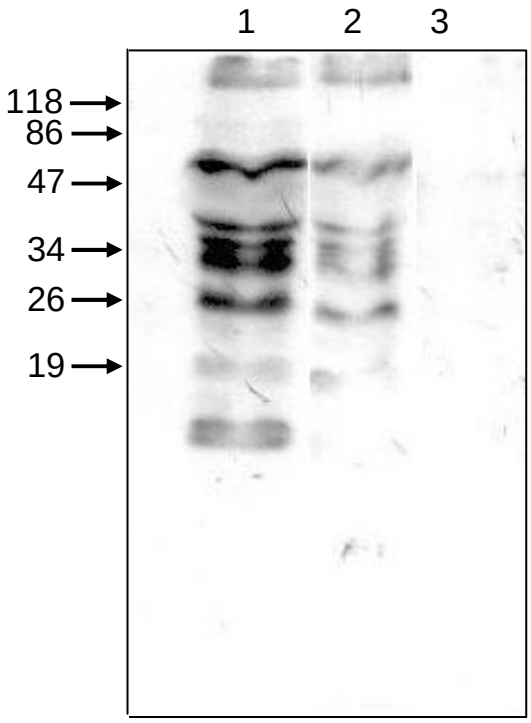


Figura 7. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* con sueros preadsorbido y negativo. La inmunodetección se realizó con el suero positivo 2 (carril 1), suero 2 preadsorbido con *M. phlei* (carril 2) y suero negativo (carril 3). A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Se cargaron 50 µg de proteínas totales en todos los carriles.

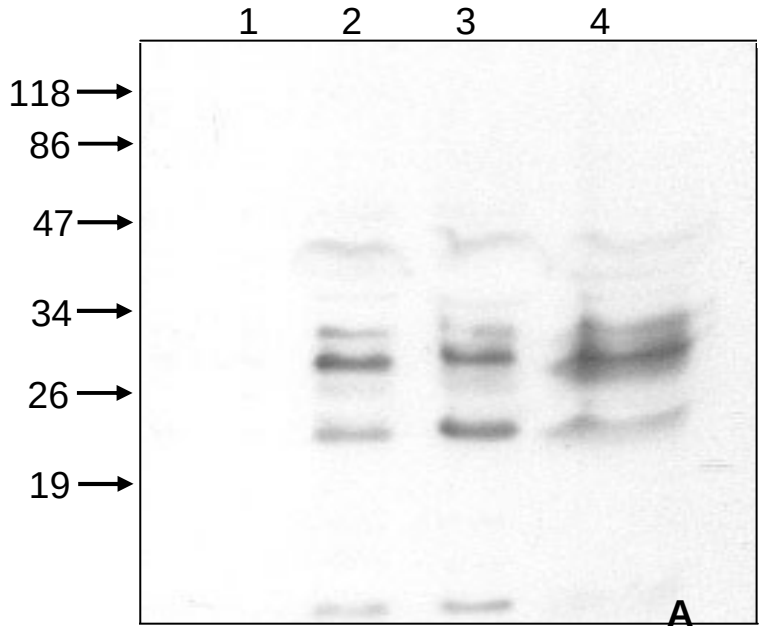
Materiales y Métodos (sección 3.4) y se determinó mediante análisis de inmunodetección que aquellas proteínas reconocidas por los sueros utilizados corresponden a proteínas de masas moleculares no superiores a 55 kDa (Figura 8).

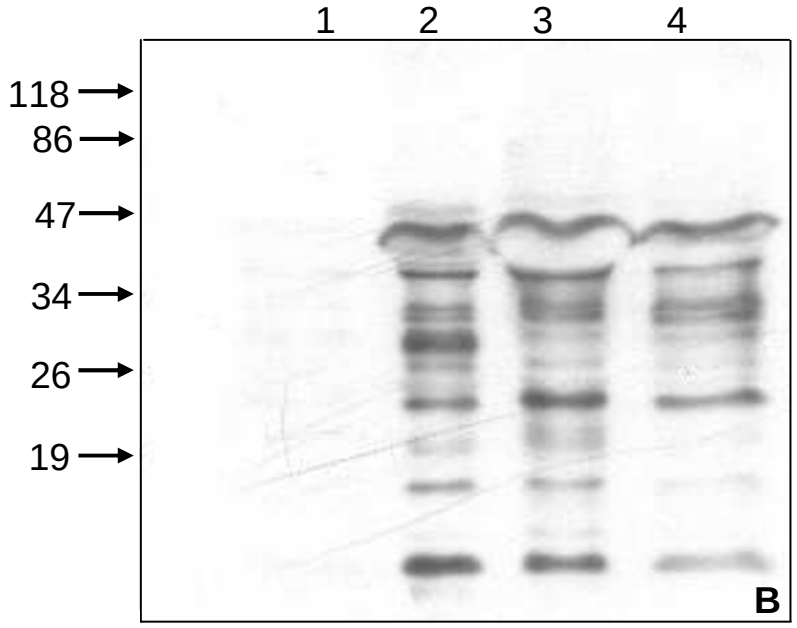
Los patrones inmunogénicos obtenidos en cada tiempo de cosecha y frente a cada uno de los sueros se muestran en la Figura 8 y se puede apreciar que todos los sueros probados fueron capaces de detectar proteínas provenientes del filtrado de los cultivos líquidos de la cepa de campo. A si mismo, el suero número 2 reaccionó con una mayor cantidad de proteínas que el resto de los sueros, lo cual podría estar directamente relacionado con el valor S/P obtenido para este suero en la prueba de ELISA, que es el más elevado de los cuatro sueros positivos utilizados en este trabajo (Tabla 1) y que a la vez puede estar relacionado con el estadío clínico presentado por el animal del cual fue extraído.

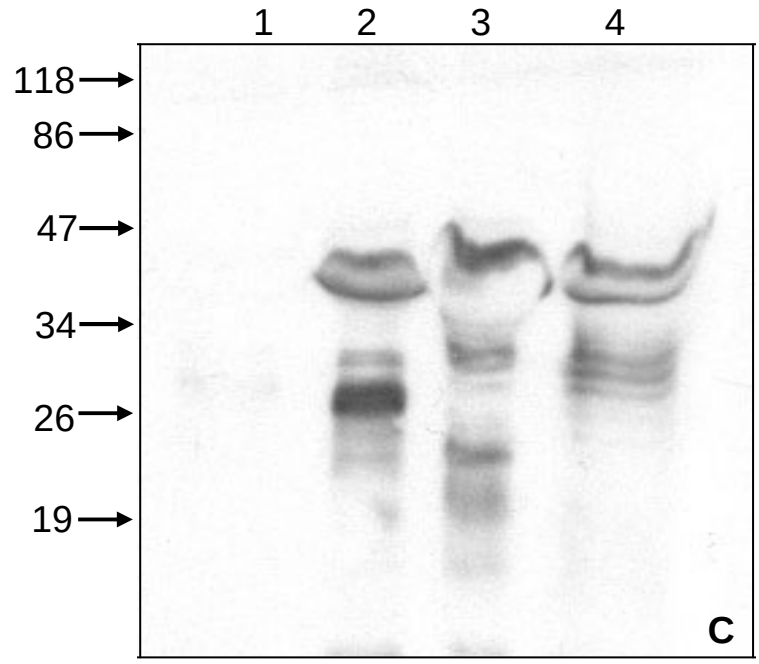
Se puede observar que ninguno de los sueros fue capaz de detectar visiblemente proteínas de los filtrados obtenidos de cultivos de 4 semanas, a pesar que la cantidad de proteínas totales cargadas fue igual a 50 µg en todos los carriles.

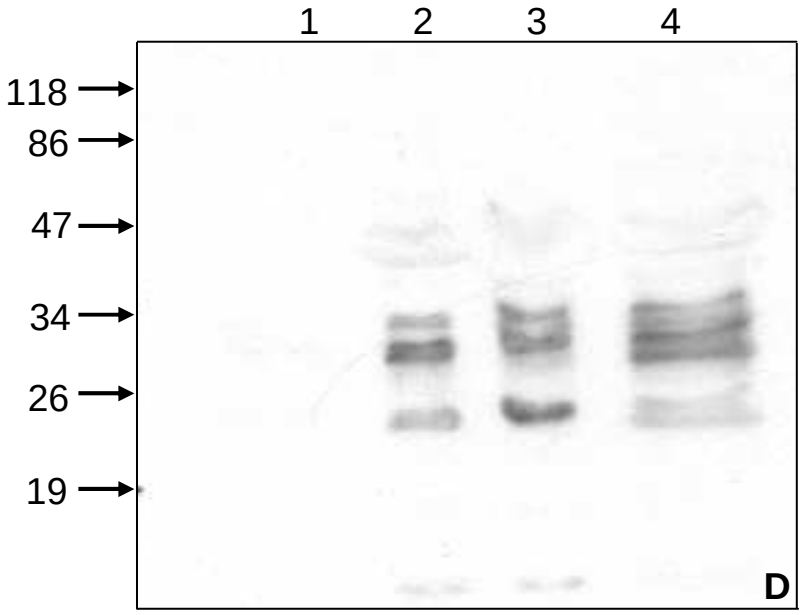
Cuando se analizaron las proteínas FC extraídas de los cultivos de la cepa de campo inmunodetectadas con los 4 sueros positivos, se determinó que aquellas dentro del rango de masa molecular aproximado de 20 y 40 kDa, fueron detectadas por los 4 sueros y a las 6, 8 y 10 semanas de cultivo (Figura 8), de manera similar a lo observado para la cepa de referencia de *Map*.

Figura 8. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* con sueros positivos. Fueron utilizados los sueros 1, 2, 3 y 4 (paneles A, B, C y D respectivamente) para la inmunodetección de proteínas FC obtenidas a distintos tiempos de cultivo. Carriles 1, proteínas de 4 semanas; carriles 2, proteínas de 6 semanas; carriles 3, proteínas de 8 semanas y carriles 4, proteínas de 10 semanas de cultivo. A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. En todos los carriles se cargó 50 µg de proteínas totales.


1
2
3
4
118
86
47
34
26
19
A


1
2
3
4
118
86
47
34
26
19
B


1
2
3
4
118
86
47
34
26
19
C


1
2
3
4
118
86
47
34
26
19
D

4.2.4 Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* con suero preadsorbido con *M. phlei* y suero negativo

En la Figura 9 se observa que las proteínas inmunodetectadas por el suero positivo fueron también reconocidas cuando el suero es preabsorbido con *M. phlei*, a excepción de la proteína de aproximadamente 12 kDa. Este resultado coincide con el obtenido para la cepa de referencia de *Map* e indicaría que estas proteínas no presentan reacción cruzada con antígenos presentes en *M. phlei*.

Al realizar la inmunodetección con el suero negativo, no se observó inmunorreacción (Figura 9).

4.3 PATRONES INMUNOGÉNICOS EN ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

4.3.1 Patrón inmunogénico bidimensional de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map*

Como una forma de determinar si las distintas proteínas FC inmunodetectadas en una dimensión presentaban isoformas que inmunorreaccionaran con distinta intensidad frente al suero positivo, se realizaron ensayos de inmunodetección en dos dimensiones. Al realizarse estos ensayos con las proteínas FC de la cepa de referencia de *Map*, se obtuvo el patrón mostrado en la Figura 10, en la cual es posible observar pocas proteínas inmunodetectadas pero todas con puntos isoeléctricos cercanos.

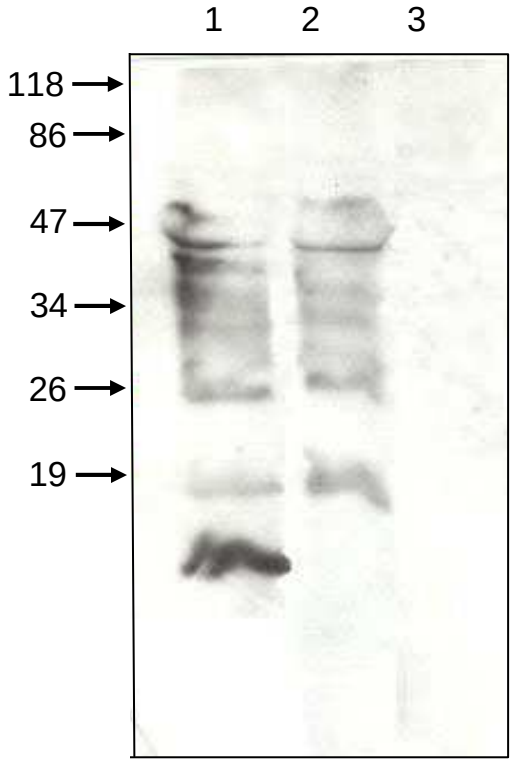


Figura 9. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* con sueros preadsorbido y negativo. La inmunodetección se realizó con el suero positivo 2 (carril 1), suero 2 preadsorbido con *M. phlei* (carril 2) y suero negativo (carril 3). A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Se cargaron 50 µg de proteínas totales en todos los carriles.

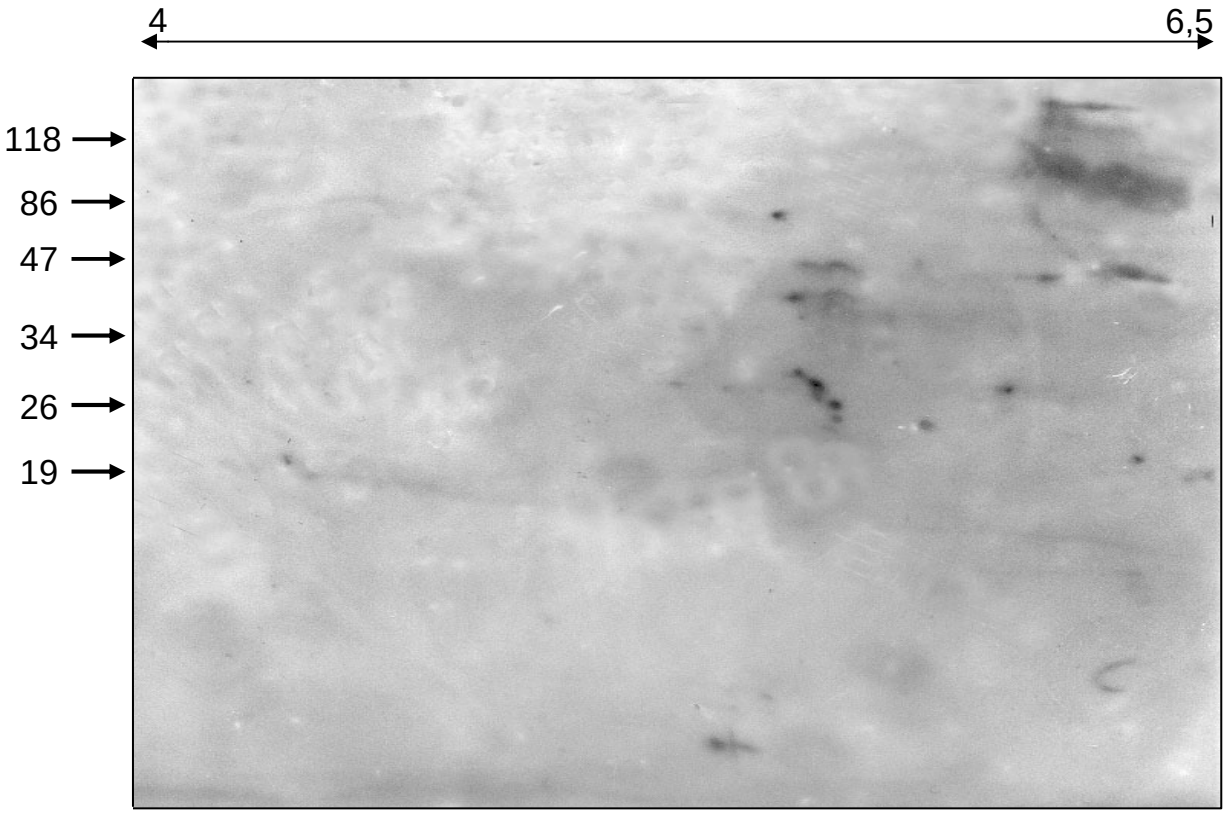


Figura 10. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero positivo. La inmunodetección se realizó con el suero 2 sin diluir. A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Arriba se indica en gradiente de pH. Se cargaron 500 µg de proteínas totales.

Al realizar el mismo ensayo, pero utilizando el suero negativo, no se observó inmunorreacción (Figura 11).

4.3.2 Patrón inmunogénico bidimensional de proteínas FC de la cepa de campo de *Map*

Al analizar las proteínas FC de la cepa de campo mediante electroforesis bidimensional e inmunodetección, se pudo determinar que las proteínas inmunodetectadas poseen diferentes isoformas reconocidas por el suero número 2 (Figura 12). Estas isoformas poseen puntos isoeléctricos que se encuentran dentro de un rango de pH relativamente estrecho (pH 5,0-6,0).

Al realizarse la inmunodetección utilizando el suero negativo no se observó inmunorreacción (Figura 13).

Figura 11. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de referencia de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero negativo. La inmunodetección fue realizada con el suero negativo sin diluir. A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Arriba se indica en gradiente de pH. Se cargaron 500 µg de proteínas totales.

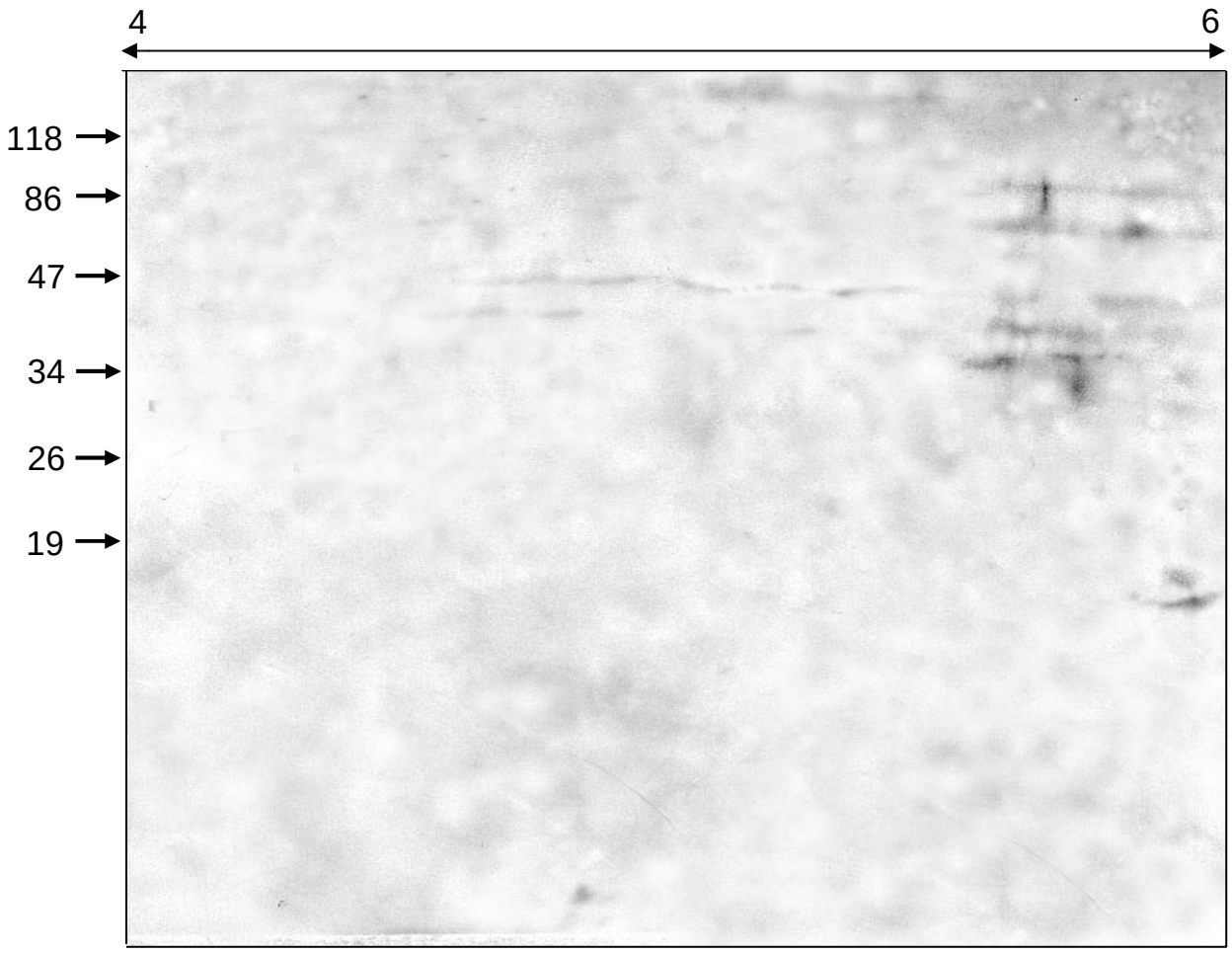


Figura 12. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero positivo. La inmunodetección fu realizada con el suero 2 sin diluir. A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Arriba se indica en gradiente de pH. Se cargaron 500 µg de proteínas totales.

Figura 13. Inmunodetección de proteínas FC de la cepa de campo de *Map* separadas por electroforesis bidimensional con suero negativo. La inmunodetección fue realizada con el suero negativo sin diluir. A la izquierda se indican las posiciones de los estándares de masa molecular en kDa. Arriba se indica en gradiente de pH. Se cargaron 500 µg de proteínas totales.

5. DISCUSIÓN

Es sabido que el diagnóstico de paratuberculosis bovina es complejo y la prueba más utilizada (ELISA) presenta problemas en cuanto a su especificidad y sensibilidad (Collins 1996). Ambos parámetros están directamente relacionados con los antígenos de *Map* utilizados, que generalmente corresponden a un extracto crudo de la micobacteria (Cox y col 1991, Yokomizo y col 1985). Estudios recientes señalan que proteínas liberadas por *Map* al medio extracelular actuarían como mejores antígenos para estimular el sistema inmune de animales infectados (Willemsem y col 2006). Por lo tanto, estas proteínas serían más adecuadas para la optimización de una prueba diagnóstica que las proteínas propias de la bacteria (Cho y Collins 2006).

Considerando lo anterior, es que este trabajo se centró en la identificación de las proteínas de secreción de *Map* que pudieran ser utilizadas en la elaboración de una prueba de ELISA mejorada.

Para poder cumplir el primer objetivo planteado fue necesario elaborar previamente las curvas de crecimiento de las cepas de *Map* en el medio de cultivo Middlebrook 7H9-OADC. En las curvas de crecimiento obtenidas para las cepas de *Map*, se pudo observar diferencias en los patrones de crecimiento entre la cepa de campo y la cepa de referencia ATCC 19698. En el caso de la cepa de campo de *Map* (Figura 3) se observaron las fases de crecimiento típicas: latencia, exponencial y estacionaria y se logró determinar que la fase de crecimiento exponencial se presenta entre la 3^{a} y la 8^{a} semana aproximadamente, alcanzándose luego la fase estacionaria. En la curva de crecimiento de la cepa de referencia de *Map* (ATCC 19698), en cambio,

no fue posible observar estas distintas fases, sino más bien un crecimiento interrumpido por una fase de latencia después de la 4ª semana y luego una nueva fase exponencial a partir de la 7ª semana (Figura 4). Este comportamiento inusual de la micobacteria puede deberse al número de subcultivos al que fue sometida esta cepa en particular, que corresponde a una cepa comercial, ya que en el caso de la cepa de campo el número de subcultivos no fue superior a 3. Otro factor a tener en cuenta son las condiciones del cultivo. Es importante aclarar que en una primera etapa, los cultivos fueron realizados en botellas cerradas, que no permitían el intercambio gaseoso con el exterior. Posteriormente se comenzaron a utilizar botellas con tapa ventilada gracias a la sugerencia del Dr. Michael Collins, director del Johne's Disease Center, Universidad de Wisconsin-Madison, EE.UU, quien posee gran experiencia en el trabajo con esta micobacteria y tuvo la posibilidad de observar nuestros cultivos. Las curvas de las cepas en estas condiciones están siendo confeccionadas, por lo que pronto se podrá determinar la implicancia de este factor en el crecimiento poco usual de la cepa de referencia de *Map*.

Como se mencionó anteriormente, la utilización de proteínas CF para la realización de este trabajo, se basó en estudios que demuestran que las proteínas liberadas por *Map* al medio de cultivo presentan una mayor variedad de proteínas inmunogénicas que las proteínas propias de la bacteria (Cho y Collins 2006) y tendrían un papel más importante en la estimulación de la respuesta inmune en animales infectados (Cho y Collins 2006, Willemsen y col 2006). Sin embargo, el número de proteínas diferentes encontradas, tanto en los ensayos unidimensionales como bidimensionales, fue mucho menor al esperado según antecedentes previos publicados

(Cho y Collins, 2006; Cho y col 2006). Esto podría deberse a las condiciones de cultivo de las micobacterias, ya que al no ser óptimas para su crecimiento, las micobacterias estarían privilegiando un metabolismo de supervivencia por sobre otras vías que pueden estar relacionadas con la liberación de proteínas al medio extracelular. Lo anterior podría explicar la poca variedad y cantidad de proteínas FC encontradas en este trabajo. También es posible que la utilización de una cepa de campo aislada en nuestro laboratorio tenga algún tipo de relevancia en este caso, ya que es una cepa diferente a la usada por Cho en sus estudios (2006). La cepa de referencia de *Map* ATCC19698 presta poca utilidad a la hora de dilucidar esta interrogante ya que el crecimiento observado no es el esperado y en los estudios publicados no se muestran controles con esta cepa que nos permitan comparar nuestros hallazgos.

Dados los resultados obtenidos se concluyó que las proteínas inmunodetectadas con los sueros positivos utilizados en este estudio presentan masas moleculares no superiores a 55 kDa (Figuras 6 y 8), resultados que se relacionan perfectamente con lo descrito por Cho y Collins (2006), quienes indican que la mayoría de las proteínas recuperadas del sobrenadante de cultivos líquidos de *Map* son menores de 50 kDa.

Las proteínas FC que están en el rango de 20 a 40 kDa aproximadamente, fueron reconocidas por todos los sueros positivos probados (Figuras 6 y 8) y para las dos cepas de *Map* utilizadas, por lo cual podrían ser buenas candidatas para ser usadas en serodiagnóstico. Al ser reconocidas por sueros provenientes de distintos animales con paratuberculosis, se puede presumir que son proteínas que provocan una respuesta inmune de manera independiente al animal al que están infectando. Los mismos estudios realizados en este trabajo, pero utilizando proteínas FC provenientes

de otra cepa de campo de *Map* aislada en nuestro laboratorio, mostraron resultados similares, ya que todos los sueros detectan proteínas de masa molecular bajo los 55 kDa y en todos los casos el rango de proteínas entre los 20 y 40 kDa aproximadamente fue detectado por los 4 sueros sin mayores diferencias (datos no mostrados). Esto indicaría que las proteínas FC que poseen masas moleculares entre los 20 y 40 kDa podrían ser, además, expresadas por distintas cepas de *Map*, lo cual es de gran relevancia al momento de elegir proteínas para ser utilizadas en una prueba diagnóstica debido a que son distintas las cepas que pueden estar provocando infección en distintos animales provenientes de un mismo rebaño. Es por esto que, según el criterio utilizado, se definieron a las proteínas dentro de este rango como proteínas de gran interés para etapas futuras de semipurificación y diagnóstico.

Los resultados obtenidos al comparar los patrones inmunogénicos de las proteínas FC a los distintos tiempos de cosecha, indican que las 6^{a} y 8^{a} semanas de incubación serían los tiempos óptimos para la obtención de proteínas secretadas por *Map* cuando la bacteria es cultivada en medio Middlebrook 7H9-OADC, ya que permiten recuperar una mayor variedad de proteínas capaces de ser reconocidas por los sueros. Esta afirmación surge a partir del resultado mostrado en la Figura 8, donde se observa que sin importar el suero utilizado, las 6^{a} y 8^{a} semanas de incubación proveen de un mayor número de proteínas capaces de ser inmunodetectadas.

En los ensayos realizados no fue posible observar inmunorreacción con las proteínas obtenidas a las 4 semanas de incubación, a pesar que la carga de proteínas totales en todos los carriles fue la misma (50 µg). Una posible explicación de lo anterior es la imposibilidad de determinar con certeza qué cantidad de proteínas FC estaba

siendo realmente puesta en cada uno de los pocillos cargados, ya que el medio Middlebrook 7H9-OADC contiene albúmina en su composición, la cual es concentrada al momento de obtener la muestra, de igual manera que las proteínas liberadas por *Map* al medio. Se realizaron intentos por separar esta proteína "contaminante" de las muestras por centrifugación usando tubos con filtro de corte de 50 kDa, pero la baja cantidad de proteínas FC presentes se perdía al momento de realizar este procedimiento. Otra aproximación utilizada fue teñir geles SDS-PAGE con Azul de Coomasie para observar las cantidades de proteínas antes de realizar los ensayos de inmunodeteción, pero esto tampoco fue posible debido nuevamente a la poca cantidad de proteínas FC presentes efectivamente en la muestra y la poca sensibilidad del método de tinción. Sólo fue posible observar una banda muy marcada de aproximadamente 65 kDa, correspondiente a la albúmina en la muestra. Por lo tanto, es probable que la concentración de proteínas liberadas al medio a ese tiempo sea muy baja.

Las proteínas presentes en el rango descrito de interés (20-40 kDa) no fueron identificadas individualmente por cuanto el objetivo final de este trabajo fue definir proteínas dentro de parámetros que permitan una futura semipurificación. El interés está centrado en un conjunto de proteínas que permitan mejorar el diagnóstico serológico y no en proteínas en particular, ya que se ha descrito que la utilización de proteínas aisladas no aumenta la sensibilidad de la prueba de ELISA (Collins M.T. 2006 com. pers.). Por el contrario, existen estudios que señalan que la utilización de múltiples antígenos pueden ayudar el desarrollo de una prueba más sensible (Houghton y col 2002, Bannantine y col 2004-b, Cho y Collins 2006). Aún así, las identidades de las

proteínas dentro de este intervalo pueden ser supuestas, basándose en publicaciones de proteínas descritas para *Map*. Dentro de este intervalo se encuentran la alquil hidroperóxido reductasa D (Olsen y col 2000-a), la serin proteasa de 34 kDa (Cameron y col 1994), el antígeno de 32 kDa (Aboud-Zeid y col 1991, El-Zaatari y col 1994) y el antígeno de 34 kDa perteneciente al complejo antigénico A36 (De Kesel y col 1993, Ostrowski y col 2003). Sin embargo, no fue posible determinar con exactitud si son estas proteínas las que estarían siendo reconocidas en este trabajo por los sueros determinados.

Habiéndose determinado la curva de crecimiento de la cepa de campo de *Map* y en conjunto con lo señalado anteriormente respecto a los tiempos de cosecha en que se obtienen mayores cantidades de proteínas FC, es posible concluir que el tiempo óptimo de cosecha corresponde a la fase exponencial tardía de crecimiento, justo antes de comenzar la fase estacionaria de crecimiento (Figura 3).

Como ya se ha mencionado anteriormente, es con el progreso de la enfermedad que aumentan los títulos de anticuerpos circulantes en el bovino dirigidos contra los antígenos de *Map*. Los cuatro sueros utilizados en este estudio presentaron diferentes S/P de ELISA, por lo que podrían estar representando a animales con distintos grados de evolución de la enfermedad. Al ser estos cuatro sueros capaces de reconocer las proteínas FC de las cepas de *Map* se puede sugerir que las proteínas definidas como de interés (rango entre 20 y 40 kDa) podrían ayudar a un diagnóstico tal vez más temprano de la infección con *Map*. Aún así, se requieren posteriores estudios que comprueben esta hipótesis, como son la prueba con sueros sospechosos, que presenten un valor S/P menor, cercano al punto de corte que separa resultados

negativos de resultados positivos o con sueros negativos a ELISA pero provenientes de animales cuyo cultivo fecal sea positivo para el aislamiento de *Map*.

Los ensayos de inmunodeteción en dos dimensiones demostraron que existen distintas isoformas de las proteínas inmunogénicas del FC, pero todas agrupadas en un rango de pH entre 5,0 y 6,0. El objetivo final de conocer los distintos puntos isoeléctricos presentados por las diferentes isoformas fue determinar la mejor manera de semipurificar proteínas inmunogénicas que pudiesen mejorar las pruebas diagnósticos. Dados los resultados obtenidos y antecedentes que indican que las proteínas del FC de cultivos de *Map* presentan distintas isoformas, pero todas reconocidas por sueros de animales con paratuberculosis (Collins M.T. 2006 com. pers.), se decidió que el punto isoeléctrico de las proteínas de FC no es un parámetro que preste una utilidad al momento de diseñar una estrategia de semipurificación para las proteínas de interés identificadas en esta tesis. En consecuencia, los ensayos realizados posteriormente para determinar qué proteínas presentaban reacción cruzada con antígenos de *M. phlei* se realizaron sólo mediante electroforesis en una dimensión.

En los ensayos con sueros preadsorbidos se pudo determinar que las proteínas del rango entre los 20 y 40 kDa de masa molecular, definidas como proteínas de interés, no presentan epítopes compartidos con proteínas de *M. phlei* que causen reacción cruzada con el suero positivo utilizado (Figuras 7 y 9). Sólo una banda, correspondiente a una proteína de peso molecular estimado en aproximadamente 12 kDa, no fue inmunodetectada por el suero después de realizar la preadsorción con *M. phlei*, pero esta proteína no se encuentra dentro del conjunto de proteínas de interés antes definido. Lo mismo ocurrió al realizar los ensayos con las proteínas FC de la cepa

de referencia de *Map*. Este hallazgo es relevante debido a que nos permite sugerir que las proteínas encontradas y determinadas como de posible interés para el desarrollo de una futura prueba diagnóstica (rango entre 20 y 40 kDa) son específicas de *Map* y permitirían un diagnóstico más específico. Adicionalmente, se realizaron ensayos de preadsorción usando una mezcla de proteínas estructurales de *M. phlei* en conjunto con el medio en el que fue cultivada, que contendría proteínas secretadas por esta bacteria (resultados no mostrados). En estos ensayos no se logró observar diferencia de resultados con el ensayo de preadsorción inicialmente diseñado.

El paso previo de preadsorción de los sueros a ser analizados por ELISA ha sido descrito por varios autores como un paso importante en el desarrollo de la prueba de ELISA, ya que estaría eliminando la posibilidad de falsos positivos al existir proteínas homólogas entre micobacterias relacionadas (Yokomizo y col 1985, Milner y col 1987, Cox y col 1991). Esto no ocurrió en el caso de las proteínas secretadas por *Map* al medio extracelular, según los resultados obtenidos en este trabajo. En este caso, la gran parte de las proteínas secretadas al medio de cultivo líquido utilizado, pudieron ser inmunodetectadas después del paso de preadsorción del suero con *M. phlei* lo cual sugiere fuertemente que son proteínas importantes al momento de mejorar una prueba serológica.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo, confirman la inmunogenicidad de las proteínas FC de *Map*. Además, definen a aquellas dentro del rango de 20-40 kDa como óptimas para el mejoramiento de la prueba de ELISA, debido a que son expresadas por distintas cepas de *Map*, a distintos tiempos de cultivo y son reconocidas por sueros de distintos animales infectados con *Map*.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abou-Zeid C., Garbe T., Lathigra R., Wiker H., Harboe M., Rook GAW., Young DB. (1991). Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect. Immun*., 59, 2712-2718.

Bannantine JP., Barletta RG., Stabel JR., Paustian ML., Kapur V. (2004-a). Application of the genome sequence to address concerns that *Mycobacterium avium* subsp*. paratuberculosis* might be a foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens Disease* **1:** 3-15.

Bannantine J.P., Hansen J.K., Paustian ML., Amonsin A., Li L.L., Stabel J.R., Kapur V. (2004-b). Expression and Immunogenicity of Proteins Encoded by Sequences Specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*., 42, 106-114.

Bech-Nielsen S., Jorgensen J.B., Ahrens P., Feld N.C. (1992). Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J. Clin. Microbiol*., 30, 613-618.

Benedictus G., Verhoeff J., Schukken Y.H., Hesselink J.W. (2000). Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Vet. Microbial*., 77, 399-413.

Benedixen P.H. (1978). Immunologic reactions caused by infections whith *Mycobacterium paratuberculosis*. A review. *Nord. Vet. Med*., 30, 163-168.

Billman J.H., Carrigan M., Cockram F., Corner L.A., Gill IJ., Hill J.F., Jessep T., Milner A.R., Wood P.R. (1992). A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J*., 69, 25-28.

Bull T., Hermon-Taylor J., Pavlik I., El-Zaatari F., Tizard M. (2000). Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology*, 146, 2185-2197.

Bradford M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem*., 72, 248-254.

Brooks B.W., Young N.M., Watson D.C., Robertson R.H., Sugden E.A., Nielsen K.H., Becker S.A. (1991). *Mycobacterium paratuberculosis* antigen D: Characterization and evidence that it is a bacterioferritin. *J. Clin. Microbiol*., 29, 1652-1658.

Cameron R.M, Stevenson K, Inglis N.F, Kalusen J, Sharp J.M. (1994). Identification and characterization of a putative serine protease expressed *in vivo* by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiology*, 140, 1977–1982.

Chamberlin W., Graham D.Y., Hulten k., El-Zimaity H.M.T., Schwartz M.R., Naser S., Shafran I., El-Zaatary F.A.K. (2001). Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther*., 15, 337-346.

Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S. (1984). Rumiant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell. Vet*., 74, 218-262.

Chiodini R.J. (1989). The genetics relationship between *Mycobacterium paratuberculosis* and the *Mycobacterium avium complex. Acta Leprol*., 7 (suppl 1), 249-251.

Chiodini R.J. (1990). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and organisms of the *Mycobacterium avium* complex by restriction polymorphism of the rRNA gene region.*J. Clin. Microbiol*., 28, 489-494.

Cho D., Collins M.T. (2006). Comparison of the Proteosomes and antigenicities of Secreted and Cellular Proteins Produced by *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin. Vaccine Immunol*., 13, 1155-1161.

Cho D., Sung N., Collins M.T. (2006) Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. *Proteomics*, 6, 5785-5794.

Cobb A.J., Frothingham R. (1999). The GroEs antigens in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 67, 31-35.

Cocito C., Gilot P., Coene M., De Kesel M., Poupart P., Vannuffel P. (1994). Paratuberculosis. *Clin. Microbiol, Rev*., 7, 328-345.

Coetsier C, Havaux X, Mattelard F, Sadatte S, Cormont F, Buergelt K, Limbourg B, Latinne D, Bazin H, Denef J.F, 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.

Cohen S. (1990). Lymphokines and the immune response. CRC. Press, Boca Raton, pp 145-179

Collins D.M., De Lisle G.W., (1986). Restriction endonuclease analysis of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res*., 47, 2226-2229.

Collins M.T., Sockett D.C., Ridge S., Cox J. (1991). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J. Clin. Microbiol*., 29, 272-276.

Collins M.T. (1996). Diagnosis of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract*., 12, 357-371.

Collins M.T. (2004). Update on Paratuberculosis control and zoonotic potential. *Irish. Vet*., 57, 49-52.

Coussens P.M. (2004). Minireview: Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect. Immun*., 72, 3089-3096.

Cox J.C., Drane D.P., Jones S.L., Ridge S., Milner A.R. (1991). Development and evaluation of a rapid absorbed enzyme immunoassay test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust. Vet. J*., 68,157-160.

De Kesel M, Gilot P, Misonne M.C, Coene M, 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, 947–954.

Delprete R., Quaranta M., Lippolis A., Giannuzzi V., Mosca A., Jirillo E., Miragliotta G. (1998). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in stool samples of patients with inflammatory bowel disease by IS900-based PCR and colorimetric detection of amplified DNA. *J. Clin. Mocrobiol*., 33, 105-114.

El-Zaatari F.A.K, Naser S.A, Engstrand L, Hachem C.Y, Graham D.Y. (1994). Identification and characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* recombinant proteins expressed in *E. coli*. *Curr. Microbiol*., 29, 177–184.

El-Zaatari F.A.K., Naser S.A., Engstrand L., Burch P.E., Hachem C.Y., Whipple D.L., Graham D.Y. (1995). Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 2, 657-664.

Englund S, (2003). IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. p*aratuberculosis* from closely related mycobacteria. *Vet. Microbiol*., 96, 277-287.

Grant I.R. (2005). A review: Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 1282-1293.

Grinbergs J., Caorsi I. (1958). Enfermedad de Johne o Paratuberculosis en Chile. *Publicaciones Científicas de la Universidad Austral de Chile*, 4, 9-13.

Harper S., Mozdzanowski J., Speicher D. (1998). Two-Dimensional Gel Electroforesis. *Current Protocol in Science* 10.4.1-10.4.36

Harris N.B. Barletta R. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev*,14, 489-512.

Houtghton R.L. Lades M.J., Dillon D.C., Reynolds L.D., Day C.H., McNeill P.D., Hendrickson RC., Skeiky Y.A.W., Sampaio D.P., Bardaro R., Lyashchenko K.P., Reed S.G. (2002). Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 9, 883-891.

Huntley J.F. Stabel J.R. Bannantine J.P. (2005). Immunoreactivity of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19-kDa lipoprotein. BMC *Microbiol*., 5, 3.

Hutchinson L.L. (1996). Economic Impact of paratuberculosis. *Vet. Clin. Am. Food. Anim. Pract*., 12, 373-383.

Kennedy D.J., Allworth M.B. (1999). Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia p. 19-26. En: E. J. B. Manning and MT. Collins (eds.), Proceedings of the Sixth International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, WI., USA.

Kennedy D.J., Benedictus G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberulosis* infection in agricultural species. *Rev. Sci. Tech*., 20, 151-179.

Koets A.P., Rutten V.P.M.G., Hoek A., Bakker D., Van Zijderveld F., Müller KE.., Van Eden W. (1999). Heat-shock protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet. Immun. Immunopath*., 70, 105-115.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-85.

Langelaar M., Koets A., Müller K., Van Eden W., Noordhuizen J., Howard C., Hope J., Rutten V. (2002). *Mycobacterium paratuberculosis* heat shock protein 70 as a tool in control of paratuberculosis.*Vet. Immun. Immunopath*., 87, 239-244.

Larsen A.B., Merkal R.S., Cutlip R.C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am*. *J. Vet. Res.*, 36, 255.

Legname G., Buono P. Fossati G., Monzini N., Mascagni P., Marcucci F. (1996). Evidence for GroEs acting as a transcriptional regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 229, 412-418.

Merkal R.S. y Curran B.J. (1974). Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Microbiol*., 28, 276-279.

McDonal W.L., Ridge S.E., Hope A.F., Condron R.J. (1999). Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J*., 77, 113-119.

Milner A.R., Lepper A.W., Symonds W.N., Gruner E. (1987). Analysis by ELISA and Western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. *Res. Vet. Sci*., 42, 140-144.

Molina A., Morera L., Llanes D. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in goats. *Am. J. Vet. Res*., 52, 863-868.

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

O'Farrel P.H. (1975). High Resolution Two-Dimentional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem*., 250, 4007-4021.

Olsen I., Reitan L.J., Holstand G., Wiker H.G. (2000-a). Alkyl hydroperoxide reductases C and D are the major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun*., 68, 801-808.

Olsen I, Reitan L.J, Holstad G, Wiker H.G. (2000-b). Distinct differences in repertories of low-molecular-mass secreted antigens of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*., 38, 4453-4458

Olsen I, Tryland M., Wiker H.G, Reitan L.J. (2001). AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an Enzyme –Linked Immunosorvent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., 8, 797-801.

Ostrowski M., Mundo S.L., Harris N.B., Barletta R.G., López O.J. (2003). B-Cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. p*aratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand. J. Immunol*., 58, 511-521.

Ott S.L., Wells S.J., Wagner B.A. (1999). Herd-level economic losses associated with Jonhe's disease on US dairy operations. *Prev Vet. Med*., 40, 179-192.

Pérez V., Tellchea J., Corpa JM., Gutiérrez M., García-Marín J.F. (1999). Relation between pathologic findings and cellular immune responses in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *Am. J. Vet. Res*., 60, 123-127.

Shinnik T.M. (1987). The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis. J. Bacteriol*., 169, 1080-1088.

Soto J.P., Kruze J., Leiva S. (2002). Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el método de Cornell modificado. *Arch. Med. Vet*., 34, 275-282.

Stabel J.R. (1996). Production of gamma interferon by peripheral blood mononuclear cells: an important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest*., 8, 345-350.

Stabel J.R. (1998). Jonhe's disease: a hidden threat. *J. Dairy Sci*., 81, 283-288.

Stabel J.R. (2000). Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol*., 77, 465-473.

Stabel J.R., Lambertz A. (2004). Efficacy of pasteurization conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J. Food Prot*., 67, 2719-2726.

Suenaga K., Yokoyama Y., Nishimori I., Sano S., Morita M., Okasaki K., Onishi S. (1999). Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Cronh's disease. *Digest. Dis. Sci*., 44, 1202-1207.

Sung N., Collins M.T. (1998).Thermal Tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. *Appl. Env. Microbiol*., 64, 999-1005.

Sung N., Collins M.T. (2003). Variation in Resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to Acid Environments as a Function of Culture Medium. *Appl. Environ. Microbiol*., 69, 6833-6840.

Sung N., Takayama K., Collins MT. (2004). Possible association of GroEs and Antigen 85 proteins with heat resistance of *Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Environ. Microbiol*., 70, 1688-1697.

Sweeney R.W., Whitlock R.H., Buckley C.L., Spencer P.A. (1995). Evaluation of a commercital enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 488-493.

Sweeney R.W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract*., 12, 305-312.

Sweeney R.W., Jones D.E., Habercker P., Scott P. (1998) Interferon-γ and interleukin-4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.*, 59, 842-847.

Thole J.E., Keulen W.J., De Bruyn J., Kolk A.H., Groothuis D.G., Berwald LG., Tiesjema R.H., Van Embden J.D. (1987). Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64-kilodalton protein *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun*., 55, 1466-1475.

Thorel M.F., Drichevsky M., Levy-Frebault VV. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent *Mycobacteria*, amended 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.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Vannuffel P., Gilot P., Limbourg B., Naerhuyzen B., Dietrich C., Coene M., Machtelinckx L., Cocito C. (1994). Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Clin .Microbiol*., 32, 1211-1216.

Van Shaik G., Kalis C.H., Benedictus G., Dijkhuizen A.A., Huine R.B. (1996). Cost benefit analysis of vaccination against paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec*., 139, 624-627.

Vary, P.H., Andersen, P.R., Green, E., Hermon-Taylor, J., McFadden, J.J. (1990). Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol*., 28, 933–937.

Whitlock R.H., Buergelt C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (Including pathology). *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract*., 12, 345-356.

Whitlock R.H., Wells S.J., Sweeney R.W., Vam Tiem J. (2000). ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol*., 77, 387-398.

Whittington, R.J., Marsh I., Turner M.J., McAllister S., Choy E., Eamens G.J., Marshall D.J., Ottaway S. (1998). Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by IS900 PCR. *J. Clin. Microbiol*., 36, 701–707.

Whittington R.J., Fell S., Walker D., McAllister S., Marsh I., Sergeant E., Taragel C.A., Marshal D.J., Links I.J. (2000). Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. *J. Clin. Microbiol*., 38, 2550-2556.

Willemsen P.T., Westerveen J., Dinkla A., Bakker D., Van Zijderveld F.G., Thole J.E. (2006). Secreted antigens of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* as prominent immune targets. *Vet. Microbiol*., 114, 337-344.

Yokomizo Y., Yugi H., Merkal R. (1985). A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Japan J. Vet. Sci*., 47, 111-119.

7 ANEXOS

7.1 LECTURAS DE A_{630} PARA LA CONFECCION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *M. phlei*

HORAS	A 630nm
72	0,0791
84	0,0970
96	0,1288
108	0,0972
120	0,1545
132	0,1601
144	0,0790
156	0,1922
168	0,2444
180	0,2675
192	0,2781
204	0,3127
216	0,3511
228	0,3842
240	0,4097
252	0,4475
264	0,4664
276	0,5291
288	0,6012
300	0,5730
312	1,0296
324	1,0950
336	1,0474
348	1,3192
360	1,5911
372	1,6053
384	1,6782
396	1,8869
408	1,9092
420	2,0466
432	1,7906

7.2 LECTURAS DE A_{630} PARA LA CONFECCION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Map*

7.2.1 LECTURAS PARA LA CEPA DE REFERENCIA DE *Map* EN TRIPLICADO

SEMANAS	A 630	A 630	A 630
1	0,7312	0,2004	0,1967
2	1,0483	0,3875	0,3056
3	1,2259	0,5031	0,4983
4	1,4360	0,6830	0,7054
5	1,3670	0, 7541	0,8012
6	1,3138	0,9030	0,8666
7	1,3191	1,0109	0,9948
8	1,7018	1,1179	1,0800
9	1,9126	1,2087	1,4220
10	1,9005	1,4992	1,3824
11	2,0286	1,6848	1,6757
12	2,1003	1,8730	1,8534
13	1,9042	1,4560	1,5274
14	2,1466	1,9014	1,8851
14	2,0609	1,4592	1,6209

7.2.2 LECTURAS PARA LA CEPA DE CAMPO DE *Map* EN TRIPLICADO

SEMANAS	A 630	A 630	A 630
1	0,5038	0,2764	0,1983
2	0,7187	0,3078	0,2638
3	0,8708	0,4631	0,4183
4	1,0932	0,5089	0,5036
5	1,3115	0,6219	0,6046
6	1,3718	0,6854	0,6321
7	1,3910	1,0633	0,9666
8	1,3847	1,3192	1,2531
9	1,5254	1,4192	1,4001
10	1,5867	1,4740	1,4825
11	1,6079	1,4215	1,4468
12	1,8185	1,5217	1,5166
13	1,9546	1,2244	1,2213