

Obtención y evaluación de un derivado proteico purificado de una cepa argentina de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

ANDREA GIOFFRÉ¹, GABRIELA ECHEVERRÍA-VALENCIA¹, MARTÍN ZUMÁRRAGA¹, CLAUDIA MORSELLA², MARÍA L. MON¹, MARIANA VIALE¹, FERNANDO PAOLICCHI², MARÍA I. ROMANO¹

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar. Dr. Nicolás Repetto y De Los Reseros S/N.º (1686) Hurlingham, Buenos Aires; ²Departamento de Producción Animal, EEA-INTA Balcarce. Ruta 226, km 73,5 (7620) Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

* Correspondencia. E-mail: agioffre@cnia.inta.gov.ar

RESUMEN

Los derivados proteicos purificados (PPD) son mezclas antigénicas no definidas obtenidas de distintas micobacterias. Los PPD bovino (PPDb) y PPD aviar (PPDa) son los antígenos que se emplean para evaluar la respuesta inmunitaria celular en infecciones como tuberculosis y paratuberculosis en el bovino. El PPDa comercial se produce a partir de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, y no a partir de la subespecie *paratuberculosis*. En este trabajo se seleccionó una cepa local de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cuyo patrón molecular por RFLP es el más frecuente entre los aislamientos de nuestro país que han sido estudiados, y a partir de esta, se obtuvo un derivado proteico purificado: PPDj-IB. Se emplearon tanto el PPDa comercial como el PPDj-IB como antígenos en la prueba de liberación de gamma-interferón en animales de un tambo con paratuberculosis y en animales control. Aun cuando ambos PPD fueron capaces de estimular diferencialmente la liberación de la citoquina en el tambo infectado (respecto de los tambos control), no hubo diferencias significativas en los niveles de estimulación producidos y solo dos animales fueron positivos mediante el empleo de PPDj-IB. A partir del análisis por *Western blot* se demostró que el contenido de lipoarabinomano y del antígeno Apa/ModD era distinto en los PPD evaluados. Estas diferencias podrían explicar, en parte, las diferencias en los niveles de estimulación en términos individuales. Si bien el empleo de PPDj-IB no mejoró significativamente los resultados de la prueba de liberación de γ IFN, es importante destacar que se logró producir en el laboratorio un PPD apto para su empleo en ensayos *in vitro*.

Palabras clave: diagnóstico, paratuberculosis, micobacterias, antígenos, gamma IFN

ABSTRACT

Production and evaluation of a purified protein derivative from an Argentine strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Purified Protein Derivatives (PPDs) are non-defined antigens prepared from mycobacteria cultures. They are usually employed to evaluate the specific cellular immune response both in animals and humans. Bovine and avian PPDs are usually employed as antigens in mycobacterial infections such as tuberculosis and paratuberculosis. Nevertheless, PPD from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, (PPDj) is neither commonly used nor frequently available. However, PPD from *Mycobacterium avium* subsp. *avium* is in fact used. We aimed to obtain and evaluate the performance of a PPDj from a local isolate of MAP using the γ Interferon-release assay. The stimulation of γ Interferon-release was significantly different between infected and control cattle when this antigen, named PPDj-IB, was used. Stimulation in the infected animals was similar with both antigens (PPDa and PPDj-IB). However, some animals were positively stimulated with PPDj-IB and not with PPDa. We demonstrated by *Western blot* that two antigenic molecules, lipoarabinoman and APA/ModD antigen were differentially represented in both PPDs. This could explain the difference in stimulation induction of γ IFN observed at individual level. Although PPDj-IB could not improve PPDa performance, we could easily produce an effective purified protein derivative for *in vitro* assays.

Key words: diagnosis, paratuberculosis, mycobacterium, antigens, Bovigam™

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis y la paratuberculosis (PTB) bovinas son patologías de etiología micobacteriana que impactan de forma negativa en la producción pecuaria de nuestro país (23, 29). Entre las herramientas de

diagnóstico disponibles se encuentran la prueba de liberación de gamma interferón (γ IFN) y la prueba de intradermorreacción, donde se emplean derivados proteicos purificados (PPD). Estas pruebas son ampliamente empleadas en tuberculosis; sin embargo,

su aplicación en PTB es limitada, en estos casos son consideradas pruebas complementarias.

Los PPD son mezclas antigénicas no definidas que consisten, principalmente, en proteínas liberadas en el medio de cultivo en la fase estacionaria. Dado que el proceso de obtención involucra la inactivación de las bacterias por calor, en este producto se encuentran también proteínas y otros componentes celulares liberados por la lisis de las micobacterias (lípidos, azúcares y ácidos nucleicos). Muchos de los antígenos presentes en estas mezclas complejas, también llamadas tuberculinas, son comunes a varias especies micobacterianas (11, 20).

La prueba de liberación específica de γ IFN es un ensayo rápido, desarrollado por Wood *et al.* en 1990, que se realiza a partir de sangre entera (31). Se basa en la liberación de γ IFN por parte de linfocitos sensibilizados durante la incubación con PPD. Algunos animales infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) presentan una respuesta celular específica a la prueba de γ IFN en etapas tempranas de la infección. Los animales infectados en etapa subclínica solo pueden ser diagnosticados utilizando pruebas que midan respuesta celular, ya que no presentan respuesta de anticuerpos específicos (28). Sin embargo, una de las limitaciones de las pruebas que evalúan respuesta celular es que los animales con PTB avanzada pueden presentar una respuesta inmunitaria celular baja o nula, y así resultar negativos a estas pruebas (7). 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. Estos últimos pueden utilizarse para la confirmación de resultados obtenidos en estudios previos o en ensayos tempranos de la prueba de γ IFN.

El diagnóstico de PTB es dificultoso por el largo tiempo que lleva el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específica o la aparición de signos clínicos. Además, la eliminación intermitente del bacilo complica el diagnóstico, y así, los animales infectados permanecen en las granjas, donde pueden infectar a otros (4). El diagnóstico temprano reduce el riesgo de transmisión o la progresión de la enfermedad. Sin embargo, la eliminación del animal asintomático en esta fase no es una estrategia de fácil aceptación por parte de los productores. Pese a esto, el diagnóstico temprano se vuelve una herramienta útil para mantener el estatus de rodeo libre de la enfermedad, al evitar la incorporación de animales clínicamente sanos, pero infectados con MAP.

Varios estudios han demostrado que el ensayo de γ IFN es más efectivo para la detección de la fase temprana de infección que las pruebas basadas en anticuerpos (13). De acuerdo con lo descrito en diagnóstico de PTB, la técnica de γ IFN no se recomienda para el diagnóstico en animales que están cursando una etapa tardía de la infección, ya que existe un predominio de respuesta Th2, y en etapas más avanzadas los animales pueden entrar en estado de anergia completa o de desactivación inmunitaria. Según nuestra experiencia, en distintos rodeos problemas se pueden encontrar en algunos animales con PTB clínica y con alta respuesta, tanto de anticuerpos específicos como de liberación específica de γ IFN (9). El paradigma Th1/Th2 ha sido considerado por algunos autores como una simplificación del cuadro inmunológico en ciertas infecciones, y se han caracterizado células de distintos subtipos en el bovino, diferentes a las descritas en ratones, que presentan fenotipo Th0 (5, 18). Esto explicaría la presencia de animales con respuesta inmunitaria poco definida, considerada como Th0.

El PPD preparado a partir de MAP, también conocido como PPD johnina (PPDj), no está disponible comercialmente en todos los países y, en su lugar, se emplea el derivado proteico aviar para el diagnóstico de la PTB. *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *avium* tienen un alto grado de similitud, con una identidad genética que se estima superior al 97 % (2). Un estudio comparativo de los genomas de las dos subespecies reveló la presencia de 21 secuencias específicas en MAP, algunas de las cuales codifican proteínas antigénicas (1, 3). Además, estudios proteómicos comparativos refuerzan la idea de que ciertas proteínas se expresan exclusivamente en MAP, a la vez que otras se expresan muy pobremente en *M. avium* subsp. *avium*; entre estas últimas se encuentran algunos antígenos (14). Por otro lado, también se ha descrito la presencia de un perfil diferencial de expresión de proteínas entre distintas cepas de MAP (24), lo que lleva a indagar acerca de la conveniencia de una preparación antigénica proveniente de una cepa predominante en el escenario epidemiológico de nuestro país.

Dado que en el mercado local no existen PPD basados en MAP, el objetivo de este trabajo fue producir una mezcla antigénica a partir de un aislamiento local de MAP y evaluarla a campo empleando la prueba de liberación de γ IFN. La hipótesis de partida fue que este PPD podría mejorar el diagnóstico de la enfermedad en nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

Elaboración de un derivado proteico purificado de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (PPDj-IB)

Se empleó un protocolo descrito previamente (26), con algunas modificaciones. Se procesó el cultivo de un aislamiento local de MAP. Dicho aislamiento se obtuvo en el Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Producción Animal, EEA-INTA Balcarce, y provenía de un bovino paratuberculoso de la raza Aberdeen Angus, de la localidad de Dolores (provincia de Buenos Aires). La identidad del aislamiento fue confirmada amplificando la secuencia de inserción IS900 por PCR (6). Asimismo, el aislamiento fue previamente tipificado en nuestro laboratorio por la técnica de RFLP y clasificado según el perfil obtenido como «A», que es el patrón más frecuente entre los aislamientos estudiados en nuestro país (21). La cepa fue cultivada en medio sintético Middlebrook 7H9 (BD Difco, NJ, EE.UU.) suplementado con 2 µg/ml de micobactina J (Allied Monitor, Fayette, MO, EE.UU.), a 37 °C y 100 r.p.m. El cultivo en fase estacionaria se autoclavó a 121 °C durante 3 h y se filtró el lisado resultante con una unidad filtrante (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Se realizó una precipitación ácida de proteínas con TCA 4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se resuspendió el precipitado en *buffer* fosfato salino (PBS) y se lo dializó contra el mismo *buffer* empleando una membrana de diálisis Spectra/Por^{MR} de tamaño de exclusión de 6-8 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, EE.UU.). Se cuantificó la concentración de proteínas empleando el *kit* Micro BCA Protein Assay^{MR} (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) y se la ajustó a 0,3 mg/ml con PBS.

Animales estudiados

Se estudiaron 24 bovinos adultos de un tambo localizado en la provincia de Buenos Aires. Este tambo presentaba animales con síntomas clínicos característicos de la enfermedad, como pérdida de peso y diarrea acuosa, y además presentaba animales positivos a la prueba serológica de ELISA-PPA (antígeno protoplasmático aviar). Los análisis histopatológicos y el aislamiento de la bacteria a partir de la materia fecal de dos animales sacrificados confirmaron la presencia de la enfermedad en el establecimiento. Al momento del muestreo, se registró el estado clínico de cada animal (diarrea, bajo peso, edema submandibular), y se tomaron muestras de materia fecal del recto (200 g) y de leche (300 ml) en contenedores estériles. Se obtuvo sangre por venopunción, con heparina 20 U/ml (Rivero, CABA, Argentina) y sin esta, para los estudios inmunológicos. Los sueros empleados para el ELISA fueron obtenidos por centrifugación a 5000 x g, 10 min. Como grupo control se muestrearon otros 24 bovinos adultos pertenecientes a dos establecimientos lecheros de la misma provincia, sin historial de prevalencia de la enfermedad y sin aislamiento de la bacteria por cultivo de *pools* de materia fecal. En todos los casos, los animales fueron seleccionados al azar y las muestras para los distintos ensayos fueron tomadas el mismo día.

Análisis serológico por ELISA

Los sueros de los animales fueron preadsorbidos durante 2 h a temperatura ambiente con el mismo volumen de una suspensión que contenía *Mycobacterium phlei* (0,4 % peso seco/v), y luego analizados mediante un ELISA indirecto empleando el antígeno comercial PPA (Allied Monitor, Fayette, MO, EE.UU.), de acuerdo con el protocolo descrito previamente (23).

Análisis bacteriológico

Se realizaron extendidos con cada muestra de materia fecal y se colorearon utilizando la técnica de Ziehl Neelsen. Diez gramos de cada muestra de materia fecal y 150 ml de cada muestra de leche se procesaron según lo descrito (23). Se inoculó la muestra resultante en medio de Herrold con 2 mg/l de micobactina J (Allied Monitor, Fayette, MO, EE.UU.) o sin esta. Los cultivos se observaron cada 15 días durante 4 meses. Se confirmó la identidad de las colonias desarrolladas por su dependencia de micobactina y por PCR-IS900 (6).

Ensayo de liberación de γ IFN bovino

La inmunidad mediada por células se evaluó utilizando el ensayo inmunoensayo comercial para la detección de γ IFN bovino Bovigam^{MR} (CSL, Prionics, Argentina). La sangre fue recolectada con heparina y procesada dentro de las 4 h de realizada la toma de la muestra. El procedimiento de estimulación linfocitaria y el análisis de los plasmas obtenidos fueron realizados según las indicaciones del fabricante. Se evaluó la respuesta de los animales frente a los antígenos comerciales aviar (PPDa) (CSL, Prionics, Argentina) y bovino (PPDb) (CSL, Prionics, Argentina), y frente al antígeno de MAP (PPDj-IB) a la misma concentración final (10 µg/ml). Se utilizó el mismo volumen de PBS y de *pockweed mitogen* (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como controles por cada animal; este último es un inductor inespecífico de la respuesta celular. La estimulación de la sangre se realizó en microplacas de 96 pocillos. Se incubó toda la noche a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5 %. Posteriormente se separó el plasma para la determinación de la citoquina. La lectura de los resultados se realizó en un espectrofotómetro Titertek Multiskan Plus (ICN, CA, EE.UU.) a 450 nm. Las muestras fueron procesadas por duplicado. Se calculó el índice de densidad óptica (IDO) para cada muestra como el cociente entre la DO_{antígeno} / DO_{PBS}.

Punto de corte y análisis estadístico

Se estimaron los puntos de corte de los ensayos con cada antígeno según el método gaussiano, empleado anteriormente en otros trabajos (12, 16). Se calculó el límite de confianza del 95 % a partir de los valores de IDO obtenidos para los animales provenientes de los tambos libres de la enfermedad.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa MedCalc versión 9 (Mariakerke, Bélgica).

Análisis antigénico de los PPD

Se analizó en los PPDj-IB y PPDa (CSL, Prionics, Argentina) la presencia de los siguientes antígenos: LprG (lipoproteína G, P22 en MAP o antígeno de 27 kDa o P27 en *M. bovis*), Lpp34 (lipoproteína de 34 kDa), ModD (*alanine-proline rich-antigen* o APA), Hsp70 (proteína de estrés térmico de 70 kDa o antígeno de 70 kDa) y LAM (lipoarabinomano). A tal fin se empleó la técnica de *Western blot*, para lo cual se sembraron 10 µg de proteínas de cada PPD por calle en un gel de poliacrilamida de 15 cm. Luego de la transferencia a membrana de nitrocelulosa, se detectaron los antígenos con una dilución 1/100 de cada antisuero específico, todos obtenidos en ratón, a excepción del anti-LAM, que se obtuvo en conejo. Se emplearon como controles los antígenos proteicos expresados en forma recombinante y un extracto celular de la bacteria para el LAM. Se utilizó como anticuerpo secundario un monoclonal anti-IgG anti-ratón o anti-IgG anti-conejo (Sigma Aldrich, EE.UU.), según el anticuerpo primario utilizado, ambos conjugados a fosfatasa alcalina. Tanto para la separación electroforética como para la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa y el *immunoblotting*, se emplearon las condiciones ya descritas (10).

RESULTADOS

Respuesta de liberación de γ IFN en establecimientos con PTB y libres de la enfermedad

La evaluación de la liberación de γ IFN bovino mediante el *kit* comercial Bovigam^{MR} contempla la utilización de los antígenos PPD_b y PPD_a, comercializados por la misma empresa; a partir de los cuales se estimula la liberación de la citoquina en muestras de sangre. En este trabajo comparamos dos PPD –uno comercial y otro producido con una cepa local de MAP (PPD_j-IB)– en la respuesta de liberación de γ IFN en animales de un tambo infectado con PTB y en animales de dos establecimientos libres de la enfermedad.

Se obtuvo una estimulación positiva con el inductor inespecífico de la respuesta celular (*pockeweed mitogen*) en todos los animales (datos no mostrados). Cuando se empleó el PPD_j-IB, se obtuvieron niveles de liberación de γ IFN significativamente mayores en los animales de los tambos infectados respecto de los libres de la enfermedad ($p = 0,0085$) (Figura 1). De acuerdo a lo esperado, lo mismo ocurrió cuando se empleó el PPD_a ($p = 0,0017$). Del análisis comparativo de estos dos PPD en los animales del tambo con PTB se concluyó que, aun cuando con el PPD_a hubo un animal con un valor muy alto de estimulación (IDO: 11,95), no existieron diferencias significativas entre los niveles de estimulación frente a PPD_j-IB y PPD_a ($p = 0,8081$) (Figura 1). Se pudo observar también que la respuesta celular de los animales del tambo libre de la enfermedad no difirió significativamente ($p = 0,9854$) tras estimular con los distintos PPD.

Cálculo del punto de corte para las pruebas de liberación de γ IFN

Se establecieron los puntos de corte para cada ensayo sobre la base de los valores de estimulación obtenidos en los rodeos control (libres de la enfermedad). Se asumió una distribución normal de los datos y se calcularon las medianas y los desvíos estándar (SD). El punto de corte se calculó como la mediana más $1,96 \times$ SD de los índices de densidad óptica (IDO) de los animales de los tambos control. Cuando se empleó PPD_a como antígeno, la mediana y el SD de los IDO fueron 1,1496 y 0,3012, respectivamente, lo que arroja un punto de corte de 1,74. Cuando se empleó PPD_j-IB, estos valores, en igual orden, fueron 1,1483 y 0,2868, y el punto de corte fue de 1,71.

Análisis de resultados y categorización de los animales

Los resultados de la prueba de liberación de γ IFN junto con los resultados de las otras pruebas (cultivo, Ziehl Neelsen y ELISA) y el estado general de cada animal al momento del muestreo pueden observarse en la Tabla 1. Sobre la base de los puntos de corte para las pruebas de liberación de γ IFN, se determinó el número de animales reconocidos como positivos por cada PPD.

Los animales fueron clasificados en distintas categorías según los criterios que se describen a continuación. Aquellos animales con cultivo positivo (materia fecal y/o leche), como así también aquellos con Ziehl Neelsen positivo y serología positiva, fueron clasificados en la categoría de animales “eliminadores”. Los que presentaron solamente serología positiva fueron clasificados como animales “sensibilizados”. Los animales con sintomatología compatible con PTB (diarrea, bajo peso) y que a su vez tuvieron alguna prueba diagnóstica positiva fueron clasificados dentro de la categoría de animales “sintomáticos”, mientras

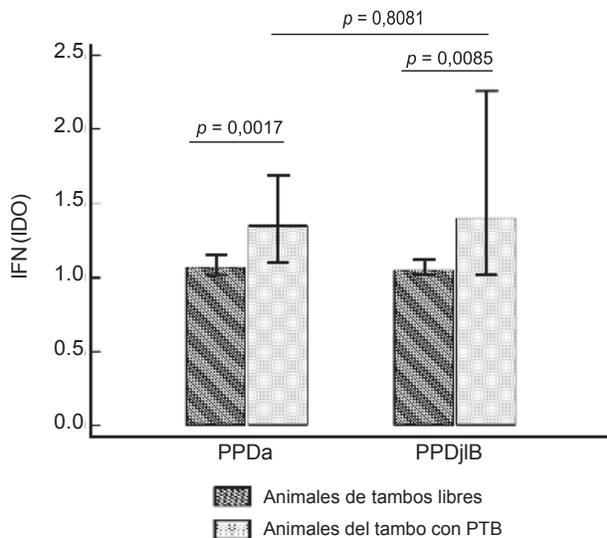


Figura 1. Respuesta de liberación de γ IFN por estimulación con PPD_a y PPD_j-IB.

Se muestran los valores de liberación de γ IFN (mediana) en los animales de los tambos expuestos a MAP ($n = 24$) y de tambos libres (control, $n = 24$). El valor se expresa como el índice de densidad óptica a 450 nm entre el PPD y el control del ensayo (IDO). Para las comparaciones de las medianas entre los distintos grupos de animales, se empleó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (muestras no pareadas). Para las comparaciones dentro de los grupos, se empleó el test no paramétrico de Wilcoxon (muestras pareadas). Las barras de error representan el IC 95 % para la mediana. $p < 0,05$ son diferencias significativas.

Tabla 1. Resultados de las distintas pruebas y estatus sanitario de los animales evaluados en el tambo con paratuberculosis

Animal (n=24)	Sintomatología	ELISA	ZN ⁽¹⁾	Cultivo ⁽²⁾ (muestra)	PPDa ⁽³⁾	PPDj-IB ⁽³⁾	PPDb ⁽³⁾	Animal (n=24)	PPDa ⁽³⁾	PPDj-IB ⁽³⁾	PPDb ⁽³⁾
1	-	-	-	-	1,88	3,11	1,76	25	1,05	1,05	1,04
2	-	+	-	-	1,1	1,01	1,05	26	1,08	1,07	1,01
3	-	+	+	-	1,93	2,26	1,25	27	0,98	1,02	1
4	-	+	-	-	1,68	1,66	1,31	28	1,15	1,2	1,06
5	-	+	+	+ (MF)	11,95	5,73	1,54	29	1,03	0,98	0,96
6	-	+	+	-	1,15	0,99	0,98	30	1,09	1,08	1,09
7	-	+	-	-	1,78	2,44	1,49	31	0,99	1,06	0,99
8	-	-	-	-	1,07	0,97	0,98	32	0,97	1,01	0,99
9	-	+	-	-	1,15	1,02	1,08	33	1,17	1,05	1,11
10	-	-	-	-	1,69	1,02	1,08	34	1,06	1	1,07
11	-	-	-	+ (L)	2,25	2,17	1,74	35	1,03	1,03	1,02
12	-	+	-	-	0,96	1,09	0,98	36	1,28	1,12	1,18
13	-	-	-	-	1,02	0,96	1,9	37	0,97	1,07	1,09
14	diarrea	-	-	-	1,36	2,34	1,37	38	1,01	1,02	0,98
15	-	+	-	-	1,28	1,63	1,14	39	1,11	1	1,1
16	-	-	-	-	1,08	1,07	1,07	40	1,1	1,34	1
17	-	-	-	+ (L/MF)	2,07	7,6	2,06	41	1,27	2,22	1,09
18	-	-	-	-	1,08	1,28	0,97	42	0,99	1,02	1
19	bajo peso	-	-	-	1,34	2,49	1,73	43	1,01	1,35	1,09
20	-	+	+	-	1,58	1,39	1,2	44	1,09	1,13	1,11
21	-	+	+	-	1,54	1,41	1,16	45	1,28	1	1,08
22	-	-	-	-	0,92	0,92	1,08	46	2,47	0,95	1,26
23	-	+	-	-	1,14	0,97	1,12	47	1,35	1,04	1,1
24	bajo peso	+	+	+ (MF)	1,51	1,43	1,37	48	1,06	1,05	1,04
Total+	3/24	13/24	6/24	4/24	6/24	8/24	4/24	Total +	1/24	1/24	0/24

Se resaltan en negrita los valores considerados positivos según el punto de corte establecido para cada prueba; ⁽¹⁾ Ziehl Neelsen en extendidos de materia fecal; ⁽²⁾ origen del aislamiento: MF, materia fecal; L, leche; ⁽³⁾ γ IFN IDO= DO_{PPD}/DO_{PBS}.

que los que presentaron algún síntoma compatible con la enfermedad, pero sin pruebas diagnósticas concurrentes, fueron considerados “sintomáticos sospechosos”. Finalmente, aquellos animales que formaban parte del rodeo infectado con PTB, pero que no presentaron sintomatología al momento del muestreo y resultaron negativos a todas las pruebas, fueron considerados animales “expuestos”.

Los resultados de las pruebas de liberación de γ IFN empleando los dos PPD en las distintas categorías establecidas se muestran en la Tabla 2. La prueba con PPDa reconoció al 25 % de los animales del rodeo problema; cuando se empleó PPDj-IB el porcentaje de animales reconocidos fue de 33,33 %. La diferencia estuvo restringida a la categoría de animales “sintomáticos sospechosos”, ya que estos

Tabla 2. Resultados de la prueba de liberación de γ IFN y categorización de los animales dentro del establecimiento con paratuberculosis

Animales	PPDa+	PPDj-IB +
Sensibilizados ⁽¹⁾	1/7	1/7
Eliminadores ⁽²⁾	4/7	4/7
Sintomáticos sospechosos ⁽³⁾	0/2	2/2
Sintomáticos	0/1	0/1
Expuestos ⁽⁴⁾	1/7	1/7
Total	6/24	8/24

⁽¹⁾Sensibilizados: animales con serología positiva únicamente; ⁽²⁾eliminadores: animales no sintomáticos con cultivo positivo o Ziehl Neelsen positivo; ⁽³⁾sintomáticos sospechosos: clínica con alguno o varios síntomas compatibles con PTB al momento del muestreo, pero sin pruebas diagnósticas positivas; ⁽⁴⁾expuestos: animales negativos a todas las pruebas.

animales ($n = 2$) solo fueron reconocidos por la prueba con PPDj-IB, y uno de ellos por el PPDa (Tabla 1).

En los tambos libres de la enfermedad y en concordancia con el punto de corte seleccionado, se obtuvieron animales positivos con ambos PPD: uno con PPDa y otro con PPDj-IB. Estos animales son considerados reactivos inespecíficos y podrían estar sensibilizados con bacterias ambientales.

Correlación entre las pruebas de liberación de γ FN

La respuesta de la mayoría de los animales del tambo problema mantuvo la misma relación frente a ambos PPD, con una correlación positiva ($\rho = 0,761$; $p = 0,0003$) (Figura 2). Es interesante mencionar que la respuesta individual de algunos de los animales fue distinta frente a los PPD evaluados. El animal 17 fue un animal eliminador, tanto por materia fecal como por leche, y fue positivo por ambas pruebas. Sin embargo, los niveles de estimulación obtenidos con PPDj-IB fueron 3,7 veces superiores a los obtenidos con PPDa como antígeno inductor de la prueba. El animal 5, eliminador por materia fecal, representa el caso opuesto, con un índice de estimulación 2 veces mayor con PPDa respecto del obtenido con PPDj-IB (Tabla 1).

No se obtuvo correlación entre la respuesta celular evaluada con los distintos antígenos y los niveles de respuesta humoral de los animales (resultados no mostrados).

Análisis antigénico de los PPD

Se realizó un ensayo de *Western blot* para identificar distintos antígenos en los PPD. Considerando que los sueros hiperinmunes específicos empleados para la detección de los distintos antígenos reconocen por igual a los ortólogos en ambas subespecies (resultados no mostrados), pudimos observar diferencias en la concentración de algunos antígenos presentes en las PPD. La concentración de LAM fue superior en PPDj-IB. Por otro lado, el antígeno Apa/ModD se encontró en grandes cantidades en el PPDa (Figura 3). Otros antígenos como LprG, Hsp70 y Lpp24 estuvieron igualmente representados en ambos PPD. La saturación de la señal en los controles positivos se debe a los largos tiempos de revelado necesarios para la visualización de la señal en alguno de los PPD.

El análisis de la presencia de distintos antígenos por *Western blot* demostró que, pese a evaluarse antígenos conservados en ambas subespecies, la composición antigénica de estos PPD es diferencial.

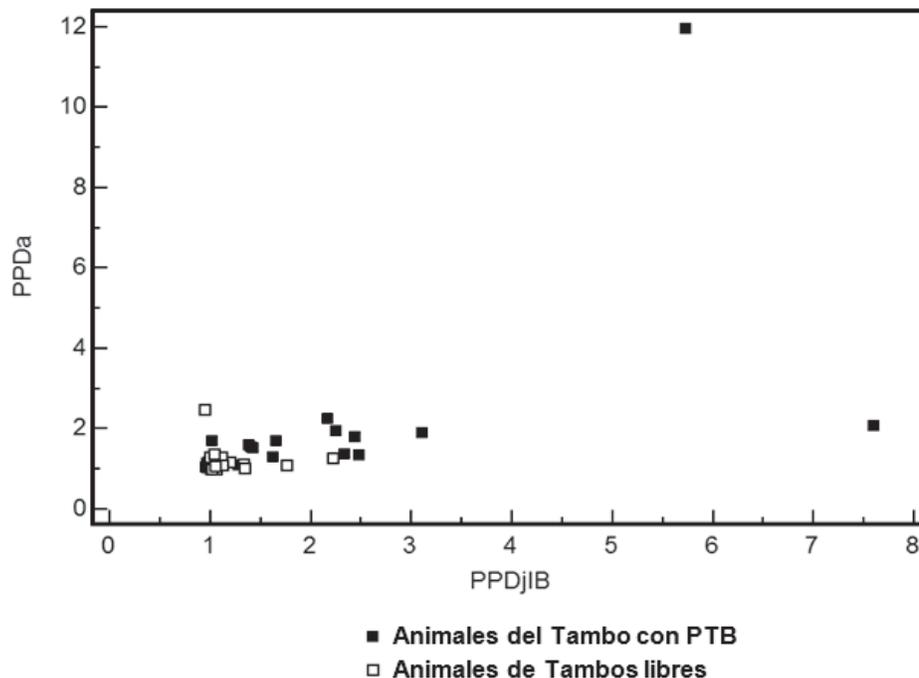


Figura 2. Análisis de correlación entre la respuesta celular frente a PPDj-IB y PPDa. Se muestran los valores de IDO450 nm para cada animal empleando los dos PPD. El valor ρ calculado mediante la correlación por *ranking* de Spearman fue $r = 0,761$ ($p = 0,0003$) para los animales del tambo con PTB.

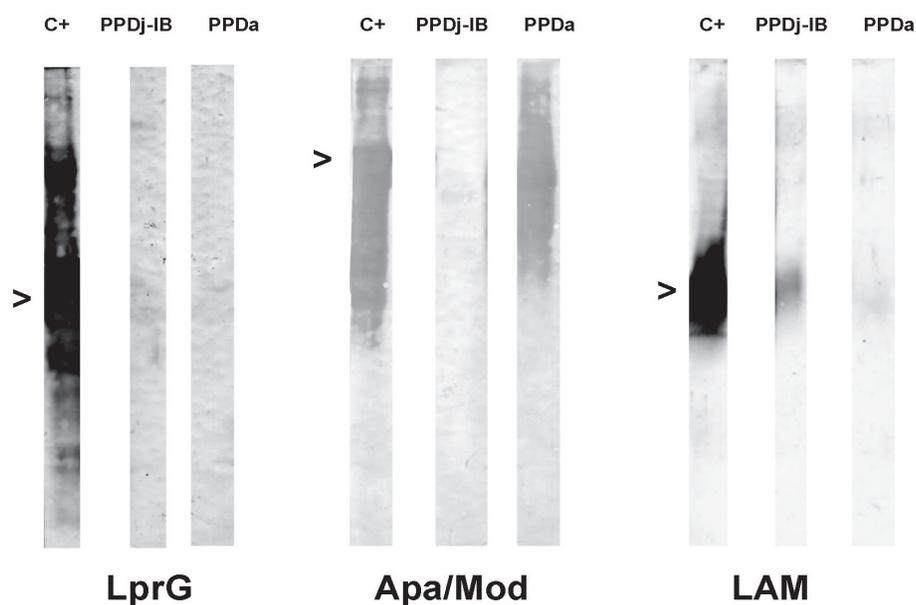


Figura 3. Análisis por *Western blot* de algunos de los antígenos componentes de PPDj-IB y de PPDa. Presencia diferencial de antígenos en los PPD. Se indica con ">" el tamaño esperado de la molécula estudiada. C+: proteína recombinante para LprG y APA/ModD; extracto de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* para LAM.

DISCUSIÓN

Las tuberculinas que se encuentran ampliamente disponibles en el mercado son el PPD_b, elaborado con la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*, y el PPD_a, elaborado con la cepa D4-ER de *M. avium* subsp. *avium*. Son escasos los informes de la utilización de PPD producido a partir de una cepa de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, o PPD_j (johnina), y también son pocos los trabajos donde se compara la eficacia de los PPD_a y PPD_j.

Jungersen *et al.* (16) realizaron un estudio empleando el PPD_a (Biocor) y un PPD de producción local a partir de un aislamiento de MAP denominado "Promise". En ese estudio tuvieron una sensibilidad menor cuando estimularon con PPD_j. Sin embargo, este último había sido preparado en el año 1975 y se conservó liofilizado durante al menos 20 años hasta su utilización. Por otro lado, Koets *et al.* (17) emplearon dos PPD producidos a partir de la cepa 3+5/C de MAP (que denominaron PPD_p) y la cepa de referencia *M. avium* subsp. *avium* D4 en un ensayo de proliferación celular *in vitro*. En este trabajo obtuvieron una respuesta significativamente mayor cuando estimularon con PPD_p.

En estudios previos de nuestro laboratorio en los que se practicó la prueba de γ IFN en animales infectados con MAP, hemos observado que los

niveles de respuesta obtenidos con el antígeno aviar fueron frecuentemente menores que los comunicados en la bibliografía (datos no publicados). Por otro lado, se ha descrito que la utilización de un antígeno preparado a partir de una cepa de MAP indígena mejoró la sensibilidad del diagnóstico serológico de PTB caprina en India (27). Estas evidencias nos llevaron a preguntarnos si las cepas predominantes en nuestro país tendrían un repertorio antigénico diferente del que exhiben las cepas que circulan en otros países.

En un estudio de tipificación molecular (IS900-RFLP) realizado en animales provenientes de la provincia de Buenos Aires, se describieron cuatro patrones circulantes, uno de los cuales (denominado "A") agrupó al 75 % de los aislamientos (21). Mientras que dicho patrón es muy poco frecuente en Europa, los tres patrones restantes no se encontraban descritos en el viejo continente. Por este motivo, en este trabajo elaboramos un derivado proteico purificado (PPDj-IB) a partir de un aislamiento regional de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (patrón A) mediante un protocolo adaptado al laboratorio.

La infección por MAP es crónica y puede producir distintos efectos adversos en distintos tiempos del período de incubación. La eliminación del bacilo por materia fecal es intermitente. El cultivo es costoso,

requiere de especialización y su resultado puede demorar semanas o meses. Además, la descripción reciente de que algunos animales de granjas pueden comportarse como “supereliminadores” de la bacteria (10^4 - 10^7 MAP/ g de heces), sin que necesariamente se encuentren infectados (“eliminadores pasivos”) (30), hace que la prueba de cultivo a partir de materia fecal, por lo general empleada como estándar de referencia, aparezca al menos como limitada y sean necesarios otros tipos de análisis (25). Dos revisiones recientes reflejan la complejidad de la evaluación de las pruebas diagnósticas en infecciones crónicas como la PTB, y establecen criterios estandarizados para su análisis e informe (8, 22).

Debido a que el número de animales muestreados en el presente estudio fue limitado, no se determinó la sensibilidad y especificidad de las pruebas de γ IFN empleadas y debería validarse la PPDj-IB en un número mayor de animales. Sin embargo, se pudieron realizar valiosas observaciones. De acuerdo con los resultados obtenidos en el tambo problema, los dos PPD identificaron como reactores positivos a los mismos animales, con excepción de dos de ellos, únicamente reconocidos por la prueba que empleó la PPDj-IB. Estos animales resultaron negativos en las pruebas complementarias ensayadas (cultivo, ELISA, Ziehl Neelsen) y únicamente presentaron un bajo peso corporal, sin registro de diarrea al momento del muestreo, por lo que fueron clasificados como animales sintomáticos sospechosos. Es interesante mencionar que uno de estos animales (animal 14) había resultado positivo a la prueba de ELISA en un muestreo realizado un año antes, por lo que puede considerarse que este es un animal infectado y que el resultado del ELISA observado en el presente estudio se deba a fluctuaciones de la respuesta humoral del animal. En este caso, la estimulación de la liberación de γ IFN por uno solo de los PPD se explicaría por la presencia de antígenos diferenciales o en distinta concentración. Asimismo, se observó en algunos animales una respuesta diferencial en los niveles de citoquinas producidos. Es de esperar que la respuesta diferencial de estos animales sea también consecuencia de la presencia de antígenos específicos de cada sub-especie, o de la distinta concentración de antígenos micobacterianos conservados.

En este trabajo analizamos un panel de cinco antígenos conservados en micobacterias y observamos diferencias de concentración en dos de ellos. Uno fue el LAM, que es un componente esencial de la pared celular de las micobacterias. Se encontró que el LAM

estuvo representado en mayor proporción en la mezcla PPDj-IB respecto del PPDa. La presencia de otros antígenos, como APA-ModD (antígeno gluco-proteico, principalmente secretado), también fue diferencial: en este caso, dicho antígeno fue más abundante en el PPDa comercial. Sin embargo, se ha descrito que este antígeno no es buen inductor de la respuesta celular en muchos de los animales evaluados (10).

Cabe mencionar que distintas condiciones de cultivo (como el medio empleado, la aireación y el tiempo de crecimiento) pueden modificar la expresión de algunos antígenos. Pudimos observar que algunos animales sanos de los tambos no infectados presentaron valores de estimulación significativos con ambos PPD. Esta respuesta de estimulación frente a PPD en animales no infectados ya ha sido comunicada previamente (16). Dada la condición de los tambos empleados como control en nuestro estudio, donde no se registra la enfermedad en un período de al menos diez años, donde no hay reposición de animales desde otros establecimientos y donde tampoco se aisló la bacteria por cultivo de materia fecal, consideramos que esta reacción es consecuencia de reacciones cruzadas con las micobacterias saprófitas que están en contacto con los animales.

El antígeno PPD (bovino o aviar) comercializado y utilizado para la intradermorreacción en Argentina contiene agentes preservantes como el fenol, que impide su utilización en ensayos *in vitro* (liberación de γ IFN, linfoproliferación), consecuentemente, no resulta fácil recurrir a estas técnicas diagnósticas. La implementación del PPDj-IB preparado a partir de un aislamiento de campo de MAP de Argentina nos permitió demostrar que si bien los niveles de estimulación logrados no difieren significativamente de los obtenidos con el PPDa comercial en la prueba de liberación de γ IFN, su empleo permitiría la identificación de algunos animales no detectados con el antígeno convencional. Asimismo, mediante un protocolo fácilmente reproducible en el laboratorio, se pudo obtener un PPD que resultó apta para este tipo de ensayo. Finalmente, consideramos útil profundizar los estudios orientados a la producción optimizada de PPD a partir de cepas locales y su evaluación, ya que estas tienen la potencialidad de ser herramientas más efectivas para el control de las infecciones micobacterianas en nuestro país.

Agradecimientos: A los productores, médicos veterinarios y personal al cuidado de los animales de este estudio. A Valeria Rocha, por su colaboración. Este trabajo fue realizado con

fondos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y de la ANPCyT. AG y MIR son investigadores del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Bannantine J, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1303-10.
- Bannantine JP, Zhang Q, Li LL, Kapur V. Genomic homogeneity between *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* belies their divergent growth rates. *BMC Microbiol* 2003; 9: 3-10.
- Bannantine J, Hansen J, Paustian M, Amonsin A, Li L, Stabel J, Kapur V. Expression and immunogenicity of proteins encoded by sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 106-14.
- Barry C, Corbett D, Douwe B, Andersen P, McNair J, Strain S. The effect of *Mycobacterium avium* complex infections on routine *Mycobacterium bovis* diagnostic tests. *Vet Med Int* 2011; 2011: 145092 (Online) <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/145092>
- Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 63: 45-55.
- Collins D, Gabric D, Lisle G. Identification of repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 51: 175-8.
- Coussens PM. Model for immune responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in cattle. *Infect Immun* 2004; 72: 3089-96.
- Gioffré A. Identificación y caracterización de antígenos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas 2007; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.
- Gioffré A, Echeverría-Valencia G, Arese A, Morsella C, Garbaccio S, Delgado F, Zumárraga M, Paolicchi F, Cataldi A, Romano MI. Characterization of the Apa antigen from *M. avium* subsp. *paratuberculosis*: a conserved *Mycobacterium* antigen that elicits a strong humoral response in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132: 199-208.
- Gilot P, Cocito C. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 110: 307-11.
- Huda A, Lind P, Christoffersen A, Jungersen G. Analysis of repeated tests for interferon-gamma (IFN- γ) response and faecal excretion for diagnosis of subclinical paratuberculosis in Danish cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 94: 95-103.
- Gardner IA, Nielsen SS, Whittington RJ, Collins MT, Bakker D, Harris B, Sreevatsan S, Lombard JE, Sweeney R, Smith DR, Gavalchin J, Eda S. Consensus-based reporting standards for diagnostic test accuracy studies for paratuberculosis in ruminants. *Prev Vet Med* 2011; 101: 18-34.
- Huda A, Jungersen G, Lind P. Longitudinal study of interferon-gamma, serum antibody and milk antibody responses in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2004; 104: 43-53.
- Hughes V, Bannantine J, Denham S, Smith S, Garcia-Sanchez A, Sales J, Paustian M, Mclean K, Stevenson K. Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific proteins in sheep with paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1824-33.
- Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1998; 17: 469-86.
- Jungersen G, Huda A, Hansen J, Lind P. Interpretation of the Gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 453-60.
- Koets A, Rutten V, Bakker D, van Zijderverld F, Muller K, van Eden W. Heat-shock-protein-specific T-cell responses in various stages of bovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70: 105-15.
- Koets A, Rutten V, Hoek A, van Mil F, Müller K, Bakker D, Gruys E, van Eden W. Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4 T cells, increased frequency of T Cells, and related changes in T-cell function. *Infect Immun* 2002; 70: 3856-64.
- McIntosh C, Konst H. Tuberculin. *Can J Comp Med* 1947; 11: 344-51.
- Monaghan M, Doherty M, Collins J, Kazda J, Quinn P. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 1994; 40: 11-124.
- Moreira A, Paolicchi F, Morsella C, Zumárraga M, Cataldi A, Fabiana B, Alicia A, Piet O, van Soolingen D, Romano MI. Distribution of IS900 restriction fragment length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *Vet Microbiol* 1999; 70: 251-9.
- Nielsen SS, Toft N, Gardner IA. Structured approach to design of diagnostic test evaluation studies for chronic progressive infections in animals. *Vet Microbiol* 2011; 150: 115-25.
- Paolicchi F, Zumárraga M, Gioffré A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano MI. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med* 2003; 50: 20-6.
- Radosevich T, Reinhardt T, Lippolis J, Bannantine J, Stabel J. Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains K-10 and 187. *J Bacteriol* 2007; 189: 1109-17.
- Rutjes A, Reitsma J, Coomarasamy A, Khan K, Bossuyt P. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol Assess* 2007; 11: 1-72.
- SENASA. Subcomisión Nacional de Tuberculosis Bovina. Manual de actualización en tuberculosis bovina, 2000. En: Kantor I, editora. Buenos Aires, Argentina.
- Singh AV, Singh SV, Sohal JS, Singh PK. Comparative potential of modified indigenous, indigenous and commercial ELISA kits for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in goat and sheep. *Indian J Exp Biol* 2009; 47: 379-82.
- Stabel J. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 2000; 77: 465-73.
- Torres P. Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. En www.senasa.gov.ar (consultado el 23-5-2012).

30. Whitlock, RH, Sweeney RW, Fyock T, Smith J. MAP super-shedders: another factor in the control of Johne's disease. 8th International Colloquium on Paratuberculosis, 2005, p. 164, Madison, EE.UU.
31. Wood P, Corner L, Plackett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of interferon-gamma. Res Vet Sci 1990; 49: 46-9.

Recibido: 29/11/2011- Aceptado: 25/7/2012