

**ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA** ISSN 0327-8093
TOMO LIV
BUENOS AIRES REPUBLICA ARGENTINA

**Comunicación del Académico de Número
Dr. M.V. Bernardo J. Carrillo**

**Comparación de Métodos de Diagnóstico
de la Tuberculosis Bovina**



SESION ORDINARIA
del
11 de Mayo de 2000

Comunicación del Académico de Número Dr. M. V. Bernardo J. Carrillo*

Comparación de métodos de diagnóstico de la Tuberculosis Bovina**

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica, zoonótica, causada por el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) cuyo huésped primario es el bovino y diversas especies de mamíferos.

El *M. bovis* causa en el ganado una enfermedad similar a la tuberculosis humana, ocasionando pérdidas económicas asociadas con una disminución de la producción de leche y de carne, con importantes decomisos y restricciones en el comercio internacional de animales vivos y productos y subproductos de origen animal. Estas pérdidas económicas y su importancia en relación con la salud humana son factores prioritarios para encarar el control y erradicación de esta enfermedad.

La Argentina ha reaccionado frente a esta enfermedad crónica y por intermedio del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), de Universidades y de Asociaciones de Productores, ha elaborado un programa nacional para el control y erradicación de esta enfermedad (Resolución 115/99).

En cuanto a la Salud Pública el impacto es mayor en niños que consumen leche cruda y en los peones y veterinarios que están en contacto con los animales, estando también expuestos los trabajadores de la industria de la carne.

La índole del problema hace necesario llevar adelante planes de

control, para lo cual es indispensable evaluar la efectividad de diferentes técnicas de diagnóstico que se caractericen por su sensibilidad, sencillez, bajo costo y alta especificidad que minimicen la posibilidad de falsos positivos y/o falsos negativos cuya existencia se convalida por el aislamiento y tipificación del bacilo por técnicas de cultivo.

En una comunicación anterior Anales Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Tomo LII - 1998 ya se ha presentado un resumen de los resultados obtenidos de la comparación de técnicas in vivo e in vitro ya indicando que la prueba de PPD - intradermoreacción, a pesar de sus inconvenientes, seguía siendo la técnica de elección para el diagnóstico de la tuberculosis bovina y el saneamiento de rodeos y que la técnica de ELISA resultaba una buena técnica complementaria de PPD, que permitió la detección de animales enfermos pero PPD negativos y cortar así la fuente de infección, lo que facilitó el saneamiento de los rodeos en estudio. Estos resultados serán presentados y actualizados por el Dr. Sergio Garbaccio en esta comunicación como informe final de la 1ª parte del Proyecto original.

Como se mencionó oportunamente el Proyecto continuó en su 2ª parte a través de la búsqueda de nuevos antígenos inmunodominantes de *M. bovis*, lo que tiene como principal finalidad obtener un producto que responda a un grado de sensibilidad y especificidad que garantice en un futuro

*Recibido para publicación el 29 de Junio de 2000.

** Proyecto de investigación financiado por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV) con participación del CICV-INTA, Castelar, Académico responsable Dr. Bernardo J. Carrillo. Investigadores ejecutores del Proyecto: Dr. J. Pereira, Dr. L. Villa, Dr. S. Garbaccio, Dra. Alicia Alito y Dra. Celia Antognali.

técnicas de diagnóstico lo suficientemente confiables, reduciendo al máximo el error de condenar a animales falsos positivos. Esta presentación estará a cargo de la Dra. Alicia Alito como investigadora responsable de esta 2^{da} parte del Proyecto original.

Hace aproximadamente un mes, el día 6 de abril de 2000 se tuvo la oportunidad de escuchar una conferencia del Dr. M. Salman - Profesor de Epidemiología Veterinaria de la Universidad de Colorado Fort Collins - Colorado - EE.UU. Esta conferencia que fue patrocinada por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria y por el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del INTA. Castelar estuvo destinada a informar sobre los avances de investigación en tuberculosis en los EE.UU. y su aplicación en programas de control. Fue interesante escuchar al Dr. Salman quien en apretada síntesis ilustró sobre las opciones disponibles para los programas de control de la tuberculosis bovina y del estado actual del Programa de Control de la Tuberculosis Bovina en EE.UU. como así también de los obstáculos existentes para erradicar la enfermedad. Informó también sobre los diversos proyectos de investigación en marcha y de los avances en técnicas de laboratorio particularmente en aspectos moleculares.

Esto permitió reafirmar la importancia de esta enfermedad en sus aspectos de Salud Pública, con su renovada presencia debida al SIDA y todas sus consecuencias sociales.

La presentación del Dr. Salman será publicada en Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Tomo LIV, pero está ya a

disposición de los Sres. Académicos que no hayan podido asistir a la citada conferencia.

El Dr. Salman estaba en el país como experto y consultor de un proyecto que desarrollan los Institutos de Patobiología y Biotecnología del CNIA - INTA, Castelar con la Agencia de Energía Atómica de Viena (AIEA) relacionado con el mejoramiento del diagnóstico de tuberculosis bovina utilizando técnicas biotecnológicas de avanzada especialmente PCR. Este proyecto fue aprobado para su realización en el período 2000/2001.

Es importante hacer resaltar que como consecuencia del proyecto original entre INTA y la ANAV denominado Diagnóstico de Tuberculosis Bovina: Comparación de técnicas in vivo e in vitro, de los resultados obtenidos y del equipo formado con dicho proyecto surgió esta propuesta de avanzada que finalmente recibe apoyo de una entidad internacional como es la Agencia de Energía Atómica, AIEA y con muy buenas perspectivas. Restan actividades de campo que habrá que cumplir para lo cual se está solicitando apoyo de la ANAV.

Es por ello que pareció pertinente presentar al cuerpo académico los resultados obtenidos en la 1^a y 2^a parte de este proyecto, como también las posibilidades futuras de su continuación con miras a apoyar al programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina en que están empeñadas las autoridades de SENASA.

Cederé ahora la palabra a los responsables de las actividades técnicas realizadas Dres. Sergio Garbaccio, Alicia Alito y Jorge Pereira a fin de que realicen las presentaciones de sus respectivas tareas.

Comparación de Técnicas de Diagnóstico de Tuberculosis Bovina.

Presentación Dr. S. Garbaccio.

Introducción:

El proyecto en el que se trabajó, cuyo título fue "Diagnóstico de Tuberculosis bovina. Comparación de técnica in vivo e in vitro", tuvo como objetivo final evaluar la incorporación de técnicas disponibles para el mejoramiento del diagnóstico de la tuberculosis bovina.

De esta manera, el proyecto estuvo compuesto por un trabajo de campo, que consistió en tuberculización y toma de muestras de suero bovino y un trabajo en matadero, en el cual se realizó la recolección de muestras de órganos y la observación para determinar presencia o no de lesiones macroscópicas compatibles con esta enfermedad.

Por último, ya con el suero bovino y las muestras de órganos disponibles en el laboratorio, se llevó a cabo, por un lado el test serológico ELISA y se desarrolló el protocolo de bacteriología para concluir finalmente con la tipificación del microorganismo.

De esta manera se buscó abarcar el amplio espacio que implica comenzar el análisis desde el animal inserto en el sistema productivo hasta brindar el resultado detallado acerca del agente etiológico que se logró aislar.

Etapa de campo:

Se realizaron un total de (10.154) pruebas indirectas que incluyeron PPD-tuberculina y el test de ELISA sobre un universo de 3619 bovinos incorporados al proyecto.

CUADRO 1

Situación de los establecimientos afectados al proyecto de investigación

RODEO	TIPO DE EXPLOTACION	TOTAL DE ANIMALES CONTROLADOS	PREVALENCIA INICIAL	PREVALENCIA ACTUAL
Suipacha 1	Tambo	202	3,5%	0%
Suipacha 2	Tambo	250	4%	1%
Suipacha 3	Cría	412	2%	0,5%
Suipacha 4	Tambo	221	1%	0%
Suipacha 5	Tambo	122	9,6%	Disolución del sistema productivo
Suipacha 6	Tambo	501	6,2%	0,2%
Ituzaingó	Cría	307	9%	0%
Gral. Belgrano	Tambo	562	14%	0%
Gral. Pino	Tambo	410	41%	0%
Chascomús	Tambo	632	19,5%	0%

PRUEBAS INDIRECTAS REALIZADAS (PPD-ELISA): 10154
TOTAL DE BOVINOS CONTROLADOS: 3619

Es este cuadro podemos observar: en primer lugar, el tipo de explotación y la cantidad de animales de cada una; en segundo lugar, las distintas prevalencias al momento de comenzar el estudio y la mismas al finalizarlo, mostrando netamente la posibilidad que se tuvo de sanear la mayoría de ellos.

Etapas de matanza:

A partir de los resultados obtenidos a campo, se recogieron muestras

en playa sobre un total de 240 animales. Al respecto cabe señalar, que aquellos bovinos que resultaron negativos a ambas pruebas diagnósticas (35) y que eran descartados por motivos ajenos fueron muestreados de igual manera que el resto.

Las muestras fueron sometidas al protocolo de trabajo establecido en el laboratorio de bacteriología y fue así como se obtuvieron 93 aislamientos microbianos de los 240 bovinos muestreados.

CUADRO 2

Distribución de las lesiones o no (SLA) presentes en diversos sistemas y resultados obtenidos con ambas pruebas diagnósticas (PPD y ELISA), pertenecientes a animales con aislamiento microbiano positivo (93).

SISTEMA AFECTADO	Resultado de los aislamientos obtenidos a (PPD/Elisa)					TOTALES
	N/N	N/P	P/N	P/P	P/S	
Respiratorio	2	1	37	--	1	41
Digestivo	2	2	4	--	--	8
Resp+Digestivo	--	--	6	2	2	10
SLA*	5	6	18	1	4	34
TOTALES	9	9	65	3	7	93

* Sin lesiones aparentes

Un aspecto interesante para observar de los aislamientos, fue la presencia o no de lesiones y su relación con los resultados obtenidos a la prueba intradérmica y al test de Elisa.

También es importante considerar a los animales negativos a ambas pruebas (PPD-Elisa, 35); de los

cuales cuatro de ellos mostraron lesiones en el momento de la faena y además que en 9 casos se realizó aislamiento bacteriológico.

Por otro lado se observa la posibilidad de realizar aislamientos (34) de animales sin lesiones aparentes y que naturalmente no sufrieron decomiso alguno.

CUADRO 3

Resultados del aislamiento microbiano partir de animales enviados a faena tras un resultado positivo Elisa

RESULTADOS ELISA	
ELISA Positivos 26	Aislamientos de <i>M. bovis</i> 5

Con respecto a 26 animales enviados a faena por ser positivos al test Elisa 5 de ellos produjeron aislamiento positivo con posterior tipificación de *M. bovis*.

Conclusiones

- Sin ser la finalidad de este estudio el saneamiento de los rodeos comprometidos en el proyecto, cabría señalar la posibilidad que se tuvo de poder controlar esta enfermedad, quedando en su mayoría a disposición del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) para la obtención del certificado de establecimiento libre de tuberculosis bovina.
- Por otro lado, los aislamientos logrados provenientes de animales que no presentaron lesiones macroscópicas aparentes (SLA) en faena; señala una grave falencia en la individualización de los bovinos problema, siguiendo estos la vía habitual de comercialización sin sufrir decomiso total ni parcial.
- Otra importante observación, surge de los aislamientos obtenidos de bovinos negativos a PPD y a Elisa; que indica una falencia en la detección de

los animales problema del rodeo, retrasando de esta manera el trabajo de control y erradicación.

- Si bien la prueba serológica Elisa no presentó las bondades deseadas se pudo eliminar animales problema.
- Teniendo en cuenta los resultados, se solicitó a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, continúe apoyando en estudios de intentar mejorar las técnicas diagnósticas disponibles a través de la búsqueda de nuevos antígenos inmunodominantes, que al incorporarlos a dichas técnicas, permitan tener un incremento en la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la Tuberculosis bovina.
- Por último y sin lugar a dudas se considera que la prueba tuberculínica PPD continua siendo la técnica de elección para el diagnóstico y saneamiento de esta enfermedad en los rodeos bovinos.

Identificación de antígenos Inmunodominantes de M. bovis*

Presentación: Dra. Alicia Alito

Introducción

*Esta investigación tiene como principal finalidad la de obtener un producto (antígeno) lo más purificado posible, que responda a un grado de sensibilidad y especificidad que garantice en un futuro técnicas de diagnóstico lo suficientemente confiables, reduciendo al máximo el error de condenar a animales falsos positivos a tuberculosis bovina.

La tuberculosis bovina (TBB) cuyo agente etiológico es el M. bovis es una enfermedad endémica en el país que no sólo tiene impacto en la producción animal por producir importantes pérdidas sino también en la Salud Pública por ser una zoonosis.

La caracterización de antígenos micobacterianos, incluyendo los antígenos de M. bovis, ha sido uno de los principales objetivos tenidos en cuenta en los trabajos de Seibert (Seibert 1934; Seibert and Glen, 1941) al producir el derivado proteico purificado (PPD) con la esperanza de obtener reactivos bien definidos y específicos para ser utilizados en pruebas diagnósticas. La prueba intradérmica de tuberculina es el método diagnóstico generalmente utilizado para detectar infección a M. bovis. Esta prueba se basa en la medición de la respuesta de hipersensibilidad tardía a la inyección intradérmica de PPD de tuberculina presentando una baja especificidad debido en parte a la compleja naturaleza del antígeno (PPD) usado, el cual incluye varias proteínas que dan reacción cruzada por ser proteínas comu-

nes a otras especies de micobacterias. (Bass J. B. Jr 1993).

El análisis y el estudio de los componentes micobacterianos permitieron lograr un mejor entendimiento del curso de la infección, del desarrollo de la enfermedad y de la respuesta inmunológica en los animales infectados. (Young, 1990) En el ámbito de tuberculosis humana se ha comenzado a producir proteínas recombinantes e incluso péptidos sintéticos derivados de las secuencias de varios antígenos micobacterianos de M. tuberculosis y se ha encontrado que son efectivos en producir reacción de hipersensibilidad tardía en cobayos, ratones y en voluntarios humanos. (Minden et al., 1986; Vordermier et al., 1992, Ashbridge et al., 1992).

El interés desde el punto de vista veterinario en los antígenos de M. bovis está dirigido principalmente al desarrollo de mejores pruebas diagnósticas en cuyo diseño se incluyan antígenos bien caracterizados y altamente específicos. Por lo tanto, los métodos diagnósticos alternativos tales como los serológicos si se implementasen con proteínas bien definidas correspondientes a antígenos micobacterianos específicos de M. bovis ayudarían a lograr un diagnóstico certero. Esto llevó a plantear como objetivo en este trabajo identificar los antígenos inmuno dominantes presentes en el sobrenadante de un cultivo de una cepa de M. bovis.

* Colaboraron en este Proyecto los Dres. S. Garbaccio, Veronica Simonetti, Fabiana Bigi, A. Cataldi, María C. Antognoli, L. Villa y J. Pereira.

Materiales

a) Animales

Raza: Holanda Argentina

Categorías: Adultos 29 vacas- terneros 5

Establecimientos: pertenecientes a la provincia de Buenos Aires (Suipacha, Gral Belgrano, Gral. Pintos, Lezama y Chivilcoy).

Se conformaron estos seis grupos:

GRUPO Ia (adultos)	PPD positivo Cultivo positivo*
GRUPO Ib (terneros)	PPD positivo Cultivo positivo*
GRUPO Iia	PPD negativo (perteneciente a campo infectado)
GRUPO Iib	PPD negativo Cultivo positivo
GRUPO III	PPD negativo (<i>campo libre</i>)
GRUPO EI	Experimentalmente infectados Sueros cedidos por gentileza del Dr. Pollock*

Aislamiento de micobacterias tipificadas como *M.bovis* a través de pruebas bioquímicas. *laboratorios de Inmunología del departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto Nacional de Agricultura de Irlanda del Norte.

b) Reactivos: anticuerpos monoclonales anti MPB70 y ESAT-6.

Métodos

a) Obtención y cuantificación de proteínas

Se cultivó una cepa patrón de *M. bovis* (AN5) en Middlebrook 7H9 libre de proteínas más ácido pirúvico y glucosa ambos al 0,4%. Se incubó a 37 C durante períodos variables de 6,12, 24/34; 60,75/80 y 140 días. Se separó el sobrenadante del extracto celular por centrifugado y se trató con sulfato de amonio al 50%. Las proteínas precipitadas se dializaron contra buffer fosfato (pH 7.2) y se cuantificaron por el método del ácido bicinchonimico (BCA)

b) Perfil de proteínas secretadas por *M.bovis*

Electroforesis desnaturalizantes (gel de polyacrilamida dodecil sulfato de sodio electrophoresis) SDS-PAGE 12.5% con los sobrenadantes indicados en el ítem b y sulfato de sodio sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electro-phoresis para la separación de las proteínas en el rango de 1 a 100 kDa. Se seleccionó el sobrenadante de un cultivo de 34 días. Los marcadores de PM utilizado fueron para el primero de los geles: *prestained SDS-PAGE amplio rango (7-209 kDa)* y para el segundo *Kaleidoscope Polypeptide (3,8-36,4 kDa)*, ambos de Bio Rad. Se realizó tinción con nitrato de plata.

c) Reconocimiento de proteínas a través de anticuerpos

Se efectuó a través de la técnica de transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Western blot).

Brevemente esta metodología consiste en realizar un SDS-PAGE o tricina SDS-PAGE y las proteínas separadas en el gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis (Towbin, 1979). Se utiliza un buffer Tris-glicina conteniendo 20% de metanol. Para verificar si la transferencia ha sido correcta, se tiñe la membrana con Rojo Ponceau. Luego se bloquean con una solución Tris-sodio, Tween 20 y gelatina (TTBSG) incubándolas toda la noche para eliminar reacciones inespecíficas. Posteriormente, se agregan a la membrana los sueros diluidos (1:100) de los animales pertenecientes al ítem a) en TTBSG. Se los deja incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en constante agitación. Se lavan las membranas con TTBS (3X10')

Se agrega IgG anti bovino conjugado con fosfatasa alcalina 1:1000 en TTBSG. Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas constante agitación. Se repiten los lavados con TTBS y un último lavado con buffer de fosfatasa alcalina. El revelado se realiza con una solución de 5-bromo -4cloro-3indolyphosphate (BCIP) y toluidina nitroblue tetrazolium (NBT) en buffer de fosfatasa alcalina. Esta reacción se detiene con agua destilada.

d) Caracterización de las proteínas transferidas con anticuerpos monoclonales de proteínas secretadas por *M.bovis*

Dos fracciones de la membrana a la que se transfirió el gel de tricina-SDS-PAGE fueron incubadas separadamente con los anticuerpos monoclonales anti MPB70 y anti ESAT-6. Luego se las enfrentó a ambas con IgG anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina y se revelaron con BCIP y NBT.

Resultados

Análisis del perfil de proteínas del sobrenadante de una cepa de *M.bovis* (AN5) a distintos tiempos de cultivo.

a) SDS-PAGE

No se observa ninguna banda proteica diferencial entre los mismos en el rango de 14 a 97 kDa. Cabría señalar que a los 6 días de cultivo sólo aparecen las proteínas de 21.5 kDa y las bandas correspondientes a las proteínas del heat-shock (60/66 kDa). Además, la proteína de 21.5 kDa aumenta su concentración con el tiempo cosa que no sucede con las demás proteínas cuya concentración no varía en los distintos tiempos y hacen su aparición a partir de un cultivo de 12 días. (fig.1).

b) tricina-SDS-PAGE

No se observan bandas proteicas por debajo de 8,4 kDa a través de todos los tiempos de cultivos analizados. Existe semejanza en la secreción de las proteínas mayoritarias (8,4,14,16 y 25 kDa) en los distintos días. La fracción proteica de aproximadamente 12 kDa no se encuentra presente en el cultivo de 6 días.

Una fracción proteica de aproximadamente 10 kDa se encuentra sólo presente en el sobrenadante de un cultivo de 34 días y otra de 26 kDa se encuentra presente solo en los de 34,75 y 143 días (fig. 2)

Reconocimiento de estas fracciones proteicas por los sueros de los animales que conforman los distintos grupos en:

a) Las membranas que se transfirieron los geles SDS-PAGE

En las membranas de nitrocelulosa que se incubaron con los sueros pertenecientes a los **Grupos Ia y Ib** se detecta una banda a una altura aproximada de 22 kDa, un duplete entre

28/29 kDa, un triplete a los 34 kDa y las bandas características del reconocimiento de las proteínas del heat shock entre 60/70 kDa. En la membrana correspondiente al grupo Ib el duplete entre 28/29 kDa se ve sólo en el sobrenadante de 143 días.

En ambas membranas se observa que en las calles correspondientes a las proteínas del sobrenadante de 6 días se ve solo la banda correspondiente a 22 kDa y las de 60/70 kDa. Además en la calle correspondiente a las proteínas del sobrenadante de 143 días se observan dos bandas más entre 34 y 50 kDa (fig. 3 y 4)

Grupo Ia: un duplete entre 21/22 kDa y otro a la altura de 34 kDa. Muy tenues se ven las proteínas del heat shock (60/70 kDa).

Grupo Ib: una única banda de aproximadamente 22 kDa, un duplete entre 28/29 kDa, un duplete a los 34 kDa y las bandas correspondientes a las proteínas del heat shock. (fig. 5 y 6)

Grupo III: Se observan dos bandas tenues a la altura de 25 y 80 kDa. (fig. 7)

No se detectan diferencias en la reacción antígeno anticuerpo entre los días 12 y 143 días dentro del mismo grupo. Tampoco se detecta la presencia de antígenos en las fracciones de los sobrenadantes de los cultivos de 6 días.

b) Las membranas que se transfirieron los geles **tricina-SDS-PAGE**

Todos los grupos reconocen la fracción proteica a la altura de 22kDa. Una proteica de aproximadamente 28 kDa es fuertemente reconocida por dos animales de los grupos Ia y Ib y débilmente reconocida por el resto de los animales de los grupos Ia, Ib. Otra proteína de aproximadamente 30/31 kDa es débilmente reconocida por los grupos Ia, Ib, Ib. Los sueros de los animales experimentalmente infectados

reconocen el mismo patrón proteico que los grupos Ia y Ib. Uno de los sueros de un animal perteneciente al grupo Ia reconoció además las fracciones proteicas de 8,4,15 y 37 kDa. Los sueros de los animales de los grupos Ia y III tuvieron un patrón de reconocimiento distinto del de los animales naturalmente y experimentalmente infectados (fig. 8).

Caracterización de las proteínas transferidas con anticuerpos monoclonales de proteínas secretadas por *M.bovis*.

Con el anticuerpo MPB70 se obtuvo una banda a la altura de 22 kDa coincidente con las obtenidas con los sueros de los animales de los grupos Ia, Ib y Ib. Con el anticuerpo ESAT-6 se obtuvo una banda a la altura de 8,4 kDa coincidente con la obtenida con el suero del animal perteneciente al grupo Ia.

Conclusiones

a) La resolución que dan los geles de tricina-SDS-PAGE es mayor que la de SDS-PAGE 12.5% dado que permitió identificar fracciones proteicas en el rango de 14-36 kDa en los sobrenadantes de los cultivos de 6 días. Con la aplicación de esta metodología se puede decir que la gran mayoría de las proteínas de *M.bovis* ya se secretan a partir de los 6 días.

b) Patrón de respuesta semejante en el reconocimiento de los antígenos por los animales infectados.

c) Utilización de los antígenos MPB70, MPB83 y ESAT-6 en el diseño de un ELISA indirecto. La proteína de 22 kDa reconocida por los sueros de los animales infectados puede ser o el antígeno MPB70 o el MPB83 dado que ambas son reconocidas por el mismo monoclonal utilizado.

d) Aislar y caracterizar la proteína de

28/30 kDa presente en el suero de los animales infectados.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la determinación de antígenos inmunodominantes de *M. bovis* que pudieran ser reconocidos por anticuerpos bovinos. Para poder cumplimentar este objetivo la primera acción fue analizar el perfil de las proteínas secretadas por *M. bovis*: AN5 mediante geles (PAGE-SDS) y posterior tinción con nitrato de plata. Los cultivos crecieron en un medio libre de proteínas a 37°C durante 6, 12, 24, 34, 80 y 140 días respectivamente.

Se observó que no existía un comportamiento diferencial en la secreción de proteínas de: 7, 21, 5, 30, 5, 33, 57, 62 y 75, 5 kDa. Se estudió el reconocimiento de estas proteínas por los anticuerpos de animales naturales infectados mediante la técnica de Western blot. Se analizaron 30 sueros bovinos. Como controles se utilizaron sueros bovinos de campos libres de tuberculosis y bovinos "contactos". Los

resultados obtenidos en el grupo PPD positivos cultivo positivo fueron múltiples e intensas bandas que van de 21,6 a 34 kDa y de 60 a 80 kDa. Algunos sueros presentan anticuerpos contra la proteína de 7 kDa. Los sueros del grupo "contacto" reconocen un similar número de banda pero en forma mucho menos intensa. Además la intensidad de la reacción es mayor con los sobrenadantes de mayor tiempo de cultivo.

Se concluye que los sueros de animales positivos y contactos reconocen un número similar de bandas. Los sueros de contacto reaccionaron más débilmente. Las proteínas más frecuentemente reconocidas fueron las de 80, 70, 65, 50, 34 y varias proteínas pobremente resueltas en la región de 21 a 35 Kda. Menos bandas fueron reconocidas por sueros de animales pertenecientes a campo libre de TBC. Preferentemente reaccionaron bandas de 65 y 70 Kda y otra de 34 Kda. La intensidad de la reacción es mayor con los sobrenadantes de mayor tiempo de cultivo, especialmente a los 143 días.

Diagnostico de Tuberculosis Bovina por la prueba PCR

Presentación: Dr. J. Pereira

Proyecto de Investigación entre el INTA, CICVy A, la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA- Viena, Austria) y la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria (ANAV)

Título: Mejoramiento del diagnóstico de la tuberculosis bovina en bovinos usado PCR (Arg. /5/010)

Periodo: 2000/2001

Objetivos:

- Desarrollar y estandarizar la técnica directa de amplificación del ADN bacteriano por reacción en cadena a través de la enzima polimerasa (PCR)
- Determinar la sensibilidad y especificidad de cada prueba a través de la confirmación de la presencia del micobacterio por cultivo. Analizar epidemiológicamente los resultados
- Realizar en forma conjunta ensayos a nivel de campo de PPD, Elisa y PCR y evaluar la concordancia que pueda haber entre los mismos.

Recientemente se aprobó este proyecto entre la IAEA y el INTA-CICVtA con coparticipación de la ANAV, relacionado con el "Mejoramiento del diagnóstico de la Tuberculosis Bovina usando técnicas biotecnológicas, en este caso PCR a partir de fluidos biológicos (leche e hisopados nasales).

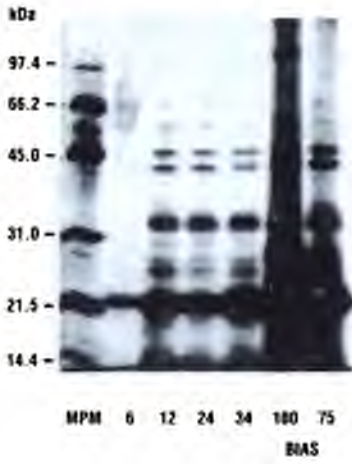
El proyecto lleva el número (Arg. /5/010). El mismo tiene una duración de 2 años (2000/2001) y tiene como lugar de trabajo los Institutos de Patibiotología y Biotecnología del CICVyA-INTA-Castelar. Este proyecto ha surgido como consecuencia del proyecto original entre INTA y la ANAV sobre técnicas de diagnóstico de Tuberculosis, el cual ha servido para recibir el proyecto de una entidad internacional como la AIEA.

Para dar cumplimiento con los objetivos, se elaboró un plan de trabajo que se concretará en dos etapas.

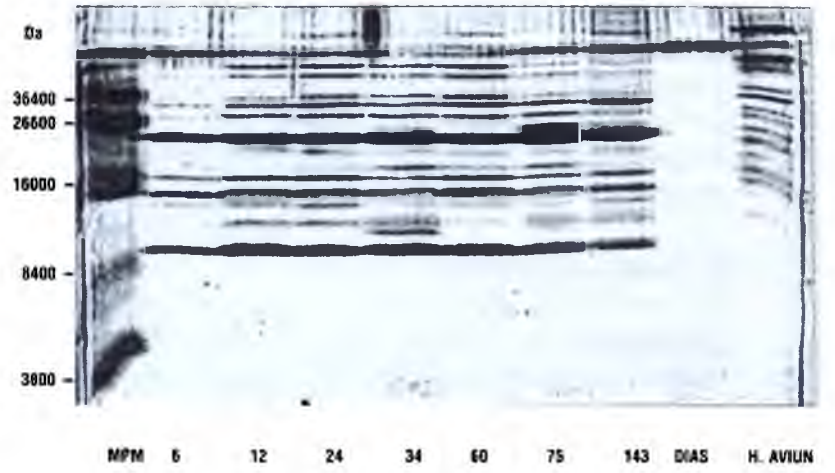
- 1) Será la puesta a punto en laboratorios de la técnica de PCR (especialmente) y
- 2) Será evaluar esta técnica con la PPD (intradermoreacción) y Elisa, utilizadas en el proyecto con la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, a nivel de rodeos y de material obtenido por aspiración ganglionar en animales vivos y muertos en playa de faena de bovinos positivos y negativos.

El resultado esperado es contar con un método rápido de detección de **M. bovis** que sea útil para las campañas de saneamiento por detección de mayor cantidad de animales positivos a TBC.

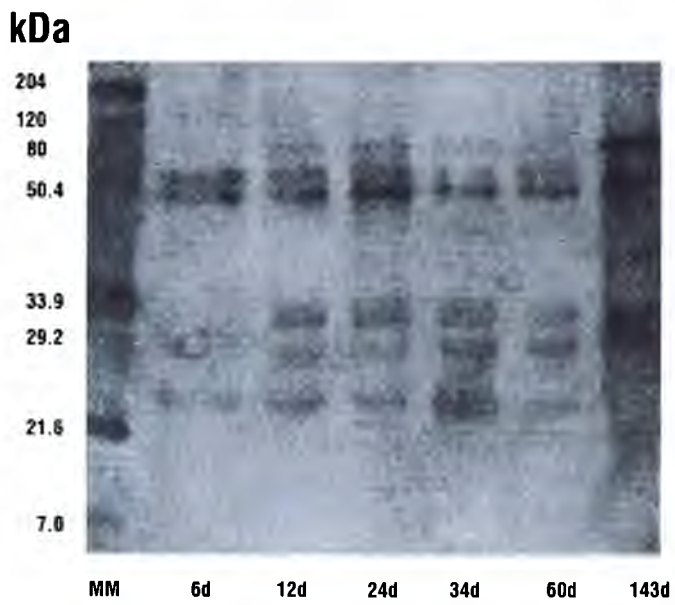
PERFIL DE PROTEINAS DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA AN5 (M. BOVIS)



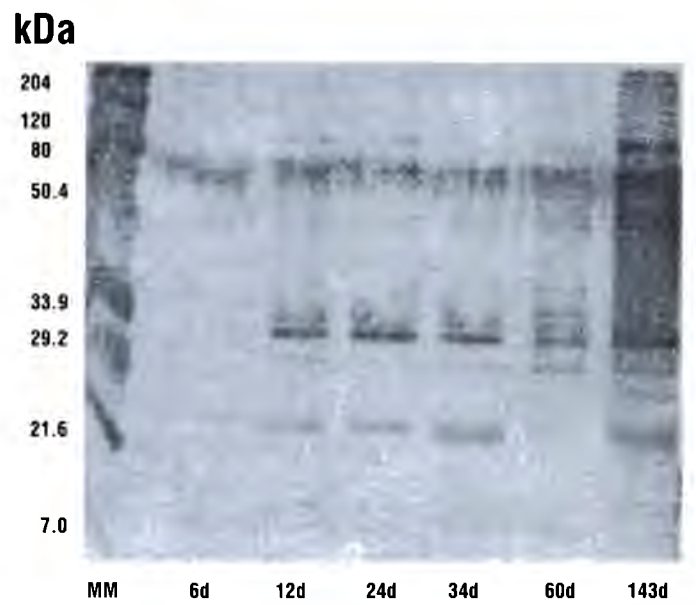
PERFIL DE PROTEINAS DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA AN5 (M. bovis) EN GELES DE TRICINA



GRUPO Ia



GRUPO Ib



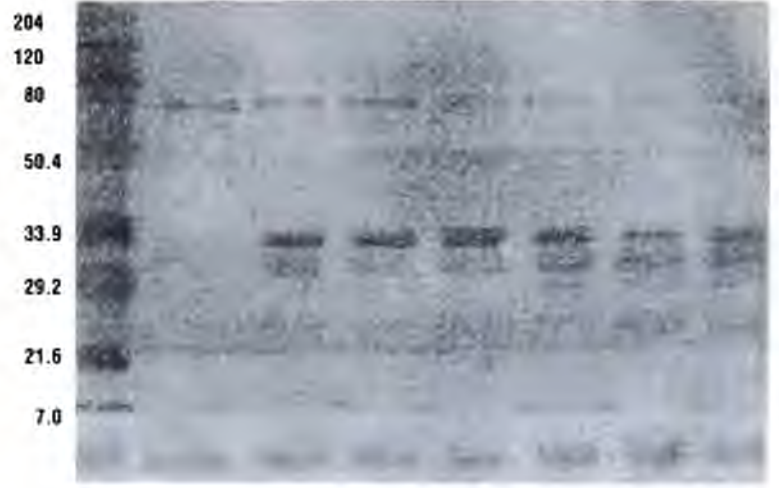
GRUPO IIa



MM 6d 12d 24d 34d 60d 100d 143d

GRUPO IIb

kDa



MM 6d 12d 24d 34d 60d 100d 143d

GRUPO III



C.P.

**RECONOCIMIENTO DE PROTEINAS A TRAVES DE SUEROS DE ANIMALES
PERTENECIENTE A LOS DISTINTOS GRUPOS**

