

METODO DE ADSORCION DE ANTICUERPOS NO ESPECIFICOS Y OBTENCION DE UN ANTIGENO PROTOPLASMICO, PARA EL DIAGNOSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS*.

ROBERTO A. GONZALEZ S.

I. CAROLINA RAMIREZ C.

Se obtuvo un antígeno protoplásmico de **Mycobacterium paratuberculosis** por medio de sonicación. Este antígeno fue titulado para encontrar la concentración óptima necesaria para realizar la prueba de inmunodifusión en gel. El antígeno protoplásmico presenta determinantes antigénicos en común para la mayoría de los organismos actinomicetales, por lo que se trabajó en un tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos, presentes en sueros de animales paratuberculosos. Los resultados obtenidos en la prueba de inmunodifusión en gel, después de aplicar el método de adsorción de anticuerpos no específicos, fueron satisfactorios, debido a que se presentó solamente una banda de precipitación. Esta es la primera vez que en México se obtiene el antígeno protoplásmico de **Mycobacterium paratuberculosis**, con lo que se puede evitar la importación del mismo; además, es la primera vez que en nuestro país se utiliza el método de adsorción de anticuerpos no específicos, con lo cual se aumenta la especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas.

* Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes. Centro de Investigaciones en Medicina Veterinaria, Sector Pecuario, INIFAP-SARH., Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, 05110, D. F. Financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El diagnóstico determinante de la paratuberculosis se realiza por medio del aislamiento del **Mycobacterium paratuberculosis** (**M. paratuberculosis**), a partir de heces de animales infectados (Chiadini, Van Kruiningen & Merkal, 1984; Lyle, 1983; Yokomizo, Yugi & Merkal, 1983). Sin embargo, este sistema presenta limitantes, como son que el **M. paratuberculosis** se excreta intermitentemente (Hoffsis, 1983; Ramírez, González y de Lucas, 1984; Yokomizo, Yugi & Merkal, 1983) además se requiere de tres meses para su desarrollo en medios sintéticos que deben contar con un factor de crecimiento llamado micobactina (Hoffsis, 1983; Praxedis, 1985; Ramírez, González y Palafox, 1985). Es por estas características que se ha dirigido la atención hacia las pruebas serológicas, con las que se adquieren resultados rápidos y precisos (Praxedis, 1985; Ramírez, González y de Lucas, 1984).

Los antígenos protoplásmicos de **M. paratuberculosis**, que se utilizan en las pruebas serológicas, son preparaciones groseras que contienen determinantes antigénicos en común para la mayoría de los organismos actinomicetales (Chiadini, Van Kruiningen & Merkal, 1984); por este motivo la prueba de inmunodifusión en gel (IDG), presenta con frecuencia varias bandas de precipitación, estas

confirman la presencia de diversos tipos de anticuerpos que reaccionan al antígeno de **M. paratuberculosis** (Bellanti, 1972).

La técnica de IDG ofrece resultados en 24 horas (Ramírez, González y de Lucas, 1984); la limitante de esta prueba, es la obtención frecuente de resultados falso-positivos. Algunos de estos resultados se deben a que los animales estuvieron expuestos al **M. paratuberculosis**, desarrollaron una respuesta inmunológica y se recuperaron (Chiodini, Van Kruiningen & Merkal, 1984); otros, son debidos a la presencia de anticuerpos producidos contra bacterias como **Nocardia** spp. y **Corinebacterium** spp. entre otras (Chiodini, Van Kruiningen & Merkal, 1984; Lyle, 1983).

En 1983 Yokomizo, Yugi y Merkal, llevaron a cabo una investigación en la que eliminaron del suero de animales paratuberculosos, anticuerpos que provocaban reacciones cruzadas al utilizar el antígeno protoplásmico del **M. paratuberculosis**; este resultado se logró al usar al **M. phlei** como agente de captación de anticuerpos no específicos, con lo que se eliminaron una gran cantidad de reacciones falso-positivas en la prueba de ELISA. En ese mismo año, Lyle, con el uso de la misma técnica de Yokomizo y col., obtuvo resultados satisfactorios en las pruebas de IDG, inmunoelectroforesis y ELISA.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: a) Obtener un antígeno protoplásmico a partir de la cepa 18 de **M. paratuberculosis**, que sería utilizado para las pruebas de diagnóstico serológico, y b) Recurrir al **M. phlei** para adsorber los anticuerpos no específicos que provocan reacciones cruzadas en la prueba de IDG.

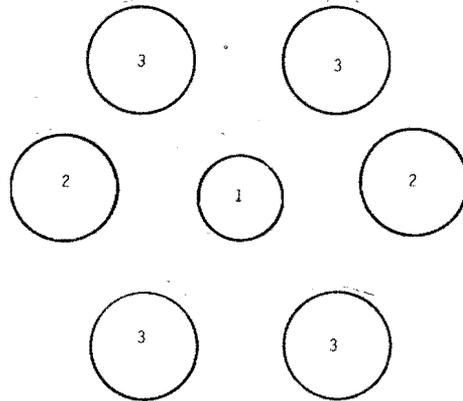
Antígeno protoplásmico. Este antígeno se obtuvo al seguir las técnicas descritas por Lyle en 1983, y por Lyle y Merkal, 1983: Se cultivó la cepa 18

de **M. paratuberculosis** en medio líquido de Dorset y Henley. Después de cosechar el paquete celular, se sonicó durante 60 minutos (sonicador MSE, 20 micrones de amplitud) y se centrifugó a 38000 rpm a 4°C durante dos horas. El sobrenadante se dializó con agua corriente por 12 horas y fue liofilizado.

Titulación del antígeno protoplásmico. Se prepararon las siguientes concentraciones de antígeno: 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/ml. Se utilizó la técnica de IDG descrita por Lyle (1983); las diluciones del antígeno se colocaron como se muestra en la Figura 1, se utilizaron dos sueros control adsorbidos en E.U.A. y otro tratado en México.

FIGURA 1.

TITULACION DEL ANTIGENO PROTOPLASMICO DE
M. paratuberculosis CEPA 18,
PARA LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL.



PLACA DE INMUNODIFUSION EN GEL.

1. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ANTIGENO.
2. SUEROS CONTROL POSITIVOS ADSORBIDOS EN E.U.A.
3. SUEROS CONTROL POSITIVOS ADSORBIDOS EN MEXICO.

Preparación del *M. phlei*. Se cultivó el *M. phlei* en medio líquido de Dorset y Henley. Se cosechó el paquete celular, se hicieron alícuotas de 50 ml que fueron sometidas al autoclave para inactivarlo, a 15 libras de presión durante 15 minutos, y se liofilizaron.

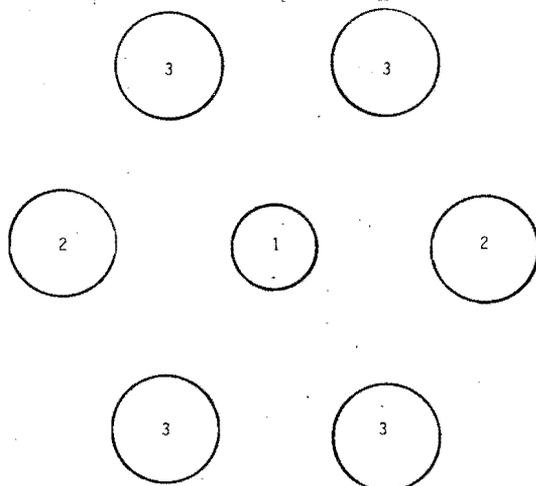
Sueros control. Se trabajó con dos sueros de animales infectados artificialmente con *M. paratuberculosis*, donados y adsorbidos anteriormente por el Dr. R.S. Merkal; con 11 sueros positivos a paratuberculosis determinados anteriormente en México por IDG, de los cuales siete fueron positivos al cultivo de heces, del Banco de Sueros del proyecto "Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes" del CIMEVET, Sector Pecuario INIFAP-SARH, y con dos sueros negativos a paratuberculosis del mismo banco de sueros.

Adsorción de anticuerpos no específicos. Los sueros positivos del CIMEVET se dividieron en dos partes, una de ellas recibió el tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos, el cual consistió en lo siguiente: a 50 microlitros de suero, se le agregó 5.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos que contenía 0.1% de gelatina y 0.05% de tween 80, además de 5.0 mg/ml de *M. phlei* liofilizado. Se colocó en agitación constante durante 60 minutos y se centrifugó a 100 rpm durante 15 minutos. Los sueros se trabajaron de acuerdo a la técnica de IDG (Figura 2) (Lyle, 1983).

Titulación del antígeno protoplásmico. Se observó que tanto en la concentración de 50 mg/ml como en la de 25 mg/ml de antígeno protoplásmico, las líneas de precipitación se presentaron muy gruesas y con

FIGURA 2.

DISPOSICION DE LOS SUEROS CONTROL PARA LA OBTENCION DE LINEAS DE IDENTIDAD EN EL DIAGNOSTICO DE PARATUBERCULOSIS.



PLACA DE INMUNODIFUSION EN GEL.

1. ANTIGENO PROTOPLASMICO.
2. SUEROS CONTROL ADSORBIDOS.
3. EN ESTAS POSICIONES SE COLOCAN LOS SUEROS SOSPECHOSOS.

tendencia hacia los pozos de los sueros control. En la concentración de 12.5 mg/ml, las líneas se mostraron claras, definidas y entre los pozos de los sueros y del antígeno. Las concentraciones de 6.25 y 3.125 mg/ml no mostraron bandas de precipitación definidas. Las líneas de precipitación de los sueros control de E.U.A. y las de los sueros tratados en México formaron una banda continua de identidad.

Adsorción de anticuerpos no específicos. En la porción de los sueros que fueron sometidos al tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos, ocho formaron una banda de precipitación continua con la presentada por los sueros control de E.U.A.; los tres restantes no mostraron bandas. Las porciones sin tratamiento, formaron dos o tres bandas de precipitación. Ocho de estas mostraron una línea continua con la formada por los sueros de E.U.A. Los sueros negativos no formaron bandas de precipitación.

En este trabajo se obtuvo antígeno protoplásmico a partir de la cepa 18 de **M. paratuberculosis**.

La región de porciones óptimas o punto de equivalencia para las pruebas de IDG se presenta cuando las concentraciones de antígeno y anticuerpos son equilibradas; esto se advierte cuando las bandas de precipitación se muestran claras y definidas, lo que manifiesta una precipitación máxima (Bellanti, 1972). Para este lote se descubrió que la concentración adecuada para pruebas de IDG fue de 12.5 mg/ml de antígeno. Cada lote de antígeno protoplásmico que se produzca debe ser titulado para encontrar cual es la concentración adecuada a utilizar, la que está en relación directa a la cantidad de bacterias adquiridas en cada cultivo y al proceso de obtención del antígeno (Merkal, 1984)*.

* Merkal, R.S., 1984., comunicación personal.

Yokomizo, Yugi y Merkal (1983), demostraron que con el tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos se reducían los resultados falso-positivos provocados por infecciones producidas por bacterias como **Nocardia** spp. y **Corynebacterium** spp. principalmente. Este método no afecta los niveles de anticuerpos producidos contra el **M. paratuberculosis** e incrementa la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas.

En este trabajo, los sueros que recibieron el tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos presentaron una banda de precipitación continua con la de los sueros control de E.U.A. Esta continuidad es debida a que los anticuerpos son del mismo peso molecular y a que su difusión por el agar se lleva a cabo a la misma velocidad; por lo tanto, la reacción antígeno-anticuerpo se manifiesta en la misma zona (Bellanti, 1972). Tres de estos sueros no presentaron bandas de precipitación. Anteriormente, estos sueros fueron considerados como positivos mediante la prueba de IDG; sin embargo, existen causas que confirman lo contrario: 1) El suero control que se utilizó no era adsorbido y por lo tanto, las reacciones que se presentaron no fueron necesariamente provocadas por anticuerpos específicos a paratuberculosis, y 2) Fueron tomados como positivos porque, en la prueba de IDG, presentaron líneas de precipitación semejantes a las del suero control. De acuerdo con las razones antes mencionadas, estos sueros no tienen anticuerpos contra el **M. paratuberculosis**, pero poseen anticuerpos que reconocen al antígeno protoplásmico, los cuales dieron lugar a reacciones falso-positivas. Esto se confirmó porque estos sueros no formaron líneas continuas en la porción que no recibió tratamiento.

Los sueros sin tratamiento formaron dos o tres líneas de precipitación

y una de ellas mostró continuidad con las líneas formadas por los sueros control. Esto se presentó en ocho de las porciones, las tres restantes presentaron dos líneas de precipitación, pero no existió continuidad con las formadas por el suero control de E.U.A. Esto es debido a que el antígeno protoplásmico admitió diversos anticuerpos que reconocieron sus determinantes antigénicos (Chiadini, Van Kruiningen & Merkal, 1984; Lyle, 1983; Yokomizo, Yugi & Merkal, 1983) por los diferentes pesos moleculares de los anticuerpos y por las diferentes velocidades de difusión que tienen en el agar (Bellanti, 1972). Los resultados anteriores confirman que después de usar el tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos, se eliminan reacciones que dan lugar a resultados falso-positivos (Lyle, 1983; Yokomizo, Yugi & Merkal, 1983). Los sueros control negativos no formaron líneas de precipitación.

El colocar los sueros control en las posiciones que se sugieren en las Figuras 1 y 2 tienen como objetivos que los sueros sospechosos formen líneas de identidad respecto a ellos. Así, si un suero no presenta líneas o éstos presentan líneas que no muestran identidad con las formadas por los sueros control, el suero no contiene anticuerpos contra el **M. paratuberculosis**.

Los principales problemas que se han presentado en las pruebas serológicas para el diagnóstico de paratuberculosis, son la gran cantidad y frecuencia con que se adquieren resultados falso-positivos (Chiadini, Van Kruiningen & Merkal, 1984; Lyle, 1983). Anteriormente en la prueba de IDG, aunque se obtenían resultados en 24 horas no era del todo satisfactoria (Lyle, 1983; Ramírez, González y de Lucas, 1984). Esto se observó porque se usaba un suero control sin adsorber, el cual mostraba dos o tres

líneas de precipitación, las que se tomaban como características para el diagnóstico de paratuberculosis. Además, no importaba que los sueros sospechosos no formaran líneas de identidad, lo que predisponía a la obtención de resultados falso-positivos; esto estaba influenciado porque el suero control se colocaba en un pozo solamente (Praxedis, 1985).

La técnica de IDG se ha perfeccionado, ya que después de someter a los sueros control al tratamiento de adsorción de anticuerpos no específicos, se adquieren líneas de precipitación específicas; además, al colocar los sueros control adsorbidos en las posiciones que se sugieren (Figuras 1 y 2), se ha logrado que esta prueba sea más específica y sensible (Lyle, 1983).

SUMMARY

A protoplasmic antigen was obtained from **Mycobacterium paratuberculosis** by sonication. This antigen was made to find the optimum concentration necessary to work the agar gel immunodiffusion test (AGID). This protoplasmic antigen presents certain antigens common to the majority of Actinomycetal organisms, therefore a non specific antibody treatment of absorption was worked to be used in serum of paratuberculous animals. The results obtained in AGAID after working with the method of non specific antibody absorption were satisfactory, because only one precipitation band was shown.

This is the first time that protoplasmic antigen of **M. paratuberculosis** is obtained in Mexico, marking importation unnecessary; besides, it's the first time that our country uses the method of non specific antibody absorption for this disease, incrementing the sensibility and specificity of serologic techniques.

LITERATURA CITADA

BELLANTI, J.A., 1972. Inmunología., 1a. Edición, Editorial Interamericana., México, p. 129.

CHIODINI, R.J., VAN KRUIJNINGEN, H.J. and MERKAL, R.S., 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects., *The Cornell Vet.*, Vol. 74: No. 2.

HOFFSIS, G.F., 1983. The current status of clinical diagnosis of Johne's disease., *Pro. Int. Coll. Res. Ptb.*, Jun 16-18, Ames, Iowa., p.2.

LYLE, P.A.S., 1983. Comparison of serological and cultural detection of mycobacterial infections in bovine, caprine, ovine and porcine species., Thesis for the degree of Master of Science., *Iowa State University.*, Ames, Iowa, U.S.A.

LYLE, P.A.S. and MERKAL, R.S., 1983. Comparison of ELISA and Gel diffusion precipitin test for paratuberculosis in cattle, sheeps and

goats., *Pro. Int. Coll. Res. Ptb.*, Jun. 16-18, Ames, Iowa., p. 109.

PRAXEDIS, M.J., 1985. Determinación de la prevalencia de paratuberculosis en caprinos y ovinos sacrificados en cuatro rastros periféricos al D. F., *Tesis de la FMVZ.*, UNAM, México.

RAMIREZ, C.C., GONZALEZ, S.R. y de LUCAS, T.J., 1984. Evaluación de tres métodos de diagnóstico para la detección de paratuberculosis en cabras., *Tec. Pec. Méx.*, 47:128.

RAMIREZ, C.C., GONZALEZ, S.R. y PALAFOX A. I., 1985., Paratuberculosis en un rancho de ganado de lidia., *Vet. Méx.* 16:109.

YOKOMIZO, Y., YUGI, H. and MERKAL, R.S., 1983. A method for avoiding false-positive reactions in Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis., *Pro. Int. Coll. Res. Ptb.*, Jun. 16-18, Ames, Iowa, p. 94.