

TOMO LIX

**ACADEMIA NACIONAL
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

Acto de entrega del Premio Fundación Pérez Companc Versión 2005



Sesión Pública Extraordinaria
del
6 de Diciembre de 2005

Artículo N° 17 del Estatuto de la Academia

«La Academia no se solidariza con las ideas vertidas por sus miembros en los actos que ésta realice salvo pronunciamiento expreso al respecto que cuente con el voto unánime de los académicos presentes en la sesión respectiva.»

Apertura del acto por el Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Dr. Carlos O. Scoppa

**Sres. Académicos,
Sr. Representante de la Fundación Pérez Companc,
Autoridades Nacionales y Universitarias,
Sres. recipiendarios del Premio Pérez Companc, versión 2005,
Sres. familiares y amigos de los recipiendarios,
Señoras y Señores:**

Esta Sesión Publica Extraordinaria de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria que se efectúa conjuntamente con la Fundación Pérez Companc para hacer entrega de la tercera versión del Premio de este nombre y que otorga esa entidad de bien publico y discierne nuestra Corporación constituye, como siempre, una ceremonia destacada, uno de los acontecimientos más gratos y significativos de la vida académica. Venimos a reconocer públicamente los frutos de la inteligencia, del trabajo abnegado, del afán de progreso y del querer saber más. A brindar el justo reconocimiento de pares ante los aportes de la mente y de la faena sin claudicaciones.

En un mundo en el que la ética languidece, la moral vacila y el humanismo se debilita e inmersos en una sociedad que desde hace décadas transita por el facilismo, la falta de compromiso y la anomia, fiestas como estas revisten especial significado para la Republica. Son eslabones de excelencia que tejen la cadena del progreso engrandecida por la acción virtual de los principios. Verdaderos atavíos de abolengo ilustre de y para la cultura. No sólo por la galanura que la frase conlleva y la elevación de las ideas, sino también por la serenidad doctrinaria, por la impersonalidad de la argumentación y por el aliento que respiran.

Hoy premiamos a tres mujeres y a tres hombres jóvenes integrantes de un equipo de investigación, por su trabajo "Caracterización de antígenos de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avis*, subespecie paratuberculosis. Su utilización en el diagnóstico" que fuera presentado al concurso que en esta edición versaba sobre "Desarrollo de Nuevas Técnicas Biotecnológicas para el Diagnóstico y Prevención de Enfermedades Bacterianas de Rumiantes", obra que fue seleccionada por el Jurado Académico y cuyo dictamen fuera aprobado unánimemente por el Cuerpo. Será el Presidente de ese tribunal, el Académico, Dr. Bernardo J. Carrillo quien nos expresará, con detalle, las consideraciones y meritos que aconsejaran su otorgamiento.

Sin embargo, digamos una vez más que ellos no buscaron ni buscan las distinciones, los lauros, los reconocimientos. Los investigadores no producen, ni gestan para la presea. Los premios no se rastrean, se obtienen.

Axial, sólo me resta felicitar a los premiados por la gratificación que tan justamente reciben, pero también por el ejemplo que brindan a las generaciones venideras, las cuales podrán así levantarse al impulso de ideales más grandes

fortaleciendo y dando calor a sus espíritus en las tradiciones académicas; en los que creen en la cultura. Para que se apresuren a tomar la iniciativa en los festejos con que celebramos los grandes fastos, y afiancen su fuerza futura con los impulsos de sus almas generosas.

Nada más, muchas gracias.

Presentación por el Presidente del Jurado Dr. Bernardo J. Carrillo

**Sr. Presidente,
Sr. Representante de la Fundación Pérez Companc,
Sres. Académicos,
Sres. Investigadores y colegas,
Señoras y Señores:**

La Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria tiene el agrado en este acto de materializar la adjudicación del Premio Fundación Pérez Companc en su versión 2005, correspondiente a temas en Ciencias Veterinarias. Agradecemos a la Fundación Pérez Companc por este aporte y por el estímulo que significa para jóvenes investigadores ver premiada su labor. Este reconocimiento, contribuye a fomentar el desarrollo de la investigación agropecuaria en beneficio de la producción nacional, de la salud animal y de la salud pública a través de este acuerdo con nuestra Corporación.

En representación del Jurado que estuvo integrado por los Académicos Dres. Eduardo Palma, Eduardo Gimeno, Ing. Agr. Rodolfo Sánchez y el que habla y el Dr. Mariano Medina por la Fundación Pérez Companc, corresponde mencionar que el Premio Fundación Pérez Companc en su versión 2005 sobre el tema: «Desarrollo de nuevas técnicas Biotecnológicas para el diagnóstico y prevención de enfermedades bacterianas de rumiantes» ha sido otorgado al trabajo titulado «Caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis bovis y Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis, su utilización en el diagnóstico» cuyos autores que figuraban con el seudónimo «Para TBtools» son los Dres. María Isabel Romano y Angel Cataldi, Bióloga Andrea Gioffre, Biotecnólogo Ignacio Etchechoury, Microbióloga Gabriela Echeverría y el Med. Vet. Dr. Fernando Paolicchi.

La Dra. María Isabel Romano es Bioquímica graduada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires en 1986 con Posdoctorados en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Pasteur de París en 1987 y en el Laboratorio de Mycobacterial Research del National Institute for Medical Research, Londres en 2000-2002. Fue Investigadora asistente, Investigadora adjunta y actualmente Investigadora independiente del CONICET, con sede en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA en Castelar, en el tema Tuberculosis y Paratuberculosis Bovina. Ha actuado y actúa como Directora de Becarios y de formación de investigadores en temas de su especialidad. Ha dirigido y dirige Proyectos de Investigación subsidiados por instituciones nacionales y extranjeras. Es miembro fundador de la Red Latinoamericana y del Comité de Tuberculosis (REACTB). Ha publicado 80 trabajos en revistas científicas con referato y ha recibido un Premio de la Sociedad Argentina de Dermatología sobre el tema «Lepra salvaje en Armadillos del Nordeste Argentino» y un Primer premio de la Asociación Argentina de Laboratorios de Diagnóstico en 2004.

El Dr. Angel Cataldi es Dr. en Química de la Universidad de Buenos Aires. Realizó tesis de doctorado en la Fundación Campomar. Luego hizo un Posdoctorado en el Instituto Pasteur de París sobre Factores de Virulencia del Bacillus anthracis. Actualmente dirige el grupo de Tuberculosis en el Instituto de Biotecnología del CIVyA en INTA Castelar. Es coordinador del área de bacterias patógenas del Instituto de Biotecnología y es Secretario de Redacción de la Revista Argentina de Microbiología.

La Bióloga Andrea Gioffre, ha realizado su tesis doctoral bajo la dirección del Dr. Angel Cataldi. Fue iniciadora de los trabajos en E. coli enterohemorrágica en el Instituto de Biotecnología, realizando su tesis de licenciatura en este tema. Realizó una pasantía en el Instituto Pasteur de París y actualmente trabaja en Paratuberculosis o enfermedad de Johne.

El Biotecnólogo Diego Ignacio Etchechoury es Licenciado en Biotecnología, graduado en 2002 en la Universidad Nacional de Buenos Aires. Trabaja en el tema de caracterización de antígenos de Mycobacterium tuberculosis bovis y Mycobacterium paratuberculosis con una Beca de Posgrado del CONICET y está integrado a un Proyecto PICT de Ciencia y Técnica sobre desarrollo de Técnicas de Diagnóstico de Tuberculosis bovina. Es coautor de tres trabajos sobre este tema y ha recibido un premio al mejor trabajo científico «Dr. Joaquín González Tomé» sobre el tema de mycobacterias zoonóticas, en la XV Reunión de la Asociación Argentina de Vet. Lab. Diag. en el año 2004.

La Microbióloga Gabriela Fernanda Echeverría Valencia recibió su Licenciatura en Microbiología Clínica y Aplicada en la Pontificia Universidad Católica de Ecuador en Quito, Ecuador, en el año 2004. Actualmente está cursando la Maestría en Biotecnología en la Universidad de Buenos Aires. Ha realizado diversas pasantías y cursos de formación en su especialidad y obtuvo becas de la Universidad de Pontificia y de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica de la Secretaría de Ciencia y Técnica (Proyecto PICT 12589) sobre el tema de Tuberculosis bovina.

El Dr. Fernando Alberto Paolicchi es Médico Veterinario graduado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires en 1984 y es Magíster en Ciencias Biológicas de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Medicinal, de la Universidad de Chile en 1995.

Es miembro permanente del Grupo de Investigación en Sanidad Animal en el Departamento de Producción Animal de la Est. Exp. del INTA en Balcarce - Unidad Integrada INTA UNMdP OCA N° 185/00.

Ha sido seleccionado como Becario de Investigación en el exterior en tres oportunidades, en 1985 - INTA, Madrid, España; en 1992, Universidad de Chile, Santiago, Chile y en 1999 para estudios sobre «Biología Molecular de Micobacterias» en la Universidad de Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA.

Ha cumplido y cumple múltiples actividades como docente tanto en la formación de grado como posgrado, en los ámbitos de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, como en la Universidad Nacional de Mar del Plata, Unidad Integrada INTA - UNMdP en INTA Balcarce.

Ha participado en el dictado de más de 45 cursos para profesionales, cursos de posgrado, seminarios y reuniones científicas diversas.

Ha participado y participa como director, codirector y participante en más de veinte proyectos institucionales (INTA) y extrainstitucionales en temas de Brucelosis, Tuberculosis y Paratuberculosis bovina.

Ha publicado más de 56 trabajos científicos, 28 en revistas con referato. Tiene más de 18 trabajos de divulgación y más de 120 presentaciones en congresos y es coautor de capítulos en 2 libros.

Actualmente el Dr. Paolicchi es Presidente de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico (AAVDL).

El Jurado, al proponer para este galardón a los citados investigadores, consideró que los objetivos, la metodología y los resultados obtenidos en ese estudio eran de muy buen nivel y estaban en total acuerdo con la convocatoria del premio versión 2005 o sea el desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas para el diagnóstico de enfermedades bacterianas de rumiantes.

El trabajo seleccionado se destaca por su originalidad, buen diseño científico y tecnológico y por tratarse de un tema de relevancia para la salud humana y animal.

Además, los resultados obtenidos demuestran que estas técnicas en la práctica resultan complementarias de los métodos convencionales de diagnóstico, mejorando la especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de Paratuberculosis y Tuberculosis bovina utilizando macroarreglos de proteínas.

Pero dejemos ahora a la Dra. María Isabel Romano que nos hablará en representación del grupo de investigadores, para que nos resuma la significancia del trabajo realizado.

Nuestras felicitaciones a los investigadores responsables.

Muchas gracias.

Disertación de la Dra. María I. Romano en representación de los autores del trabajo.*

Desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas para el diagnóstico y prevención de enfermedades bacterianas de rumiantes.

**Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria,
Sr. Representante de la Fundación «Pérez Companc»,
Sres. Miembros del Jurado,
Colegas y amigos,
Señoras y señores:**

Ante todo saludo y agradezco en nombre propio y de mis compañeros de trabajo, la presencia del amable auditorio y a la Fundación Pérez Companc y a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria la concesión de este importante premio que seguramente estimulará nuestras tareas

INTRODUCCION

Situación actual de la tuberculosis bovina en la Argentina.

La Tuberculosis bovina es una zoonosis producida por el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). A pesar de que el huésped primario es el bovino, otras especies de interés económico, como cerdos, son infectados con *M. bovis*. Esta micobacteria junto con *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. microti* pertenecen a un grupo relacionado llamado *M. tuberculosis* complex.

La tuberculosis bovina es considerada una de las zoonosis más importantes. Se ha estimado que aproximadamente 7000 nuevos casos de tuberculosis humana por año son causados por infección con *M. bovis* (1). El bacilo infecta especialmente a aquellos que están en contacto con animales infectados (trabajadores de frigoríficos, tamberos, veterinarios etc.). Este bacilo causa en el ganado una enfermedad similar a la tuberculosis humana conduciendo a una baja producción de leche y carne. Las pérdidas en la producción de carne se deben a decomisos de órganos y carcasas afectadas por lesiones sospechosas de tuberculosis. En la Argentina se produce por lesiones tuberculosas un 5% de decomisos anuales sobre la media de 10.703.064 bovinos faenados anualmente, según estadísticas de los años 1975 a 1981. Esta evaluación fue hecha por los decomisos realizados en los 158 establecimientos de sacrificio con inspección veterinaria nacional (2). La incidencia del decomiso de carnes

Autores: Gabriela Echeverría¹, Diego I. Etchechoury¹, Andrea Gioffre¹, Fernando Paolicchi², Angel Cataldi¹, María Isabel Romano¹.

Lugar de trabajo: ¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar. ²Sanidad Animal EEA-Balcarce. INTA Balcarce.

produce una pérdida directa anual de 9 millones de dólares (2). Esta información es sesgada y además no aporta datos exactos de la prevalencia de la tuberculosis bovina en la Argentina, porque los bovinos sacrificados son en su mayoría animales jóvenes que pueden aún no presentar lesiones tuberculosas y además no representan la población bovina total del país. La población bovina restante, representada por los bovinos lecheros, es la que tiene mayor incidencia de tuberculosis. Así mismo hay que tener en cuenta que falta estimar el número y estado sanitario de los animales sacrificados sin inspección veterinaria oficial. Una encuesta tuberculínica realizada en nuestro país en 1972 arrojó una prevalencia media de esta enfermedad por animal del 4,3%, con un porcentaje de rodeos infectados del 38% (3). Las últimas encuestas tuberculínicas realizadas en algunas regiones del país indican que la prevalencia de la enfermedad bajo a 1.5%, pero no existe una encuesta realizada a nivel nacional actualizada.

Diagnóstico de la Tuberculosis bovina

La técnica diagnóstica por excelencia que se ha utilizado en nuestro país para controlar esta enfermedad, es la prueba de la tuberculina. Esta prueba detecta fenómenos de inmunidad celular, basándose en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, que da lugar a una reacción inflamatoria con importante infiltración celular en la dermis. Esta reacción tiene lugar localmente después de la inyección intradérmica de la tuberculina y se considera como reactor positivo al animal que presente más de 5mm de incremento en el grosor de la piel a las 72 horas de realizada la tuberculinización. La tuberculina PPD es sin duda alguna el antígeno micobacteriano más importante. La PPD o "derivado proteico purificado" es una preparación que consiste en proteínas liberadas al medio de un cultivo en fase estacionaria. Uno de los inconvenientes del uso de la PPD en el diagnóstico es la aparición de reactores falsos positivos, debido a que muchos de los antígenos micobacterianos son altamente conservados, no solo dentro del género *Mycobacterium* sino también en un amplio rango de otras especies bacterianas. A los falsos negativos se los ha descrito asociados principalmente a: 1) desensibilización post-tuberculinización, se ha comprobado que este estado se produce hasta los 56 días de la inyección de tuberculina; 2) anergia en estados de enfermedad severos o generalizados. Las investigaciones en el campo del diagnóstico se están focalizando hacia el mejoramiento de los métodos de diagnóstico a través del estudio de nuevos antígenos "candidatos" que reemplacen con éxito a la PPD y que puedan ser usados en ensayos inmunológicos. Otra prueba que mide inmunidad celular y se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis, es la prueba que mide la liberación de gamma interferon (4). Esta prueba se comercializa en forma monopólica y resulta muy cara para los productores en nuestro país.

Una relación inversa fue descrita en tuberculosis entre respuesta celular y humoral; esta última se detecta en los casos avanzados de la enfermedad (5). A pesar de esto la medición de anticuerpos anti *M. bovis* es interesante por varias razones: 1) la detección de estos anticuerpos puede identificar animales anérgicos a la tuberculina, en estados avanzados de la enfermedad y de

esta forma complementar el diagnóstico de la tuberculina; 2) un test que detecte anticuerpos puede establecer el estado de un establecimiento caracterizado por resultados dudosos cuando se aplica la tuberculina; 3) animales con PPD positiva y con serología positiva a varios antígenos, indicaría que son positivos, aún en ausencia de aislamiento; 4) es un análisis rápido, en la que se puede utilizar el suero obtenido para otros tests (brucelosis, fiebre aftosa etc.) y de esta forma establecer el estado sanitario de una región o establecimiento; 5) se pueden usar soportes sólidos a los que se adicionan antígenos de *M. bovis* y otros antígenos, de otros patógenos, para la detección simultánea de varias enfermedades .

La selección de un antígeno y su aplicación en pruebas serológicas, tal como el ELISA, para el diagnóstico de tuberculosis, no ha resultado un ensayo de considerable especificidad y sensibilidad (6). Pero pruebas basadas en la detección de varios antígenos simultáneamente pueden mejorar estos parámetros, ya que la combinación de varios antígenos puede cubrir las variaciones en la respuesta a antígenos de los animales con tuberculosis. De esta forma, el diagnóstico de la enfermedad con tuberculina puede ser complementado con otro método de diagnóstico. Esto puede ser de gran utilidad, sobre todo en etapas avanzadas de la campaña, para monitorear el estado serológico de los establecimientos y regiones consideradas libres de la enfermedad.

Situación actual de la Paratuberculosis bovina en la Argentina.

La Paratuberculosis o enfermedad de Johne es una enfermedad infecciosa caracterizada por una enteritis crónica que resulta en un deterioro progresivo que conduce eventualmente a la muerte del animal enfermo. Afecta principalmente al ganado bovino, ovino y caprino, siendo también susceptibles otros ruminantes tales como camélidos, ciervos y búfalos. La paratuberculosis es producida por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*). Se sospecha que este bacilo juega un rol en la enfermedad de Crohn en el hombre (7). En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran algunas evidencias sobre el rol de *M. paratuberculosis* en la enfermedad de Crohn. Esta enfermedad produce una ileocolitis granulomatosa crónica que afecta a adultos y jóvenes, caracterizada por diarrea, fiebre y dolor abdominal intermitente. *M. paratuberculosis* podría transmitirse al hombre por ingestión de leche cruda, así como por ingestión de leche pasteurizada, debido a que ha sido demostrada la resistencia térmica de esta micobacteria a la pasteurización.

En la Argentina los datos recogidos a nivel regional por el sistema de diagnóstico del EEA-INTA Balcarce, mostraron seroprevalencias de esta enfermedad que varían entre 2.5 y 51.5 %, según la región del país analizada. Con alta prevalencia en las regiones de las cuencas lecheras, donde los porcentajes de establecimientos afectados, por partido, varían entre 14.4% y 43.7% (8). Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas a los productores y a la industria (láctea y cárnica), y desvalorización de los productos y subproductos de origen animal en los mercados internacionales. La paratuberculosis es una enfermedad conocida por los productores, pero en algunas regiones de nuestro país y países vecinos, no se conoce aún la situación epidemiológica de esta enfermedad.

Con los datos de seroprevalencia según estudios realizados en la EEA-INTA Balcarce, se realizó una estimación preliminar de las pérdidas económicas de la paratuberculosis, en lo referente al valor bruto de la producción, reflejando pérdidas que afectan tanto a productores ganaderos como a los sectores involucrados en la comercialización y flete, lo que arrojó una pérdida de 22 millones de dólares para la zona de cría de la Cuenca del Salado y de 6.3 millones de dólares para la Cuenca Lechera de la provincia de Buenos Aires. En este análisis no se consideraron pérdidas adicionales por pérdidas en las exportaciones.

Diagnóstico de la Paratuberculosis bovina

El diagnóstico de certeza de Paratuberculosis es el aislamiento del *M. paratuberculosis*. Pero este es un microorganismo con dificultades para su crecimiento, entre otras causas debido a que es dependiente del agregado al medio de cultivo de un sideróforo, la micobactina. En medios enriquecidos con micobactina el crecimiento es lento, requiriendo el aislamiento primario entre 2 y 4 meses y el sub-cultivo entre 3 y 6 semanas (10). La morfología de las colonias de *M. paratuberculosis* es muy similar a la de otras micobacterias de crecimiento lento, tales como *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. Las técnicas bioquímicas que se utilizan para identificar a la mayoría de las micobacterias, no pueden ser aplicadas a *M. paratuberculosis*. La falta de características particulares y específicas que permitan diferenciar las especies de micobacterias de crecimiento lento, confunde muchas veces la correcta clasificación de las mismas. El aislamiento de *M. paratuberculosis* se realiza principalmente a partir de muestras de materia fecal o leche. El cultivo a partir de esta última muestra resulta particularmente difícil por el número bajo de organismos que elimina por leche el animal enfermo, los cuales son en gran parte destruidos con los métodos de decontaminación aplicados a las muestras, previos al cultivo (11). Los métodos inmunológicos que se utilizan para el diagnóstico de esta enfermedad son las pruebas de: ELISA, inmunodifusión en gel de agar (IDA) y el test que mide la liberación de gamma interferón.

Debido al incremento en los casos clínicos de Paratuberculosis que se observan en nuestro país y la alta seroprevalencia observada y a la posible naturaleza zoonótica de esta enfermedad, es necesario implementar un programa de control. Para esto es necesario evaluar diferentes técnicas para diagnóstico de paratuberculosis. Con el objeto de mejorar los métodos inmunológicos de diagnóstico se construyó en nuestro laboratorio una biblioteca de expresión de *M. paratuberculosis*, a partir de la cual se han identificados y caracterizado varios antígenos del bacilo. Estos antígenos son los que utilizamos en los macroarreglos de proteínas para diagnóstico de paratuberculosis.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Caracterizar antígenos de *M. bovis* y *M. paratuberculosis* para diseñar un macroarreglo de proteínas, que será utilizado para analizar rodeos infectados con estas micobacterias.

METODOLOGÍA

1- Construcción y análisis inmunológico de *una biblioteca de expresión de M. bovis y M. avium subsp. Paratuberculosis*.

Se describieron fracciones de extracto celular y sobrenadante de cultivo de *M. bovis*, que son reconocidas por animales con tuberculosis (12). Luego de ese primer análisis, para profundizar el reconocimiento, identificando exactamente los antígenos implicados, se construyeron bibliotecas de expresión (13, 14, 15). Brevemente, ADN de *M. bovis* y de *M. avium subsp. paratuberculosis* fueron utilizadas para construir una biblioteca de expresión en lambda ZAPII (Stratagene, La Jolla, CA USA). El ADN cromosomal fue digerido con *EaeI* y ligado a el vector Lambda-ZAPII el cual había sido digerido con *NotI*. Para analizar esta biblioteca, replicas fueron transferidas a nitrocelulosa y los filtros fueron bloqueados con leche al 5% en buffer TBS y luego incubados por 3 hs. con suero de animales infectados (diluido 1/100). Los filtros fueron lavados 3 veces con el buffer TBS y los positivos visualizados con fosfatasa alcalina conjugada con IgG anti bovina. El desarrollo de color se inicia con los siguientes substratos: 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) y toluidinum nitroblue tetrazolium (NBT) (Promega Corp. Madison WI, USA). En las réplicas la escisión de los fagos resulta en clones recombinantes en pBluescript, los cuales fueron secuenciados usando Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Core (Applied Biosystem) y aplicados en un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystem) utilizando las facilidades de secuenciación de INTA Castelar.

2-Expresión y purificación de los antígenos seleccionados.

Se seleccionaron para expresar y purificar y aquellos antígenos de *M. bovis* y *M. paratuberculosis* que demostraron ser potencialmente útiles para utilizar en ensayos que midan respuesta humoral. Los antígenos seleccionados de la biblioteca de expresión de *M. bovis* fueron: TRB-B, TPX, Rv2624c, Rv3747, L7/L12 y los de *M. paratuberculosis* fueron: bactoferitina, m860 y lpp24. Otros antígenos utilizados en los macroarreglos de proteínas fueron antígenos caracterizados por otros grupos, tal como los antígenos inmunodominantes de *M. bovis* MBP70, MBP64, MBP83 y ESAT-6, y el antígeno inmunodominante de *M. paratuberculosis* P34. El sistema que se utilizarán para la expresión y purificación de los antígenos fue el **sistema pRSET**. El **pRSET** es un vector con el cual se consigue alta expresión en bacterias del gen clonado, en fase con el promotor T7. Una secuencia corta le da estabilidad al transcripto y una secuencia terminadora asegura la eficiente terminación de la transcripción. El plásmido contiene un dominio que codifica para una cola de aminoácidos histidina, esto permite expresar la proteína de interés como proteína de fusión y facilita substancialmente la purificación de la proteína recombinante dado que las polihistidinas se unen con alta afinidad a las matrices que tienen metales quelantes. Además la cola de histidinas puede removerse por clivaje específico con trombina. Los pasos seguidos fueron: **Obtención de ADN codificante de los antígenos seleccionados por PCR**: El gen que codifica para las proteínas

antigénicas seleccionadas, fue amplificado mediante la reacción de PCR. Para el diseño de los oligonucleótidos 5' y 3', se tubo en cuenta las secuencias consenso necesarias para asegurar la correcta transcripción y traducción del gen. **Clonado del gen de interés:** El gen de interés fue clonado en algunos de los reading frames provistos por el vector para permitir la expresión de una proteína funcional. Con este vector recombinante se transformó *E. coli* competentes. **Secuenciación de ADN:** Para determinar la integridad de los genes clonados, se secuenciaron los plásmidos recombinante por el método de secuenciación directa con dideoxinucleótidos. Se utilizó el kit de la enzima Secuenasa y 35S dATP como nucleótido radioactivo. **Inducción de las células transformadas:** Las células transformadas con pRSET se crecieron ON y luego una dilución 1/100 se creció hasta D.O.600 =0.6 y se agregó IPTG a una concentración final de 1mM a diferentes tiempos para su induccion. Para cada proteína se determinó el tiempo de inducción necesario para obtener una máxima expresión de proteínas. Para lo cual 1 ml de cada cultivo inducido a diferentes tiempos fue centrifugado y el pellet resuspendido en loading buffer y sembrado en un gel de polyacrilamida, el gel se tiñó con coomassie blue para ver que tiempo corresponde a la máxima inducción. **Purificación de la proteína recombinante:** Las proteínas fueron primero aisladas bajo condiciones no desnaturalizantes. Primero el pellet celular se resuspendió en un buffer fosfato y se le agregó lysozima a una concentración final de 100 ug/ml y se incubó 20 min a 0°C. El lisado fue congelado en nitrógeno liquido y luego descongelado a37°C, se repitieron estos pasos de congelado descongelado dos veces más. Se trató el lisado con Dnase/Rnase a concentración final de 5 ug/ml por 15 min a 0°C y se removió estos insolubles por centrifugación. Luego la purificación se realizó utilizando una columna de afinidad que une específicamente la cola de histidinas de la proteína de fusión. Extractos proteicos se sembraron en la columna de afinidad, la cual fue lavada para eliminar todas las proteínas celulares que no tenían afinidad por el quelante de la matriz. Finalmente se eluyó la proteína recombinante específicamente en presencia de imidazol y se colectó fracciones. Se leyó la densidad óptica de cada fracción a 280 nm para identificar el pico correspondiente a las proteínas. **Purificación fina:** Las proteínas purificadas se electroeluyeron y se determinaron la concentraciones.

3- Evaluación de los antígenos aplicados en el macroarreglo de proteínas

Los antígenos recobinantes fueron aplicados en una membrana de PVDF (en tabla 1 se indican los antígenos utilizados) y los sueros de los animales se colocaron en una dilución 1/100 en sentido perpendicular a la posición de loa antígenos. Se evaluaron los antígenos individuales de la tabla 1 y además se incorporó en el macroarreglo: PPD aviar y PPD bovina (PPDa y PVDb = derivado proteico purificado aviar y bovino), proteínas del sobrenadante de cultivo de *M. bovis*, extracto total celular de *M. bovis* y *M. paratuberculosis* y el antígeno PPA, que son proteínas protoplasmáticas del complejo *M. avium* (tabla 1). Se evaluaron sueros de animales con tuberculosis, con paratuberculosis y animales sanos (tabla 2).

RESULTADOS

Se utilizaron en este estudio tres grupos de animales, señalados en la tabla 2. Aquellos caracterizados en su nombre con la letra a: son animales con ELISA positivo (usando como antígeno el PPA) y aislamiento de *M. paratuberculosis* de materia fecal, con la letra b: son animales PPD_b positivos y con aislamiento de *M. bovis* y con la letra c: animales PPD_b positivos pero sin aislamiento. Los resultados del grupo a, animales con paratuberculosis, fueron: el suero de varios de estos animales reconocen los antígenos recombinantes de *M. paratuberculosis*, P34, bactoferitina, m860 y lpp24, también reconocen el extracto celular de *M. paratuberculosis*, las proteínas protoplasmáticas de *M. paratuberculosis* (PPA) y la PPD_a. Pero además se observa que el suero de la mayoría de estos animales reconoce los antígenos de *M. bovis* MPB83, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX y el extracto celular de *M. bovis* y la PPD_b (figura 5, 6 y 8).

El suero de la mayoría de los animales del grupo b: animales con tuberculosis, reconocen a los antígenos recombinantes de *M. bovis*: MPB83, ESAT6, RV2624, RV3747 y TPX. También reconocen algunos antígenos de *M. paratuberculosis* aunque en forma más tenue que los animales del grupo a (figura 5 y 8).

Los animales del grupo c: PPD_b positivos, sin aislamiento de *M. bovis*, responden a MPB83, ESAT6, RV2624, RV3747 (figura 5, 7 y 8) e igual que los del grupo b reconocen levemente algunas proteínas de *M. paratuberculosis*. De los animales sanos, 1 en figura 6 reacciona con el extracto celular de *M. bovis* y con el de *M. paratuberculosis*, y con PPD_b y PPA (proteínas protoplasmáticas de *M. paratuberculosis*), y 6 animales sanos en la figura 7, reaccionan con los antígenos recombinantes MPB83, ESAT6, RV3747 y con el extracto celular de *M. bovis*, *M. paratuberculosis* y con PPA.

Para obtener los valores de sensibilidad y especificidad, dividimos los animales en sanos y enfermos. Se considera animales enfermos aquellos con PPD_b positiva (con tuberculosis) y aquellos ELISA positivo con aislamiento de *M. paratuberculosis* en materia fecal (con paratuberculosis).

	ENFERMOS	SANOS
Reconocen algún antígeno de la membrana	55	7
No reconocen ningún antígeno	1	20

Sensibilidad : 98%

Especificidad: 74%

CONCLUSIONES

En el presente estudio se detectaron animales con paratuberculosis o tuberculosis bovina con una alta sensibilidad utilizando macroarreglos de proteínas, que contienen antígenos recombinantes y fracciones proteicas obtenidos de los agentes etiológicos de estas enfermedades.

La ventaja de utilizar macroarreglos de proteínas frente a otras técnicas serológicas, es que se puede evaluar la respuesta individual del suero de cada animal a cada antígeno adherido en la membrana y por lo tanto evaluar la heterogeneidad en el reconocimiento de proteínas por los animales infectados, una característica en las infecciones con micobacterias

El antígeno de *M. bovis* preferentemente reconocido fue MPB83. Los animales con paratuberculosis además de reconocer antígenos de *M. paratuberculosis*, reconocen los antígenos recombinantes de *M. bovis*. Una alta reactividad cruzada se observa en la respuesta de estos últimos animales.

Debido a esta reactividad cruzada los macroarreglos de proteína no permiten un diagnóstico diferencial entre paratuberculosis y tuberculosis bovina. Pero esto no es una necesidad en la práctica, dado que ambas enfermedades tienen una sintomatología clínica específica y los animales asintomáticos son sospechosos de una u otra enfermedad en base a otros tests de diagnóstico, como son la tuberculinización con PPD_b y el ELISA para paratuberculosis con PPA (16) y confirmandose el diagnóstico con el aislamiento microbiano.

Los macroarreglos de proteínas son de utilidad para conocer en forma rápida el estado de los rodeos en diferentes regiones agrícola-ganaderas. Estos macroarreglos de proteínas podrían asistir a las campañas de control y erradicación de estas enfermedades, indicando si las regiones declaradas libres conservan ese estado, o en el caso de serología positiva para micobacterias, indicarían la necesidad de establecer que micobacterias infectan y aplicar medidas de control.

Nada más por el momento y nuevamente agradecemos vuestra atención y la concesión de este valioso premio que nos estimulará para proseguir las investigaciones.

Tabla1**Antígenos aplicados en las membranas**

Nombre en la membrana	Antígeno	Referencia
e mb	Extracto celular de <i>M. bovis</i>	
s mb	Sobrenadante de cultivo de <i>M. bovis</i>	
ppdb	PPD bovina (PPDb)	Derivado proteico purificado de <i>M. bovis</i>
m 64	MPB 64	Yamaguchi et al., 1989 (17)
m 70	MPB 70	Matsumoto et al., 1995 (18)
m 83 c	MPB 83 zona codificante	Wiker et al., 1998 (19)
m 83 s	MPB 83 con secuencia señal	
e 6	ESAT6	Sorensen et al., 1995 (20)
rv2624	RV2624	Caracterizado en nuestro laboratorio, en la biblioteca de expresión de <i>M. bovis</i>
rv3747	RV3747	idem
tpx	TPX	idem
trbb	TRBB	idem
L7L12	L7L12	idem
ppda	PPD aviar (PPDa)	Derivado proteico purificado de <i>M. avium</i>
ppa	PPA	Proteínas protoplasmáticas de <i>M. paratuberculosis</i>
p34	P34	De Kesel et al., 1993 (21)
bf	bactoferritina BF	Caracterizada en nuestro laboratorio en la biblioteca de expresión de <i>M. paratuberculosis</i> .
m860	m860	idem
lpp24	lpp24	idem

Tabla 2

Animales cuyos sueros se utilizaron en los macroarreglos de proteínas

Animal (figura donde se encuentra)	Resultados de ELISA-PPA, tuberculina-PPDb y cultivo	Antígenos que reconocen
a5111 (figura 5)	a = ELISA-PPA positivos, con aislamiento en materia fecal de <i>M. paratuberculosis</i>	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, TPX, PPDa, P34, BF, m860
a5144 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, TPX, PPDa, P34, BF, m860
a4719 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF, m860
a5402 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF, m860
a4595 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF, m860
a4785 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, P34, BF, m860
a4574 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF, m860
b208 “	b = PPDb positivas, con aislamiento de <i>M. bovis</i>	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF, m860
b209 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, P34, BF, m860
b203 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, PPDa, P34, BF, m860
b205 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, PPDa, P34, BF
b204 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, PPDa, P34, BF, m860
b207 “	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, PPDa, P34, BF

b206	“	“	e mb, MPB83 s, ESAT6, RV3747, BF.
c16	“	c = PPDb positivas, sin aislamiento	e mb, PPDb, MPB83 s, RV3747, PPDa, P34
c2721	“	“	MPB83 s, ESAT6
c2589	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, PPDa, PPA, P34, BF
c2710	“	“	TPX
c78	“	“	MPB83 s, ESAT6
c1001	“	“	e mb, PPDb, MPB64, MPB83 s, RV3747, PPDa, PPA, P34, BF
a4491 (figura 6)	“	a = PPDb negativas, con aislamiento en materia fecal de <i>M. paratuberculosis</i>	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, e mpt, PPA, P34
a4961	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, e mpt, PPA, P34
a210	“	“	MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34
a4713	“	“	MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34
a4719	“	“	e mb, PPDb, MPB3 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34
a4545	“	“	e mb, PPDb, MPB3 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34
a4955	“	“	e mb, PPDb, TPX, e mpt, PPA, P34
b208	“	b = PPDb positivas, con aislamiento de <i>M. bovis</i>	e mb, PPDb, TPX, e mpt, PPA,
209	“	PPDb negativas, sin aislamiento	ninguno
203	“	“	ninguno
205	“	“	ninguno
204	“	“	ninguno
207	“	“	ninguno
206	“	“	ninguno

57	“	“	ninguno
81	“	“	ninguno
775	“	“	e mb, PPDb, e mpt, PPA
4253	“	“	ninguno
751	“	“	ninguno
6025	“	“	ninguno
100	“	“	ninguno
4991 (figura 7)	“	“	ninguno
4961	“	“	ESAT6, RV3747
210	“	“	ninguno
4713	“	“	ninguno
4719	“	“	MPB83 s, ESAT6
4545	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, e mpt, PPA
4955	“	“	ninguno
208	“	“	ninguno
209	“	“	ninguno
203	“	“	e mb, MPB83, ESAT6, RV3747, e mpt
205	“	“	e mb, MPB83, ESAT6, RV3747, e mpt
204	“	“	ninguno
207	“	“	ninguno
206	“	“	MPB83, ESAT6
c57	“	c = PPDb positivas, sin aislamiento	e mb, PPDb, e mpt, PPA
c81	“	“	e mb, PPDb, e mpt, PPA
c775	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, e mpt, PPA, P34, BF, m860

c4253	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, e mpt, PPA, P34, BF, m860
c751	“	“	ninguno
c6025	“	“	MPB83, ESAT6
c100	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, e mpt, PPA, P34, BF, m860
a499 (figura 8)	a = PPDb negativas, con aislamiento en materia fecal de <i>M. paratuberculosis</i>		e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, BF
a496	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA
a210	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA
a471	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m 860
a471b	“	“	e mb, PPDb, MPB64, MPB70, MPB83 c, MPB83s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m 860b, lpp24
a454	“	“	e mb, PPDb, MPB70, MPB83 c, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
a495	“	“	e mb, smp, PPDb, MPB70, MPB83 c, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b9	“	b = PPDb positivas, con aislamiento de <i>M. bovis</i>	e mb, PPDb, MPB0, MPB83 c, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b6	“	“	e mb, PPDb, MPB70, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b10	“	“	MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24

b14	“	“	PPDb, MPB64, MPB70, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, L7L12, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b7	“	“	PPDb, MPB70, MPB83 c, MPB83 s, ESAT6, TRBB, RV2624, RV3747, TPX, L7L12, e mpt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b12	“	“	e mb, PPDb, MPB64, MPB70, MPB83 c, MPB83 s, ESAT6, TRBB RV2624, RV3747, TPX, L7L12, empt, PPDa, PPA, P34, BF, m860, lpp24
b15	“	“	MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, P34, BF, m860, lpp24
c57	“	c = PPDb positivas, sin aislamiento	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, empt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
c81	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, empt, PPA, m860, lpp24
c775	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, empt, PPA, P34, BF, m860, lpp24
c42	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747, empt, PPA
c75	“	“	e mb, PPDb, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747.
c60	“	“	e mb, MPB70, MPB83 s, ESAT6, RV2624, RV3747
c10	“	“	e mb, MPB83 s, ESAT, RV2624, RV3747

BIBLIOGRAFÍA

1. PAHO: Pan American Health Organization. 1991. Health Conditions in the Americas, 1990, vol 1. Scientific Publication no. 524. Washington DC: Pan American Health Organization.
2. Latini, O., Canal, A., Ferrara, M., Sequeira, M., Sequeira, G. y Bagnaroli, R. Determinación de prevalencia de *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomiso en frigoríficos. (1995) Informe del Instituto Nacional de Epidemiología "Emilio Coni" Santa Fe
3. de Kantor I. and Ritaco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40:5-14, 1994
4. Wood, P.R., Corner, L.A., Plackett, P. y Csiro. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res. Vet. Scien.* 49:46-49.
5. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, 1992 A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* ; 31(1): 71-79
6. Fifis, T., Costopoulos, C., Corner, L. A. y Wood, P. R. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. (1992). *Vet. Microbiol.*30:343-354
7. Hermon-Taylor J., T. Bull, J. Sheridan, J. Cheng, M. Stellakis, and N. Sumar, 2000: Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. *Canadian Journal Gastroenterology* 14, 521-539.
8. Moreira A., Spath E., Morsella C. Seroprevalence of Johne's disease in eleven districts of Buenos Aires. Argentina. Proceeding of the fourth International Colloquium on Paratuberculosis 1994.
10. Dundee L, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *Lett Appl Microbiol.* 2001 Sep;33(3):173-7.
11. Grant, I., C. Pope, L. O'Riordan, H. Ball, and M. Rowe, 2000: Improved detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Veterinary Microbiology* 77, 369-378.
12. Cataldi, A., Romano, M.I. and Bigi, F. A western blot study of *M. bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res Microbiol.*145: 689-698. (1994)
13. Bigi, F., Alito, A., Fisanotti, J.C., Romano, M.I. and Cataldi A.A. Characterization of a novel *Mycobacterium bovis* antigen containing PGLTS repeats. *Infection and Immunity* 63: 2581-2586. (1995).

14. Expression of the *Mycobacterium bovis* P36 gene in *Mycobacterium smegmatis* and the baculovirus/insect cell system. Bigi F, Taboga O, Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Cataldi AA. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Jan;32(1):29-37.
15. Bigi, F., Espitia C., Alito, A., Romano M. I., Cravero S. and Cataldi A. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology* 143:3599-3605. (1997).
16. Paolicchii FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003 Feb;50(1):20-6.
17. Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, Abe C, Nagai S, Terasaka K, Yamada T. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1989 Jan;57(1):283-8.
18. Matsumoto S, Matsuo T, Ohara N, Hotokezaka H, Naito M, Minami J, Yamada T. Cloning and sequencing of a unique antigen MPT70 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and expression in BCG using *E. coli*-mycobacteria shuttle vector. *Scand J Immunol.* 1995 Mar;41(3):281-7.
19. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev.* 1992 Dec;56(4):648-61. Review.
20. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995 May;63(5):1710-7.
21. De Kesel M, Gilot P, Coeme M, Cocito C, Misonne MC. Cloning and expression of portion of the 34-kDa protein gene of *Mycobacterium paratuberculosis*: its application to serological analysis of Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:947-954.

Figura 1 **Similares Signos Clínicos**

Diarreas
Pérdida de peso
Dolores abdominales
Debilitamiento progresivo



FIGURA 1 - SIMILARES SIGNOS CLINICOS

Figura 2 **Similar Patología**
Intestino

bovino

humano

Engrosamiento
Plegamiento
No-ulceras



FIGURA 2 - SIMILAR PATOLOGIA

Figura 3 Similar Histopatología tejido

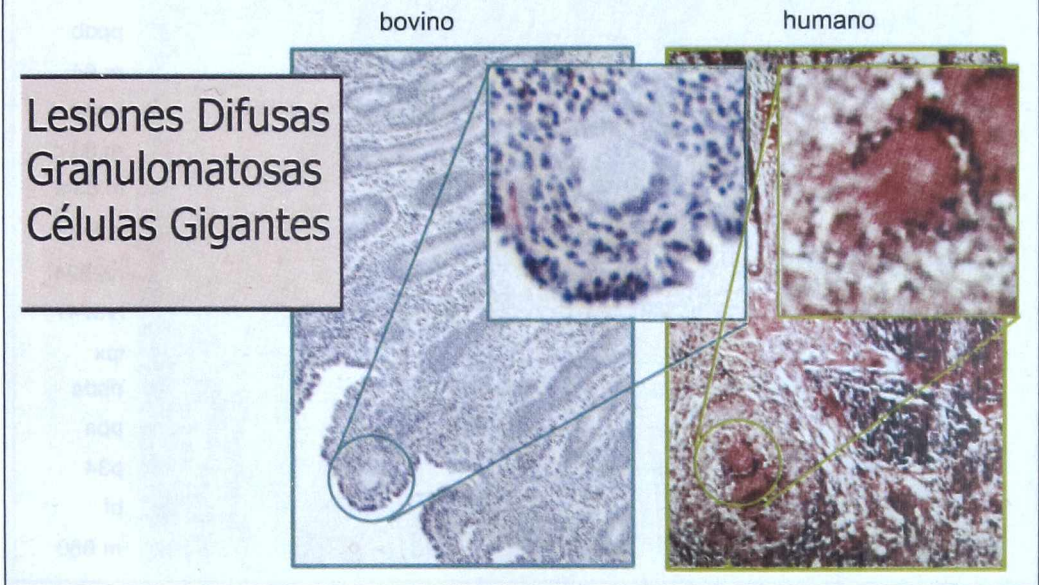


FIGURA 3 - SIMILAR HISTOPATOLOGIA

Figura 4 Detección por hibridación In Situ



FIGURA 4 - DETECCION POR HIBRIDACION IN SITU

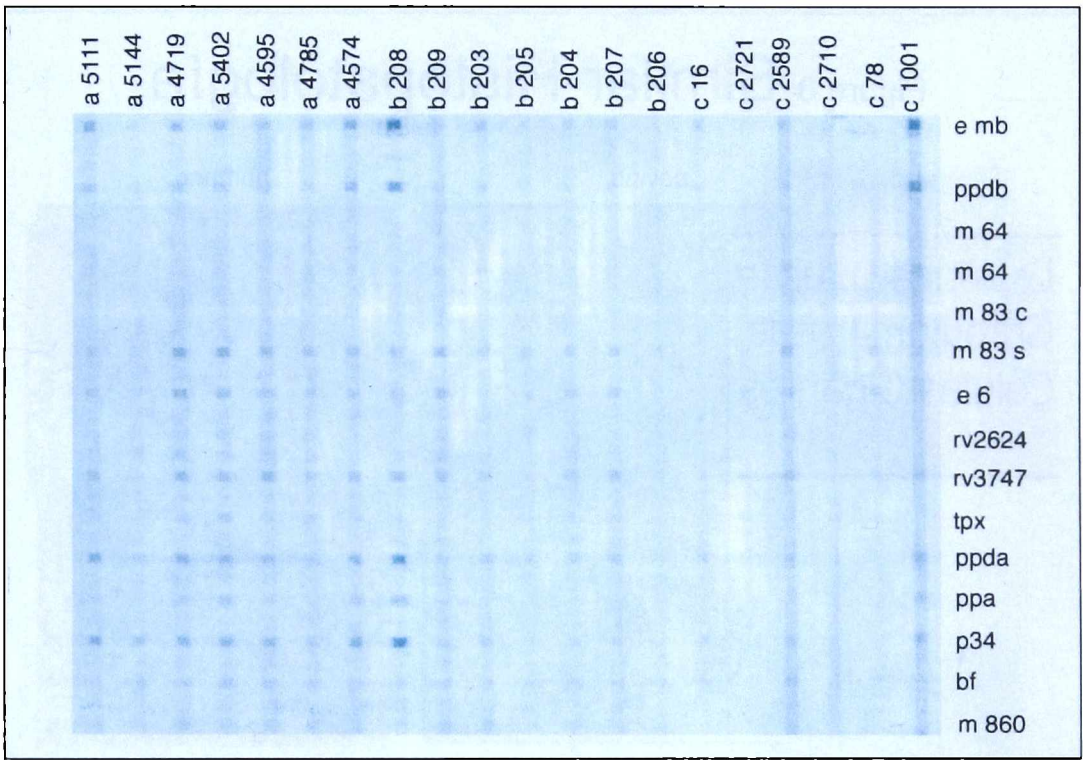


FIGURA 5 -

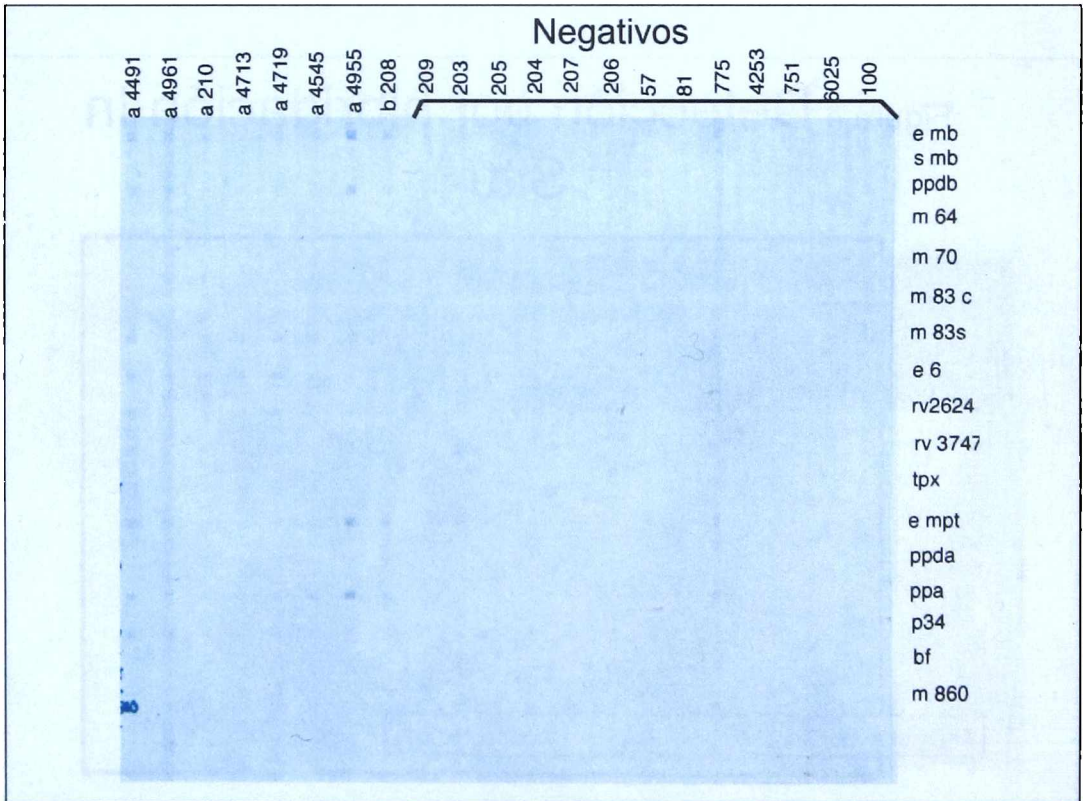


FIGURA 6 -

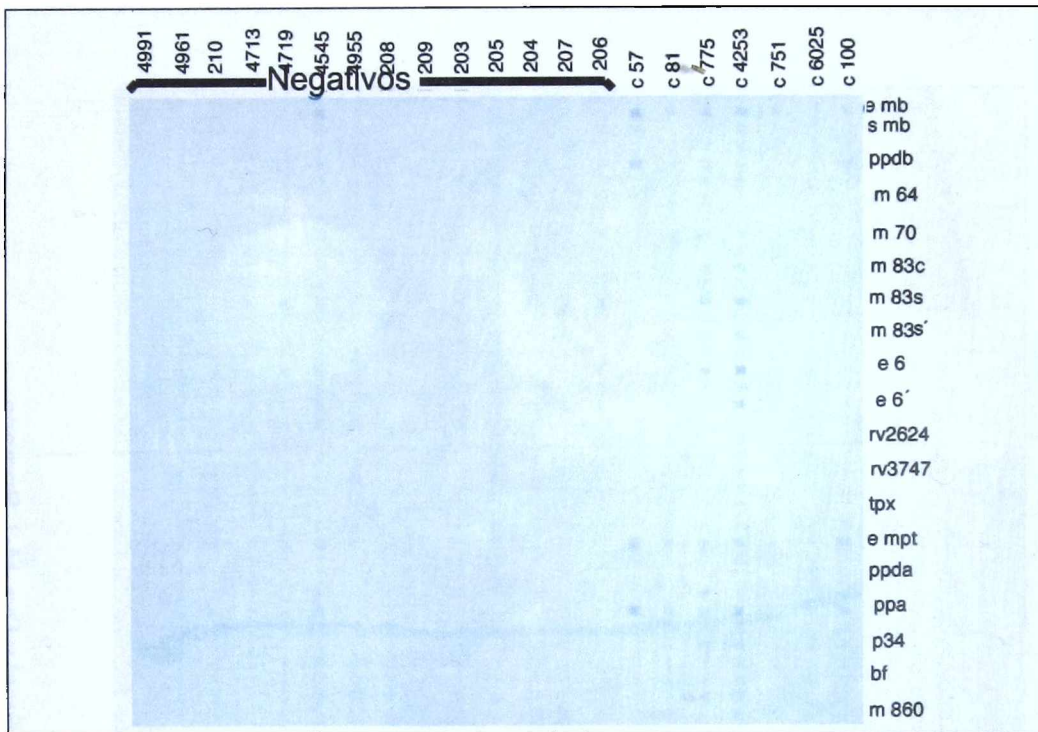


FIGURA7 -

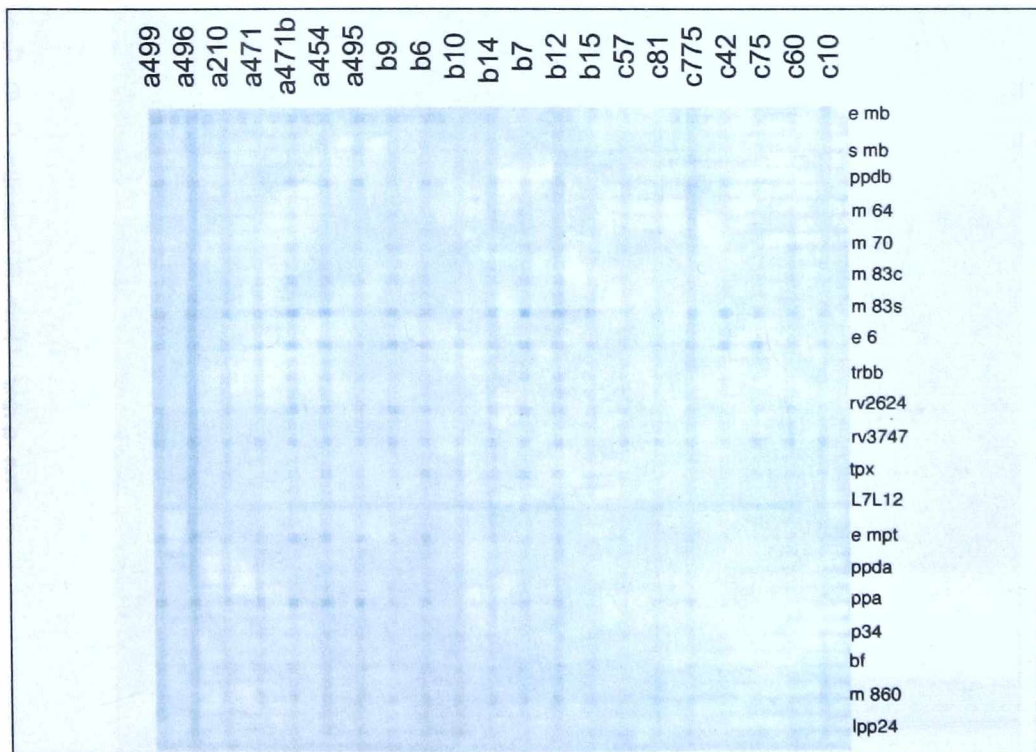


FIGURA 8 -