



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

USO DE UN CÓCTEL PROTEICO (ESAT-6 Y CFP-10) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS BOVINA

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Susana Flores Villalva

Tutor: José Ángel Gutiérrez Pabello

Comité tutorial: Camila Arriaga Díaz
Francisco Suárez Güemes

México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres y hermano:

Quienes siempre me han apoyado y me han

Impulsado ser mejor cada día.

No hay palabras que me permitan describir mi profundo
agradecimiento y amor.

A ti corazón,

Por tu amor, comprensión,

Paciencia y por compartir tu vida conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos brindados para la realización de esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por haberme permitido realizar esta investigación, por su asesoría, confianza, amistad y por su motivación constante.

A mi comité tutorial por su orientación, apoyo y por el tiempo dedicado a mi preparación.

A los miembros de mi jurado por su tiempo y comentarios en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Clara Espitia por abrirme las puertas de su laboratorio y por tratarme como un miembro más de su equipo.

Al Dr. Antonio J. Vallecillo por su asesoría, apoyo y por contribuir en mi formación pero sobre todo por su invaluable amistad.

A la M. en C. Cristina Parada Colín quién además de ser una gran amiga, me brindo su asesoría y apoyo técnico en la expresión y purificación de las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10.

A los MVZ Rafael Soto y Antonio Vázquez por su apoyo en el trabajo de campo con los bovinos en el CAIT.

Al personal del CEIEGT, CEIEPAA, CEPIPSA por permitirnos trabajar con los bovinos de estos centros de enseñanza e investigación.

A la MVZ Hilda Sánchez por su apoyo en el trabajo de campo con los bovinos.

A Karina Hernández por su apoyo incondicional, su cariño, confianza y por ser una gran amiga.

A mis amigas de toda la vida por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. ¡Las quiero mucho cuatreras!

Al resto de mis amigos quienes siempre me han demostrado su cariño y confianza. Son muy importantes para mí.

ÍNDICE

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Agente etiológico	4
2.2. Patogenia de la Infección	5
2.3. Interacción de <i>M. bovis</i> con el sistema inmune del hospedero.....	8
2.4. Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública y situación actual	10
2.5. Diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	11
2.5.1. Evaluación de la respuesta inmune celular	11
2.5.1.1. Prueba de hipersensibilidad retardada.....	11
2.5.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ)	14
2.5.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	16
2.5.2.1. Prueba de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	16
2.5.3. Identificación del agente	18
2.5.3.1. Inspección sanitaria e histopatología	18
2.5.3.2. Aislamiento bacteriano.....	19
2.5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
2.6. ESAT-6 y CFP-10	22
3. ANTECEDENTES	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo General	26
5.2. Objetivos Específicos	26
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28

7.1.	Producción de las proteínas recombinantes.....	28
7.1.1.	Purificación por afinidad a níquel.....	29
7.1.2.	Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE e Inmunotransferencia.....	29
7.1.3.	Determinación de concentración de endotoxina.....	30
7.2.	Determinación de la producción de Interferón Gamma (IFN- γ).....	31
7.2.1.	Colección de sangre para estímulo celular.....	31
7.2.2.	Evaluación de la producción de IFN- γ	32
7.3.	Aislamiento de ADN micobacteriano.....	32
7.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
7.5.	Determinación de la sensibilidad del PCR simple y anidado.....	34
7.6.	Descripción del origen de los bovinos utilizados.....	35
7.6.1.	Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT).....	35
7.6.2.	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano.....	35
7.6.3.	Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical.....	36
7.6.4.	Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal.....	36
7.7.	Estudio Piloto.....	36
7.7.1.	Animales experimentales.....	36
7.7.2.	Determinación de la concentración del cóctel proteico ESAT-6 y CFP-10 para el estudio <i>in vivo</i>	37
7.8.	Estudio de campo.....	38
7.8.1.	Tuberculinización y administración intradérmica del cóctel proteico.....	41
7.9.	Análisis estadístico.....	41
8.	Resultados.....	43
8.1.	Producción de las proteínas recombinantes.....	43
8.2.	Estudio Piloto.....	49
8.2.1.	Prueba de IFN- γ	49
8.2.2.	PCR.....	50
8.2.3.	Prueba de hipersensibilidad retardada.....	51

8.3.	Estudio de campo	55
8.3.1.	Respuesta in vitro hacia el cóctel proteico.....	55
8.3.2.	Respuesta in vivo hacia el cóctel proteico	56
8.3.3.	Evaluación del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en la prueba de de IFN- γ en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	58
8.3.4.	Evaluación del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en la prueba intradérmica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	60
8.3.5.	Uso del PCR a partir de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	62
8.3.6.	Evaluación del cóctel proteico en bovinos libres de la infección con <i>M. bovis</i> y la influencia de la infección por <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	64
8.4.	Sensibilidad del método de detección de <i>M. bovis</i> mediante PCR simple y anidado.....	65
9.	DISCUSIÓN	66
10.	CONCLUSIONES	73
11.	PERSPECTIVAS	74
12.	BIBLIOGRAFÍA	75

Índice de Figuras

Figura 2-1.	Escenario evolutivo del complejo <i>M. tuberculosis</i>	5
Figura 2-2.	Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a <i>M. bovis</i>	7
Figura 2-3.	Interacción de <i>M. bovis</i> con el sistema inmune del hospedero	8
Figura 2-4.	Representación del espectro de la respuesta inmune del bovino después de la infección por <i>M. bovis</i>	9
Figura 2-5.	Influencia de la prueba cervical comparativa y la prueba caudal en la prueba de IFN- γ en animales infectados naturalmente con <i>M. bovis</i>	16
Figura 7-1.	Puntos de inoculación para la evaluación de la concentración del cóctel proteico a utilizar en animales naturalmente expuestos y libres de tuberculosis bovina	38
Figura 7-2.	Puntos de inoculación de los antígenos para el estudio de campo en animales naturalmente expuestos y libres de la enfermedad.....	41
Figura 8-1.	Cinética de crecimiento de la cepas de expresión <i>E.coli</i> C41: pRSET-ESAT-6 y M15:pREP4 pQE32-CFP10.....	43

Figura 8-2. Expresión de la proteína recombinante <i>E. coli</i> C41- <i>pRSETesat6</i> con diferentes concentraciones de IPTG.	44
Figura 8-3. Expresión de la proteína recombinante ESAT-6 de un cultivo de 1 L de medio LB con carbenicilina (100mg/ml).	45
Figura 8-4. Purificación de la proteína recombinante ESAT-6.	46
Figura 8-5. Expresión de la proteína recombinante CFP-10 de un cultivo de 1 L de medio LB con carbenicilina (100mg/ml)	47
Figura 8-6. Purificación de la proteína recombinante CFP-10 mediante cromatografía de afinidad a metales.	48
Figura 8-7. Gel SDS-PAGE 15% teñido con azul de coomassie de las proteínas donadas por el Dr. M.Vordermeir.	48
Figura 8-8. Resultados del PCR simple para <i>mbp70</i> en muestras de exudado nasal de las vacas infectadas con <i>M. bovis</i> y de las vacas no infectadas.	50
Figura 8-9. Cinética de la respuesta intradérmica a los antígenos PPDB, PPDA, y a las diferentes concentraciones del cóctel proteico, en los animales infectados con <i>M. bovis</i>	51
Figura 8-10. Respuestas intradérmicas a los antígenos PPDB, PPDA y a los 10,20 y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y a los 30 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10+MPB83 en los animales infectados con <i>M. bovis</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación.	52
Figura 8-11. Respuestas intradérmicas a los antígenos PPDB, PPDA y a los 10,20 y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y a los 30 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10+MPB83 en los animales libre de tuberculosis bovina a las 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación.	53
Figura 8-12. Comparación de las respuestas intradérmicas a las 72 horas hacia los antígenos PPDB, PPDA y 20 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en los animales infectados o no con tuberculosis bovina.	54
Figura 8-13. Efecto de la prevalencia en el índice de respuesta <i>in vitro</i> hacia el PPDB, PPDA y cóctel proteico mediante la prueba de IFN-γ.	56
Figura 8-14. Respuestas intradérmicas hacia los antígenos PPDB, PPDA y cóctel proteico.	57
Figura 8-15. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba de IFN-γ empleando el PPD o el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en el hato con alta prevalencia a tuberculosis bovina.	59
Figura 8-16. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba de IFN-γ empleando el PPD o el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en el hato de baja prevalencia a tuberculosis bovina con co-infección con MAP.	59

Figura 8-17. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba intradérmica empleando el PPD el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en el hato de alta o baja prevalencia a tuberculosis bovina con co-infección con MAP.	61
Figura 8-18. Diagramas de Venn que muestran el efecto aditivo del uso del PCR a partir de la extracción de ADN de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el hato de alta prevalencia (n= 138)..	62
Figura 8-19. Diagramas de Venn que muestran el efecto aditivo del uso del PCR a partir de la extracción de ADN de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el hato de baja prevalencia.	63
Figura 8-20. Respuestas intradérmicas inducidas por el PPDA, PPDB y cóctel proteico en animales libres de la infección con <i>M. bovis</i>	64
Figura 8-21. Sensibilidad de la prueba de PCR simple y anidado a partir de exudado nasal..	65

Índice de Cuadros

Cuadro 2-1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas intradérmicas realizadas en el ganado bovino	12
Cuadro 2-2. Distribución de los granulomas detectados en los bovinos infectados con tuberculosis bovina.....	18
Cuadro 2-3. Características bioquímicas de algunas especies del complejo <i>M. tuberculosis</i>	21
Cuadro 2-4. Distribución de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 entre las micobacterias	24
Cuadro 7-1. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa.....	34
Cuadro 7-2. Tratamientos administrados intradérmicamente a los bovinos del grupo experimental y grupo control, en un volumen total de 0.1ml.	37
Cuadro 7-3. Número de bovinos muestreados en el estudio de campo.	40
Cuadro 8-1. Concentración de endotoxina en las proteínas recombinantes donadas por el Dr. M. Vordermeier.....	49
Cuadro 8-2. Efecto del punto de corte en la prueba de IFN- γ al cóctel proteico para identificar correctamente animales infectados o no de tuberculosis bovina.	50
Cuadro 8-3. Efecto del punto de corte al cóctel proteico en la prueba intradérmica para identificar correctamente animales infectados o no de tuberculosis bovina.	55
Cuadro 8-8. Número de animales detectados con el uso del cóctel proteico en forma intradérmica y en la prueba de IFN- γ , en animales sospechosos y negativos determinados por la prueba cervical comparativa en hatos del alta y baja prevalencia.	61

RESUMEN

La piedra angular en el control de la tuberculosis en el ganado es la identificación certera y eliminación de los animales infectados con *Mycobacterium bovis*; no obstante, las limitaciones en la especificidad de la prueba de la tuberculina resulta en una falla en la diferenciación entre animales infectados y animales expuestos a micobacterias ambientales. Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 son fuertemente reconocidos en ganado infectado con tuberculosis bovina, y estas proteínas no inducen respuestas en el ganado no infectado, por lo que su uso puede ser una alternativa al PPD en las pruebas intradérmicas en el ganado y otras especies.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 administrado de forma intradérmica en ganado infectado naturalmente en hatos con diferentes prevalencias de la infección.

Se evaluaron diferentes concentraciones del cóctel proteico (5, 10 y 15 μg de cada proteína) en 10 animales infectados naturalmente con *M. bovis* y 10 animales no infectados, la lectura de la reacción se realizó cada 24 horas durante 4 días. Las respuestas hacia el cóctel proteico alcanzaron su pico máximo a las 72 horas. La mejor respuesta intradérmica fue obtenida con 10 μg de cada proteína. Posteriormente esta concentración del cóctel proteico fue evaluado en hatos con alta y baja prevalencia de la infección, éste último con co-infección paratuberculosis. Nuestros datos muestran que el uso intradérmico del cóctel proteico en paralelo con la prueba de la tuberculina permite la identificación de animales sospechosos a esta última prueba y mejora la identificación de animales infectados con tuberculosis en hatos con co-infección con paratuberculosis. De la misma forma, el cóctel proteico fue evaluado en hatos libres de tuberculosis bovina. A diferencia del PPD, el cóctel proteico no induce reacciones intradérmicas en animales sensibilizados a la exposición por micobacterias ambientales o infectados con paratuberculosis. Por lo que concluimos que el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 mejora la especificidad de la prueba intradérmica sin afectar la sensibilidad.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, ESAT-6, CFP-10 prueba de intradermorreacción.

ABSTRACT

The cornerstone of tuberculosis control in cattle is the accurate detection and removal of animals infected by *Mycobacterium bovis*; however, the limitations in the specificity of tuberculin testing result in a failure to differentiate between *M. bovis* infected animals and animals exposed to non-pathogenic environmental mycobacterial species. The antigens ESAT-6 and CFP-10 are strongly recognized in tuberculosis infected cattle, and they do not elicit a response in cattle without infection. Besides, they are absent in most of environmental mycobacterial species, so its use can be an alternative to PPD tuberculin in the development of more specific skin diagnostic test in cattle and other species.

The aim of the current study was to assess the potential of an ESAT-6 and CFP-10 protein cocktail in a skin-test format in naturally infected cattle, with different tuberculosis prevalences.

We tested at different dose concentration of the protein cocktail (5, 10 and 15 µg for each protein) in 10 *M. bovis* infected cattle and in 10 non-infected cattle. Skin responses were measure every 24 hours for 4 days. Skin responses to the protein cocktail peaked after 72 hours. The best skin response to the protein cocktail was obtained with 10 µg for each protein. Subsequently this concentration was tested in herds with high and low tuberculosis prevalence the last with paratuberculosis co-infection. Our data show that the protein cocktail in parallel with PPD tuberculin test allows the identification of suspected animals and improve the detection of tuberculosis infected cattle in herds with paratuberculosis co-infection. Also the protein cocktail was assessed in free-tuberculosis herds. Unlike to PPD, the protein cocktail did not elicit a response in cattle without infection. For this we conclude that the ESAT-6 and CFP-10 protein cocktail improve the specificity of the skin test without affecting the sensitivity

Keywords: *Mycobacterium bovis*, ESAT-6, CFP-10, skin test.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis humana es la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo, especialmente en Asia y África. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (*WHO*, por su sigla en inglés) en el 2006 hubo 9.2 millones de casos nuevos, y 1.7 muertes por tuberculosis. Ésta enfermedad es causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en éste grupo se encuentra *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), el agente causante de la tuberculosis bovina, el cual tiene un espectro de hospederos muy amplio, dentro de los que se encuentran los primates, incluido el humano, animales domésticos y de vida silvestre (1).

La tuberculosis bovina es una enfermedad transmisible y crónica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas (2). Ésta es una de las enfermedades más importantes en la industria pecuaria al ocasionar graves pérdidas económicas, y representar una barrera para la comercialización del ganado y sus subproductos; además de constituir una amenaza para la salud humana (3).

La prevalencia de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis* muestra una considerable variación regional dependiendo de la presencia y extensión de la enfermedad en el ganado, la situación económica, social y la aplicación de medidas preventivas por lo que la información disponible es muy variable. En general, se considera que la incidencia de la infección en humanos es mucho mayor en áreas rurales con hatos infectados (4). La infección en los humanos puede ocurrir por inhalación de aerosoles o a través del consumo de leche no pasteurizada. Considerándose un riesgo ocupacional en veterinarios, granjeros y trabajadores de rastros. La transmisión entre personas es posible dependiendo del estatus inmunológico del individuo (5-6).

La tuberculosis bovina sigue manifestándose como un problema en el ganado a pesar del establecimiento de programas de control de la enfermedad. Los factores más importantes son económicos, sociales y culturales que evitan que se lleven a cabo eficientemente los programas de control, aunado a las limitaciones en la sensibilidad y

especificidad del derivado proteico purificado (*PPD*, por sus sigla en inglés) y la incapacidad de detectar todos los animales infectados con *M. bovis* lo que contribuye significativamente a la persistencia de la enfermedad (7). El *PPD* actualmente utilizado contiene una mezcla de proteínas pobremente definida, muchas de las cuales se encuentran presentes en micobacterias ambientales, por lo que en algunos casos no permite una diferenciación entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados por micobacterias ambientales, lo que representa un serio problema en lugares donde es común la co-infección con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) (8).

Es por esto que se ha propuesto el uso de pruebas alternativas o complementarias para confirmar o negar los resultados de la prueba intradérmica, como la prueba de interferón gamma (*IFN- γ*); sin embargo, debido a su alto costo, comparado con la prueba de la tuberculina, y la necesidad de personal y equipo especializado es difícil su aplicabilidad (9).

Estudios *in vitro* han demostrado que los antígenos micobacterianos *ESAT-6* y *CFP-10* dan mejores resultados que el *PPD* al utilizarlos en una prueba de detección de *IFN- γ* en bovinos infectados y libres de la enfermedad. Estos resultados indican que el uso del cóctel proteico incrementa la especificidad de la prueba sin afectar su sensibilidad, por lo que su uso podría ser de gran valor en las pruebas diagnósticas de rutina en el ganado (10). El uso de estos antígenos permite diferenciar animales infectados por *M. bovis* o sensibilizados por la exposición a micobacterias ambientales, así como entre animales infectados por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Además la vacunación con *M. bovis* *BCG* no induce una respuesta hacia estos antígenos, favoreciendo de esta forma la vacunación en el ganado (11).

Diversas proteínas como *MPT64*, *MPB59*, *MPB70*, *MPB83*, *ESAT-6* y *CFP-10*, han sido probadas principalmente en ratones y cobayos para su uso potencial como reactivos profilácticos y de diagnóstico (12-14). Solamente el antígeno *ESAT-6* ha sido probado intradérmicamente en ganado bovino demostrando que es posible generar respuestas dérmicas con éste antígeno altamente purificado; sin embargo, se requieren grandes cantidades de proteína y un mayor tiempo para realizar la lectura de la reacción intradérmica (5 días, en lugar de 3) (15). Este resultado se puede deber a que un solo

antígeno contiene menos epitopes para reclutar al sitio de inoculación el número de linfocitos T necesarios para obtener una respuesta medible en las pruebas intradérmicas, además de que el reconocimiento de antígenos es muy amplia y variable entre individuos (16). Estos resultados sugieren el uso de múltiples antígenos en forma de un cóctel proteico para ser utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

El propósito de este trabajo fue determinar la utilidad del cóctel proteico formado por las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina en animales naturalmente expuestos a *M. bovis*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico

El complejo *M. tuberculosis* consiste de siete especies y subespecies que incluyen *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*. Los cuales se caracterizan por tener el 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y una secuencia idéntica de RNAr 16S (17).

M. bovis, es un bacilo ácido alcohol resistente, alargado de aproximadamente 1-4µm, de lento crecimiento (intervalo generacional de 16 a 20 horas), aerobio y de vida intracelular (2).

La teoría tradicional del origen de la tuberculosis menciona que es una antroponosis; se sugería que *M. tuberculosis* había surgido de *M. bovis* durante la domesticación del ganado hace unos 10-15,000 años aproximadamente cuando el bacilo de la tuberculosis bovina se pudo haber transmitido a la población humana (18). Sin embargo, los análisis genómicos indican un escenario diferente. La pérdida de genes en el genoma de *M. bovis* sugiere que *M. canetti* es el antecesor común de las especies del complejo *M. tuberculosis*, las pérdidas sucesivas de regiones de DNA, empezando por la pérdida de la región RD9 originó a *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Las cepas modernas de *M. tuberculosis* se originaron del antecesor común por la pérdida del locus TbD1 (Figura 2-1) (19).

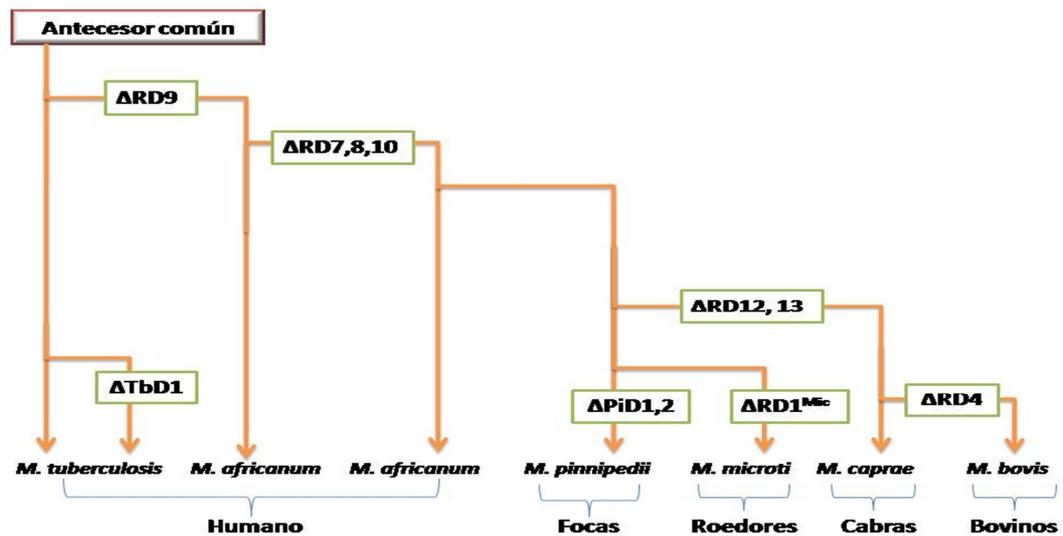


Figura 2-1. Escenario evolutivo del complejo *M. tuberculosis*. La identificación de distintas deleciones en el genoma funciona como un marcador único para cada cepa (Tomado y modificado de Hewinson *et. al.*, 2006) (19).

2.2. Patogenia de la Infección

La infección en el bovino puede ser adquirida por diferentes vías. Sin embargo, la edad, comportamiento de los animales, el medio ambiente y las prácticas en las explotaciones tienen una influencia significativa en la forma en que la bacteria se pone en contacto con su hospedero (20). La ruta principal de infección es la vía respiratoria por lo que la distribución de las lesiones y la patología se observa predominantemente en el tracto respiratorio, y en los linfonodos asociados (21).

La transmisión de la enfermedad dentro del hato depende de una serie de factores asociados a las condiciones ambientales que enfrenta la bacteria, la resistencia o susceptibilidad del hospedero y la virulencia de la bacteria. Ambientes húmedos, templados y protegidos de los rayos solares benefician la sobrevivencia de la bacteria por largos períodos de tiempo conservando su capacidad infecciosa (1). Estudios en bovinos infectados experimentalmente muestran que es posible detectar de forma intermitente al

bacilo en el exudado nasal después del establecimiento de la infección. El inicio y duración del período de excreción depende de la dosis infectante. No obstante, los bacilos también son eliminados por heces, orina y leche. (20, 22).

Una vez que el bacilo ha ingresado a las vías respiratorias bajas es fagocitado por los macrófagos alveolares, estos pasan a través de la pared de los bronquiolos, entran a la circulación, y son llevados a los linfonodos, donde subsecuentemente interactúan con las células ahí almacenadas (23). Diversos estudios han demostrado que *M. bovis* ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada dentro de los macrófagos, engañar y evadir la respuesta inmune durante y después de su entrada al fagocito, y modular la función efectora de la respuesta inmune celular (2, 24). Esta interacción induce una respuesta pro-inflamatoria localizada, conduciendo a la producción de quimiocinas y citocinas que amplifican el reclutamiento celular dando lugar a una masa celular conocida como granuloma (25). Esta estructura está compuesta por un centro de macrófagos infectados rodeados por células gigantes vacuólicas o macrófagos espumosos, la capa más externa de la estructura es delineada por linfocitos, y puede estar rodeada de colágena y otros componentes de matriz celular (26).

En un estudio de bovinos infectados experimentalmente, las lesiones microscópicas pudieron ser observadas 7 días post-infección; sin embargo, las lesiones más grandes no pudieron ser observadas hasta los 14 días post-infección (27). Si los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de la bacteria dentro del granuloma, pero estas pueden permanecer viables durante toda la vida del individuo. Por lo que si el estatus inmunológico del hospedero se debilita, el granuloma se convierte en la fuente para la diseminación sistémica de las bacterias (26).

Pollock, *et al.* (23) refieren que una vez que el bovino se ha expuesto a *M. bovis* existen cuatro posibles escenarios, que son necesarios considerar en el diagnóstico de la enfermedad (Figura 2-2):

- 1) El bovino tiene la capacidad de resistir el desafío de la exposición a través de su respuesta inmune innata por lo que estos animales pueden resultar negativos a las pruebas diagnósticas y permanecer libres de la infección.
- 2) El bovino a pesar de resistir el desafío desarrolla cambios patológicos que pueden ser evidentes en la inspección post-mortem y presenta respuestas positivas a las pruebas diagnósticas.
- 3) El bovino después de la exposición a *M. bovis* es infectado y desarrolla la enfermedad, puede presentar respuestas positivas a las pruebas diagnósticas; sin embargo, conforme la enfermedad progresa puede llegar a ser anérgico.
- 4) El bovino después de la exposición e infección desarrolla una respuesta inmune eficaz, los cambios patológicos pueden ser menores, por lo que en la inspección post-mortem puede no haber evidencia de la infección. A estos animales se les conoce como reactores sin lesiones evidentes en la inspección post- mortem.

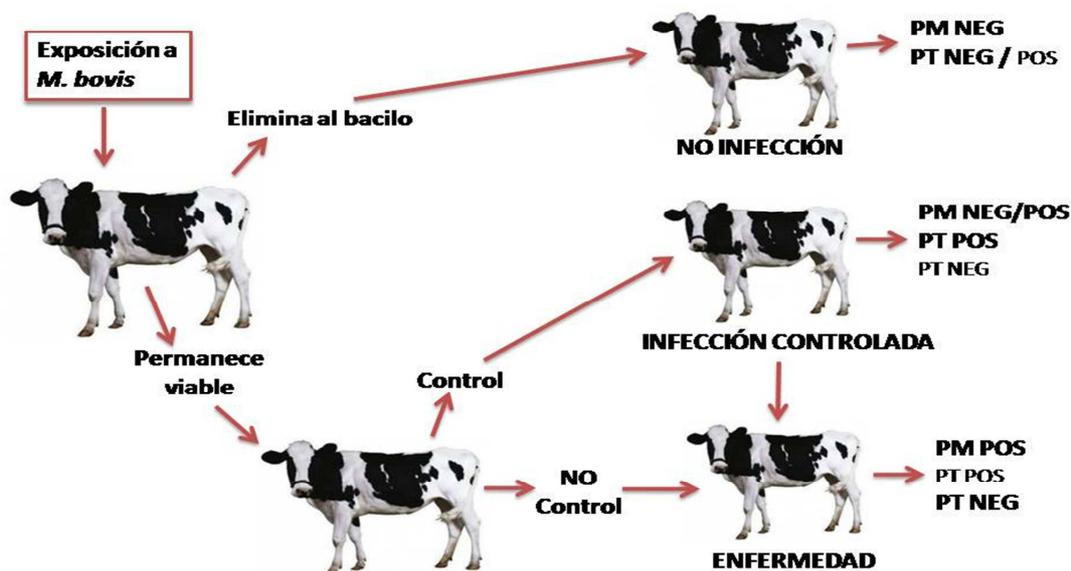


Figura 2-2. Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a *M. bovis*. (PM: Inspección post-mortem; PT: prueba de la tuberculina) (Tomado y modificado de Pollock, *et al.*, 2002) (23).

2.3. Interacción de *M. bovis* con el sistema inmune del hospedero

El papel del macrófago en la tuberculosis es una enigmática dicotomía. Por un lado es el célula huésped de la micobacteria; y por el otro, es la célula efectora para el control y destrucción de dicho patógeno (28). Esta célula es capaz de inhibir el desarrollo del bacilo mediante la fagocitosis y de participar ampliamente en la inmunidad celular, en el proceso de presentación de antígeno y el reclutamiento de linfocitos T (29).

El reconocimiento de la micobacteria por el macrófago puede llevarse a cabo por diversos receptores, como los receptores para Fc, receptores de complemento CR1, CR3, CR4, receptores de manosa, receptores *scavenger* y otras moléculas receptoras de superficie celular (30).

Después del reconocimiento de la micobacterias por las células fagocíticas se lleva a cabo la activación celular y la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, como IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-18. De la misma forma se producen citocinas anti-inflamatorias, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β , que en conjunto coordinan la respuesta inflamatoria (Figura 2-3) (31).

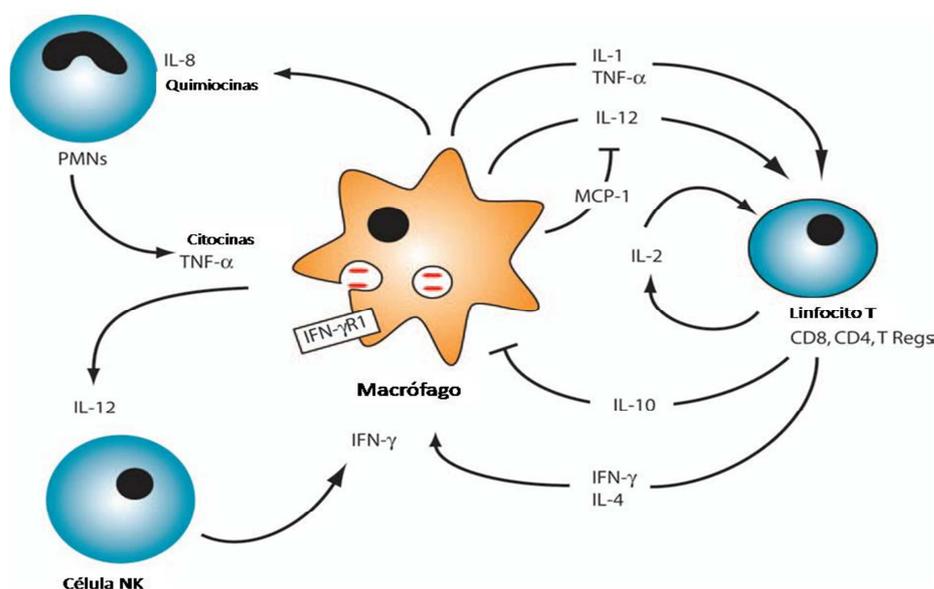


Figura 2-3. Interacción de *M. bovis* con el sistema inmune del hospedero. Después de la infección los macrófagos se activan y secretan citocinas y quimiocinas, para atraer al sitio de infección macrófagos, linfocitos T, células NK, los cuales producen IFN- γ , y junto con otras citocinas activa a los macrófagos y así controlan la infección. (Tomado y modificado de Berrington, et al. 2007) (31).

La respuesta inmunológica específica hacia *M. bovis* se inicia con la participación de los linfocitos T (α/β CD4+ y CD8+ y γ/δ) siendo el principal efector el linfocito T CD4+, involucrado en el reconocimiento de antígenos que son procesados en el fagosoma y presentados como pequeños fragmentos peptídicos anclados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II en la superficie celular de las células presentadoras de antígenos. Por otra parte, los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos que han sido procesados en el citosol y que son presentados por moléculas MCH I (32).

La respuesta inmune celular es tanto el mecanismo de defensa y la causa de la formación de granulomas observados en las infecciones por *M. bovis*, (7). Además, la respuesta inmune celular predominante cambia hacia una respuesta inmune humoral conforme la enfermedad progresa, provocando un fenómeno conocido como anergia, en el cual los animales no reaccionan a las pruebas diagnósticas actualmente usadas, representando un riesgo de infección para los otros animales (Figura 2-4) (33).

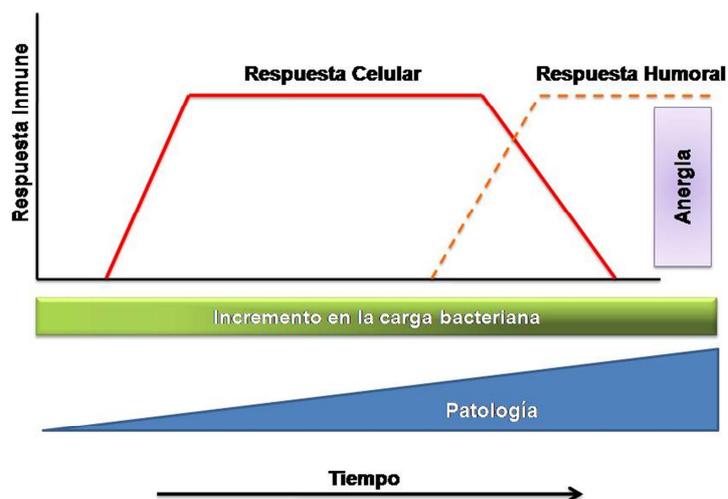


Figura 2-4. Representación del espectro de la respuesta inmune del bovino después de la infección por *M. bovis*. Inicialmente se desarrolla una respuesta inmune celular, la cual cambia hacia una respuesta humoral conforme la enfermedad progresa y aumenta la carga bacteriana, en estados avanzados de la enfermedad se puede desarrollar un estado de anergia (Tomado y modificado de Pollock, *et al.* 2002) (23).

2.4.Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública y situación actual

Como se mencionó anteriormente *M. bovis* es el agente etiológico de la tuberculosis en animales domésticos, también es una de las 3 especies del complejo *M. tuberculosis* que causa enfermedad en humanos. Históricamente, la infección por *M. bovis* ha sido relacionada a tuberculosis extra-pulmonar en niños debido al consumo de leche no pasteurizada, después de la introducción de la pasteurización la incidencia por esta vía de infección ha disminuido. Sin embargo, la infección por vía aérea es frecuente entre personas que tienen un contacto cercano con ganado infectado (34).

La incidencia real de la infección por *M. bovis* en humanos es desconocida y quizá subestimada ya que generalmente no se hace una distinción entre especies del aislado obtenido (3). En América Latina, la mayoría de los estudios han sido realizados en Argentina describiendo incidencias del 0.7% al 6.2% en regiones lecheras (35). En México existe poca información al respecto, en un estudio realizado en pacientes con problemas respiratorios crónicos, 3 de 19 aislamientos obtenidos correspondieron a *M. bovis* (36). Sin embargo, un análisis retrospectivo realizado en San Diego, California reveló que de los años 2001 a 2005 el 8% de los casos de tuberculosis se debió a *M. bovis*, de estos el 60% se presentó en personas de origen mexicano (37).

El control de la tuberculosis por *M. bovis* en el humano se basa en el control de la enfermedad en los animales, es por eso que se realiza una intensiva campaña para su erradicación y evitar las pérdidas económicas asociadas y las restricciones a la movilización de animales. Gracias a esto, actualmente 11 estados del país se encuentran en etapa de erradicación con una prevalencia menor al 0.5%.

Para efectos de exportación de ganado en pie el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 24 regiones de baja prevalencia, 14 de las cuales con una prevalencia menor al 0.1% pueden exportar con una sola prueba de tuberculina al lote, 9 regiones con una prevalencia menor al 0.5% pueden exportar con prueba de lote y prueba de hato de origen y una región que no requiere pruebas de

tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos ya que tiene una prevalencia menor al 0.01% (38).

2.5. Diagnóstico de la tuberculosis bovina

La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de tuberculosis alrededor del mundo. La infección se diagnostica por lo general en el animal vivo mediante reacciones de hipersensibilidad retardada. Habitualmente la infección es subclínica, raramente se observa evidencia clínica de la enfermedad en el ganado (39).

La tuberculinización es la prueba *ante-mortem* autorizada por la Organización Mundial en Sanidad Animal (40); sin embargo, en la Unión Europea, Estados Unidos y Australia se ha aprobado el uso de la prueba de IFN- γ . La primera prueba detecta la reacción de hipersensibilidad tardía a la inyección intradérmica del PPD, mientras que la segunda prueba, detecta la liberación de IFN- γ en cultivos con sangre completa estimulados con PPD usando una prueba de ELISA (7, 41-42). Tras el sacrificio, se realiza un examen post-mortem para buscar lesiones sugestivas a tuberculosis bovina, las cuáles se analizan por técnicas histopatológicas y bacteriológicas. También se pueden utilizar técnicas con sondas de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, el cultivo bacteriano tradicional continúa siendo el método rutinario de confirmación de la infección.

2.5.1. Evaluación de la respuesta inmune celular

2.5.1.1. Prueba de hipersensibilidad retardada

Esta prueba se fundamenta en la aplicación intradérmica de la tuberculina que fue descubierta por Roberto Koch en 1890 (43), el objetivo es identificar la presencia de los linfocitos T del huésped que han sido expuestos y están sensibilizados a antígenos específicos de *M. bovis* (44), esta reacción es actualmente definida como una hipersensibilidad de tipo retardado (45).

Koch desarrolló la tuberculina para ser utilizada como una vacuna terapéutica en humanos; sin embargo, pronto advirtió sus propiedades diagnósticas, ya que al ser inyectadas en personas infectadas, estas desarrollaban fiebre, escalofríos y vómito, signos no observados en personas no infectadas. Esta prueba fue adoptada para su uso en el ganado cuando se descubrió que los animales desarrollaban una respuesta térmica después de inyecciones subcutáneas con 0.2 a 0.5 ml de tuberculina (42, 46-48). En 1908 Moussu y Mantoux modificaron la forma de aplicar la tuberculina, de una forma subcutánea a intradérmica, siendo los primeros en describir su uso en el ganado en el pliegue caudal (49). La prueba comparativa usando el PPD aviar fue introducida hasta 1942, y en 1975 se sustituyó la tuberculina humana por la tuberculina bovina después de demostrar que esta tenía una potencia mayor y era más específica (47).

La prueba de la tuberculina consiste en la inyección intradérmica del PPD bovino en la tabla del cuello y la subsecuente medición de la inflamación en el sitio de inoculación 72 horas después. Esto se puede llevar a cabo utilizando solo PPD bovino, o en una prueba comparativa, empleando PPD bovino y el PPD aviar. En México la prueba simple se realiza en el pliegue caudal de la cola (50). La elección de la prueba a utilizar depende de la prevalencia de la infección por *M. bovis* y el nivel de exposición ambiental a otras micobacterias sensibilizadoras (40). La sensibilidad y especificidad de las pruebas es variable, pero se considera que la prueba cervical es más sensible que la prueba caudal (47, 51). Aunque el uso de varias técnicas, diferentes dosis y preparaciones hace difícil una comparación, algunos autores han analizado la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Cuadro 2-1) (42, 47, 51-53).

Cuadro 2-1. Sensibilidad y especificidad de las pruebas intradérmicas realizadas en el ganado bovino (Tomado y modificado de Schiller, et al., 2010)(53).

<i>Prueba de la tuberculina</i>	<i>Sensibilidad %</i>	<i>Especificidad %</i>
Caudal	68-96.8	96-98.8
Cervical Simple	80-91	75.5-96.8
Cervical Doble comparativa	55.5-93.5	88.8-100

Los resultados de estas pruebas pueden ser influenciados por la etapa de la enfermedad, la presencia de otros organismos que provoquen reacciones cruzadas y por factores propios del bovino, como la inmunosupresión durante el período post-parto, un estado de estrés por transporte, infecciones virales que depriman al sistema inmune, etc. (42).

La reacción de hipersensibilidad hacia el PPD usualmente se desarrolla 3-6 semanas después de la infección con *M. bovis*, se cree que hay una correlación positiva entre el tamaño de la respuesta intradérmica y la extensión de la patología, lo que podría aumentar la probabilidad de hallar lesiones en rastro en animales con fuerte reacciones intradérmicas (54). Aunque un animal que se encuentre en un estado avanzado de la enfermedad puede desarrollar pobres reacciones intradérmicas y presentar varias lesiones.

La administración del PPD induce una supresión temporal de la respuesta intradérmica hacia los antígenos micobacterianos que puede confundir la interpretación de las subsecuentes pruebas (55). Dicha supresión se presenta desde el día 3 al 60 después de la inoculación, los mecanismos responsables de este efecto no han sido esclarecidos pero este fenómeno limita la versatilidad de las pruebas intradérmicas y es una advertencia de los efectos de la administración del antígeno en posteriores pruebas *in vitro* (56).

La gran desventaja del PPD actualmente utilizado es que muchos de los antígenos son encontrados en especies micobacterianas ambientales, lo que ocasiona problemas con la especificidad de la prueba. Por esta razón se introdujo el uso del PPD aviar en la prueba doble comparativa. A pesar de que esta prueba constituye una buena señal de exposición a micobacterias no siempre es posible discriminar entre el ganado con tuberculosis y ganado expuesto a micobacterias ambientales, lo que representa un serio problema en lugares donde es común la co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ya que en algunos animales, la respuesta hacia el PPD aviar puede ser igual o mayor que hacia el PPD bovino (8).

2.5.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ)

Debido a la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de la prueba de la tuberculina se ha propuesto la utilización de pruebas alternativas o complementarias, una de ellas es la prueba de IFN- γ que fue desarrollada en Australia (41) y es comercializada bajo el nombre de Bovigam® (Prionics, Switzerland), este kit emplea como antígenos al PPD bovino y aviar, se puede utilizar en borregos, cabras, búfalos y teóricamente en cualquier especie de la familia *Bovidae*.

Esta prueba presenta una sensibilidad y especificidad superior a la prueba de la tuberculina (87.7% y 99.2%, respectivamente) (53); además, el uso de ambas pruebas en paralelo mejora sustancialmente la sensibilidad (95.2%) (7, 42). Tiene la ventaja que el criterio para definir a un animal como positivo puede ser ajustado para mejorar la sensibilidad o especificidad de la prueba. Pero sobre todo, detecta a una importante proporción de animales que escapan a la detección con la prueba intradérmica porque permite la identificación temprana de animales infectados desde los 14 días (57). Esta prueba ha sido evaluada en muchos países, apoyando la idea que puede ser considerada como una prueba diagnóstica complementaria a la prueba de la tuberculina. Sin embargo, debido a su alto costo, comparado con la prueba de la tuberculina, la necesidad de personal y equipo especializado, y a las limitaciones logísticas es difícil su aplicabilidad.

Es bien conocido que después de la inyección intradérmica del PPD se induce una supresión temporal de las respuestas de hipersensibilidad retardada hacia los antígenos micobacterianos (58); sin embargo, el efecto sobre la prueba de IFN- γ no es muy claro. Los primeros reportes indican un aumento gradual de los valores de densidad óptica (OD) en la prueba de IFN- γ entre el día 7 y 59 después de la prueba caudal (59), aunque este efecto puede variar dependiendo del formato de la prueba intradérmica empleado, y si el estudio fue realizado en animales infectados naturalmente o experimentalmente (7, 42, 53, 60).

Después de la prueba caudal en animales sensibilizados con una preparación de *M. bovis* AN5 inactivada se observó un aumento en las respuestas hacia el IFN- γ en un período de 3 a 28 días (61). Por otro lado, en animales infectados experimentalmente este aumento se observó entre 3 a 7 días después, pero esto no tuvo efecto sobre la respuesta diferencial

a la tuberculina, por lo que no hay una interferencia con la interpretación final de la prueba de IFN- γ (56). Sin embargo, en animales infectados naturalmente el incremento en la respuesta hacia el PPD bovino se observó 3 días después de la prueba caudal, y no hacia el PPD aviar como lo anteriormente reportado (55).

Respecto a la prueba cervical comparativa, los estudios en animales infectados naturalmente indican que este formato de la prueba intradérmica no aumenta o disminuye significativamente las respuestas hacia el PPD en la prueba de IFN- γ (55, 58, 62). En animales infectados experimentalmente los resultados son contradictorios, por una parte se menciona que hay una disminución en la producción de IFN- γ 3 días después de la prueba cervical comparativa (63) ; y por otro lado, se menciona un aumento en la producción de IFN- γ 7 días después de la prueba (64).

Lo anterior demuestra que los resultados obtenidos en animales infectados experimentalmente no siempre pueden validarse en infecciones naturales, por lo que hay que tener cuidado al extrapolar la información. Schiller *et al.* (53) después de analizar estos estudios concluyen que de acuerdo a los resultados obtenidos en animales infectados naturalmente, no hay evidencia de que la prueba cervical comparativa induzca un aumento o disminución en la producción de IFN- γ hacia el PPD bovino o aviar, a diferencia de la prueba caudal la cual puede inducir un aumento en la producción de IFN- γ hacia el PPD bovino 3 días después de la prueba (Figura 2-5).

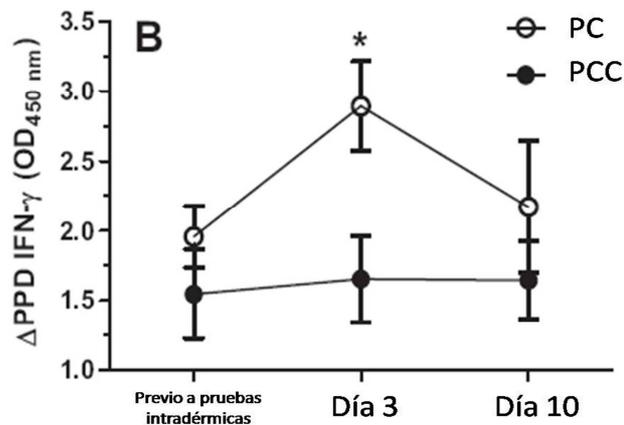


Figura 2-5. Influencia de la prueba cervical comparativa y la prueba caudal en la prueba de IFN- γ en animales infectados naturalmente con *M. bovis*. Las respuestas fueron medidas antes, 3 y 10 días después de la prueba intradérmica. Se muestran las medias de las respuestas hacia el PPD (PPD-B menos PPD-A \pm SEM) en bovinos que se les aplicó la prueba caudal (n=8) o la prueba cervical comparativa (n=15) representados como círculos blancos, o negros, respectivamente. (*P < 0.05) (PC: Prueba caudal; PCC: Prueba cervical comparativa) (Tomado y modificado de Coad, *et al.* 2010) (55).

La prueba de IFN- γ se usa en paralelo con la prueba intradérmica con el objetivo de identificar a una mayor proporción de animales infectados que escapan a la identificación con la prueba intradérmica y que pueden permanecer en el hato siendo una fuente de infección para otros animales. De la misma forma esta prueba se utiliza en algunos países como una alternativa a la prueba cervical comparativa para esclarecer el resultado de los animales reactivos a la prueba caudal. No obstante, la exposición a micobacterias ambientales compromete la especificidad de ambas pruebas, y tienen la desventaja de que no pueden detectar animales infectados en un estado de depresión de la respuesta inmune celular.

2.5.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral

2.5.2.1. Prueba de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Debido al espectro de la respuesta inmune en la tuberculosis bovina (Figura 2-4), los animales anérgicos que no son identificados con los métodos diagnósticos que evalúan la respuesta celular tienen una mayor probabilidad de presentar una enfermedad

generalizada y ser altamente infectivos, aunque una cierta proporción de estos animales pueden ser detectados por ensayos serológicos, debido principalmente al desarrollo tardío e irregular de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad (65).

A pesar de la baja sensibilidad de las pruebas serológicas, se ha observado un efecto anamnésico en el título de anticuerpos después de una prueba intradérmica, el cual está correlacionado con una mayor severidad de la enfermedad (66). Esto tiene relevancia en situaciones de prevalencia media o alta, en donde en una primera etapa se podrían seleccionar y eliminar los animales con enfermedad avanzada o anérgicos, que son la principal fuente de infección en el hato, y que pueden tener cantidades detectables de anticuerpos circulantes; y pueden no manifestar reacción a las pruebas de tipo celular.

Para la prueba de ELISA se han utilizado diferentes antígenos como el PPD, proteínas de secreción (filtrado de cultivo), así como antígenos purificados, ya sean nativos o recombinantes (33, 41, 67-69). El uso de antígenos sero-dominantes como MPB70 y MPB83 han mejorado la especificidad de la prueba, pero no la sensibilidad (67, 70-71). No obstante, ha habido varios avances en el desarrollo de nuevas técnicas, principalmente basadas en el uso de cócteles proteicos; algunos de ellos son: MAPIA (por su sigla en inglés, *multi-antigen print immunoassay*), el cual es una herramienta muy eficiente para la detección de anticuerpos a gran escala, así como para la caracterización de la respuesta serológica en el ganado y otras especies infectadas con *M. bovis* (72), fluorescencia polarizada (73), inmunoensayo de quimioluminiscencia en placas de 96 pozos (74), o en plataforma (75) que permiten la detección de anticuerpos 2 semanas después de la infección (76).

Las pruebas serológicas pueden detectar anticuerpos contra *M. bovis*, aunque relativamente baratas y simples de realizar, actualmente no son una alternativa a las pruebas establecidas para evaluar la respuesta inmune celular; sin embargo, pueden ser auxiliares para identificar infecciones crónicas.

2.5.3. Identificación del agente

2.5.3.1. Inspección sanitaria e histopatología

En áreas endémicas o de alta prevalencia se puede realizar un diagnóstico presuntivo de la enfermedad después de encontrar las lesiones sugestivas de tuberculosis bovina durante la necropsia; sin embargo, en áreas de baja prevalencia es necesario realizar una inspección detallada, junto con la colección de tejidos para su análisis histopatológico y aislamiento bacteriano.

La búsqueda de las lesiones idealmente debería realizarse en todos los tejidos listados en el Cuadro 2-2 ya que la distribución de las lesiones es muy amplia, y en zonas de baja prevalencia el 66% de los animales pueden tener una sola lesión (77).

Cuadro 2-2. Distribución de los granulomas detectados en los bovinos infectados con tuberculosis bovina (Tomado y modificado de Corner, et al. 1990) (77).

Tejido	% de lesiones detectadas
Linfonodos retrofaríngeos	29.4
Linfonodos mediastinales	28.2
Linfonodos bronquial	18
Pulmón	9.8
Linfonodos mesentéricos	2.9
Linfonodos parotídeos	2.4
Linfonodos cervicales profundos	2.4
Linfonodos inguinales superficiales	1.2

Esto puede ser una de las causas de encontrar animales reactivos a la prueba de la tuberculina sin lesiones visibles, o quizá el animal está en una etapa temprana de la infección y las lesiones son muy pequeñas para ser observadas a simple vista. Además se debe considerar que la sensibilidad de la técnica de necropsia depende del tiempo y cuidado

de la persona que realiza la inspección, la cual puede ser del 28.5% como es indicada en un estudio realizado en los Estados Unidos (78-79).

La presencia de bacterias ácido alcohol resistentes puede demostrarse microscópicamente en frotis directos de muestras clínicas y en materiales tisulares preparados. La resistencia al ácido hidroclicórico-etanol se puede demostrar con la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, aunque también puede utilizarse la tinción fluorescente de auramina-rodamina (80). El diagnóstico preliminar se puede hacer si el tejido muestra lesiones histológicas sugestivas, un centro formado por macrófagos infectados rodeados de células gigantes vacuoladas o macrófagos espumosos, los linfocitos delimitan la periferia de la estructura, la cual puede estar rodeada de colágena y otros componentes de la matriz extracelular (26).

2.5.3.2. Aislamiento bacteriano

La prueba definitiva para confirmar la infección por *M. bovis* es su aislamiento y tipificación; sin embargo, hay varios factores que influyen en el éxito del mismo, como la conservación del tejido, el procedimiento de descontaminación, el medio de cultivo y las condiciones de incubación.

Para preservar los tejidos y evitar su contaminación se utiliza borato de sodio; sin embargo, el tejido no debe permanecer más de 10 semanas en esta solución y de preferencia deber ser mantenido a 6°C, ya que a mayor tiempo la viabilidad de las micobacterias disminuye (50, 78). El proceso de descontaminación generalmente se hace con un ácido o un álcali, el reactivo ideal debe mostrar una mínima toxicidad hacia *M. bovis* pero máxima hacia otros organismos contaminantes; sin embargo, el descontaminante tradicionalmente usado, el hidróxido de sodio al 2% tiene el mayor nivel de toxicidad comparado con otros reactivos como el ácido oxálico, o el cloruro de hexadecilpiridinio, lo que puede afectar el aislamiento de la micobacteria (81).

Las micobacterias requieren medios enriquecidos para crecer, los medios usados tradicionalmente son: Stonebrink y Lowenstein-Jensen, los cuales contienen verde de malaquita al 2% para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, para diferenciar los

medios, al medio Stonebrink también se le agrega cristal violeta (82). Ambos medios de cultivo tienen la misma composición, a excepción que el glicerol es reemplazado por 0.5% de piruvato de sodio en el medio Stonebrink (83), esto permite realizar una diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ya que este último es incapaz de usar el glicerol como fuente de carbono, debido a la falta de una piruvato kinasa funcional, por lo que *M. bovis* generalmente no crece en medio Lowenstein-Jensen que solamente contiene glicerol como fuente de carbono. Los medios Middlebrook 7H10 ó 7H11 muestran una tasa de crecimiento más rápida, de 28 días, a diferencia de los 36 días con medio Stonebrink; sin embargo, estos medios son más caros y susceptibles al crecimiento de microorganismos contaminantes (78). El intervalo generacional de *M. bovis* es de 16-20 horas, por lo que los cultivos se deben incubar durante 8 semanas a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂.

En la última década ha habido un gran avance en el desarrollo de otros métodos de cultivo, el sistema BACTEC 460 fue el primer sistema semi-automático en ser comercializado, posteriormente se desarrollo un sistema totalmente automático BACTEC MGIT960, estos sistemas tienen una mayor sensibilidad que los medios sólidos y un período de detección de cultivos positivos más corto (13-15 días) y son una alternativa para el aislamiento de *M. bovis*; pero, estos métodos requieren el empleo de lectores y sistemas de incubación especializados, lo que eleva su costo (80, 84-85).

Una vez que el aislado ha sido obtenido, se pueden utilizar varias técnicas para confirmar la identidad del aislamiento basadas en la morfología de la colonia y en pruebas bioquímicas, las cuales pueden tomar hasta 4 semanas en completarse (Cuadro 2-3).

Cuadro 2-3. Características bioquímicas de algunas especies del complejo *M. tuberculosis* (Tomado y modificado de Barrera, 2007)(80).

Prueba	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BGC	<i>M. africanum</i>	<i>M. microti</i>
Morfología	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	lisa
Piruvato como fuente de carbono	-	+	+	-	-
Pirazinamidasasa	+	-	-	+	+
Niacina	+	-	-	+/-	+
Nitrato	+	-	-	+/-	-
Ureasa	+/-	-	+	+/-	+/-
Susceptibilidad a TCH	R	S	S	S	S

R= Resistente, S= Susceptible, TCH= Tiofeno-2-hidrazida del ácido carboxílico

2.5.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empieza a ser introducida en algunos laboratorios con el objetivo de facilitar la identificación de las micobacterias y otros microorganismos. Hay varios protocolos publicados para la detección por PCR de micobacterias; no obstante, parece no haber consenso en cuanto a la extracción de ADN y al método de amplificación. Se han utilizado varios iniciadores, los más comunes incluyen secuencias que amplifican el ARNr 16S, la región intergénica del ARNr 16S-23S, las secuencias de inserción IS6110, IS1801, los genes *hsp65*, *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *sodA*, los genes que codifican para las proteínas de 32 kDa y *mpb70* (86-89); de la misma forma, se han desarrollado algunos sistemas que permiten una diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* como la amplificación de un producto de 500bp, la identificación de la región RD9, y la amplificación del gen *oxyR* y *pncA* (90-91).

La mayoría de los protocolos para la detección de *M. bovis* se basan en procedimientos desarrollados en laboratorios de investigación. Otras aplicaciones han

tendido a la evaluación de kits comerciales más robustos y a veces excesivamente caros; por ejemplo, los sistemas AMPLIFIED MTD® (Gen-Probe, San Diego, Calif.) y Amplicor® (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ) que se basan en la detección del ARNr 16S. A pesar de ser sistemas que permiten la obtención de un diagnóstico más rápido, la variabilidad en la sensibilidad obtenida impide la sustitución de los métodos convencionales de aislamiento e identificación de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*, que aunque son lentos y engorrosos, siguen siendo la prueba de oro para la detección definitiva de estas bacterias.

Los factores que contribuyen a la reducción en la sensibilidad de los protocolos de amplificación actuales son en el bajo número de bacilos en las muestras clínicas, la eliminación intermitente de la bacteria, o una ineficiente extracción de ADN de la micobacteria, lo que puede ocasionar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras (42, 92).

2.6. ESAT-6 y CFP-10

Los análisis comparativos de los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv y H37Ra, así como *M. bovis* y *M. bovis* BCG han revelado cerca de 16 regiones de diferencia (RD), las cuales han sido perdidas en algunas de las cepas avirulentas. Una de estas es la región RD1, la cual tiene una longitud de 1.5 kilobases y abarca 9 genes Rv3871-Rv3879c, la falta de esta región es uno de los motivos de la atenuación de *M. bovis* BCG, ya que forma parte de un sistema de secreción especializado llamado ESX-1 o sistema de secreción VII (93), cuya función es la de permitir la secreción de las proteínas de bajo peso molecular llamadas ESAT-6 ó esxA (por su nombre en inglés, *early secreted antigenic target of 6 kDa*) y CFP-10 (por su nombre en inglés, *culture filtrate protein of 10-kDa*), también conocida como esxB ó MTS-10 (17, 94-95). De la misma forma este sistema es necesario para la secreción de las proteínas EspA (Rv3616c), EspB (Rv3881) y EspR (Rv3849) (96).

Los estudios sugieren la participación de estas proteínas en varios procesos que contribuyen en la patogénesis de la micobacteria, como la supresión de la respuesta pro-

inflamatoria, necrosis, apoptosis, formación del granuloma, arresto de la maduración del fago-lisosoma y lisis celular (95, 97-99). Están implicadas en la diseminación de la bacteria en el hospedero, estudios con peces cebra indican que los componentes del sistema de secreción ESX-1 son requeridos para dar una señal de reclutamiento y agregación a los macrófagos, con el objetivo de atraer más células al sitio de infección y promover su diseminación (99-100). Este mecanismo es el que podría pasar en los tejidos de los animales infectados, ya que se ha observado que la infección con bacterias deficientes en ESX-1 resulta en la agregación de células adyacentes a las vías aéreas, pero no en las porciones más distales del parénquima pulmonar (101).

De la misma forma, estas proteínas participan en la regulación de las funciones de los macrófagos, aumentan la producción de TNF- α e IL-12, disminuyen la expresión de la molécula co-estimuladora B7.1 (CD80), inhiben la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la unión de ESAT-6 al receptor TLR-2 en la superficie de los macrófagos y disminuyen la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), en un proceso que acelera la ruptura del H₂O₂ en H₂O y oxígeno, reduciendo el nivel de H₂O₂ en la célula (102-103).

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv tiene 5 copias de este sistema de secreción, al parecer se generaron por duplicación, en el orden ESX-4, ESX-1, ESX-3, ESX-2 y ESX-5. Sin embargo, no se conocen sus funciones, a excepción del sistema ESX-3 el cual es esencial para la captación de zinc, y ESX-5 que está relacionado con la aparición de cepas de lento crecimiento, y al parecer participa en la secreción de las proteínas PPE y PE-PGRS. Estos sistemas contienen genes que codifican proteínas de la familia CFP-10 y ESAT-6, FtsK/SpoIIIE; pero no se complementan uno a otro (93-94).

Las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son importantes antígenos inmunodominantes y esenciales para la virulencia de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (104). Como se puede observar en el Cuadro 2-4 están ausentes en todas las cepas de *M. bovis* BCG, en el complejo *M. avium* y en la mayoría de las micobacterias ambientales, lo que las hace fuertes candidatos como reactivos diagnósticos (44).

Cuadro 2-4. Distribución de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 entre las micobacterias (Tomado y modificado de Andersen, et al. 2000) (44).

Micobacteria	ESAT-6	CFP-10
Complejo <i>M. tuberculosis</i>	+	+
<i>M. bovis</i> BCG (todas las subcepas)	-	-
<i>M. abscessus</i>	-	-
Complejo <i>M. avium</i>	-	-
<i>M. branderi</i>	-	-
<i>M. celatum</i>	-	-
<i>M. chelonae</i>	-	-
<i>M. fortuitum</i>	-	-
<i>M. gordonii</i>	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	+
<i>M. malmoense</i>	-	-
<i>M. marinum</i>	+	+
<i>M. oenavense</i>	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-
<i>M. szulgai</i>	+	+
<i>M. terrae</i>	-	-
<i>M. vaccae</i>	-	-
<i>M. xenopi</i>	-	-

Los estudios sugieren que la utilización de estas proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de las mismas en la prueba de IFN- γ , mejoran la especificidad de la prueba, y permiten la diferenciación entre animales infectados con *M. bovis* o sensibilizados a la exposición por otras micobacterias como *M. avium* subsp. *paratuberculosis* o animales vacunados con *M. bovis* BCG (8, 10-11, 105-108). El mayor beneficio se observa en áreas de baja prevalencia, donde el uso de los PPDs en la prueba de IFN- γ ha demostrado tener una pobre especificidad (60).

3. ANTECEDENTES

Uno de los motivos que ha propiciado la búsqueda de antígenos específicos que mejoren la especificidad de la prueba intradérmica, ha sido el hecho de que la vacunación con *M. bovis* BCG en humanos induce reacciones intradérmicas hacia el PPD, complicando la interpretación de los resultados. Esto llevó a la purificación y caracterización de muchas proteínas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (109).

Los mayores avances se han logrado con la identificación de la región de diferencia 1 (RD1), por lo que se ha evaluado la capacidad de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 para inducir reacciones de hipersensibilidad retardada. La mayoría de los estudios se han hecho en cobayos demostrando que el uso de estos antígenos induce fuertes reacciones en animales infectados con *M. tuberculosis* y no así en los animales sensibilizados con *M. bovis* BCG o *M. avium* (13, 16, 110-113).

En humanos la proteína ESAT-6 ha mostrado ser más específica que el PPD (114), incluso una compañía farmacéutica rusa ha desarrollado una preparación llamada DIASKINTEST® formada por las proteínas ESAT-6 y CFP-10, la cual no induce reacciones en pacientes vacunados (115).

El primer reporte del uso de ESAT-6 intradérmicamente en bovinos menciona que con 400 µg de proteína es posible diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* o sensibilizados por la exposición a micobacterias ambientales (15). Posteriormente, se reportó que con el uso de un lipopéptido sintético es posible inducir reacciones intradérmicas con 100 µg de esta proteína (9).

No obstante, no se ha probado el uso del cóctel proteico ESAT-6 y CFP-10 en bovinos y debido al éxito observado en las pruebas *in vitro* se cree que su uso puede ser de gran utilidad en el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina.

4. HIPÓTESIS

La reacción de hipersensibilidad retardada será más específica y sensible en animales expuestos naturalmente a *Mycobacterium bovis* mediante la aplicación intradérmica del cóctel proteico ESAT-6 y CFP-10.

5. OBJETIVOS

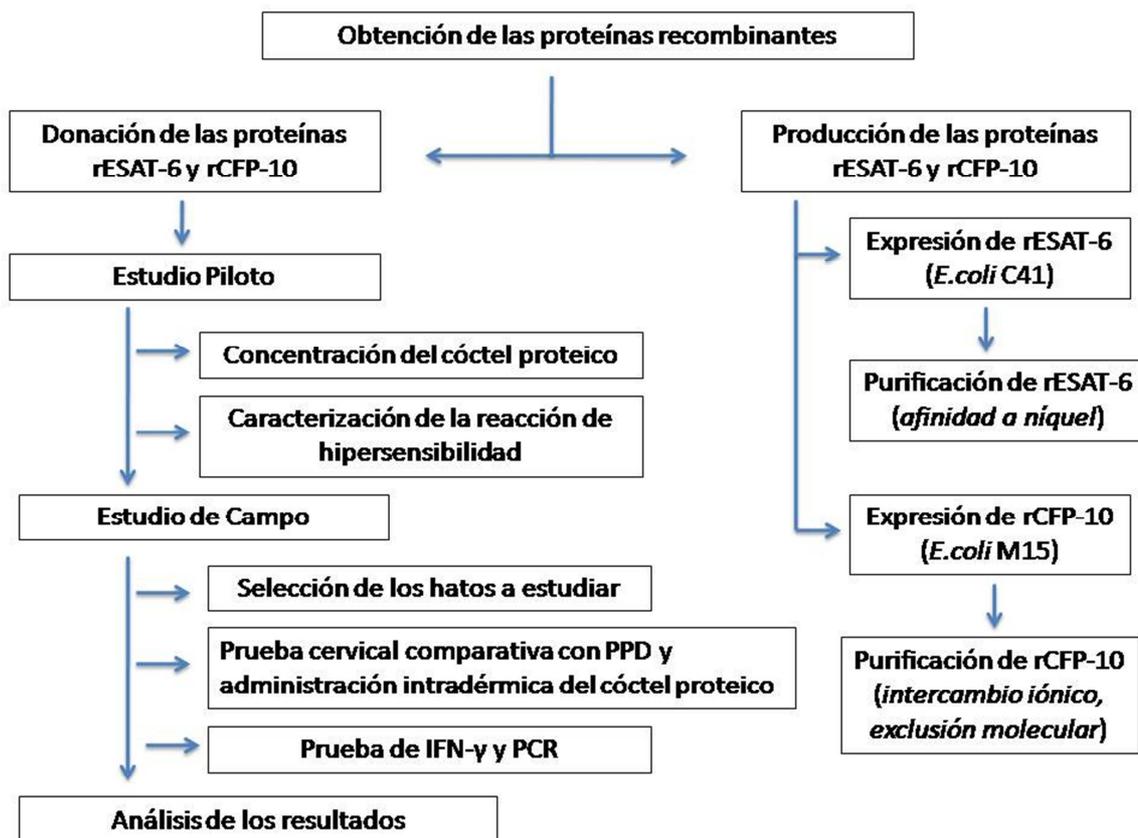
5.1. Objetivo General

Determinar la utilidad del cóctel proteico ESAT-6 y CFP-10 en el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina en animales naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis*.

5.2. Objetivos Específicos

- Producir las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10.
- Determinar la concentración del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 para el estudio *in vivo*.
- Caracterizar la reacción de hipersensibilidad retardada mediante la aplicación del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10.
- Determinar la producción de IFN- γ *in vitro* ante el cóctel proteico.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del cóctel proteico.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Producción de las proteínas recombinantes

Los genes de *M. tuberculosis* correspondientes a las proteínas recombinantes rESAT-6 y rCFP-10, están clonados en el vector de expresión pRSET y pQE32, respectivamente ambos permiten la adición de un tallo de histidina a la proteína recombinante en el extremo N-terminal, permitiendo su detección con un anticuerpo monoclonal anti-histidina y facilitando su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales.

El vector de expresión para la proteína rESAT-6 se obtuvo de un banco de plásmidos pertenecientes a la Dra. Clara Espitia, mientras que el sistema de expresión para la proteína rCFP-10 fue diseñado por el Dr. Antonio J. Vallecillo Maza del grupo de la Dra. Clara Espitia (Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM).

Se transformaron las cepas C41 y MC15 de *E. coli*. Una colonia aislada de cada construcción se sembró en caldo Luria Bertani (LB) con carbenicilina (100mg/ml) (Invitrogen, USA) se incubó a 37°C con agitación constante de 200 rpm, la inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó en la fase logarítmica intermedia del cultivo, cuya cinética de crecimiento fue previamente establecida. La sobre expresión de la proteína se realizó con 250 µM de IPTG (isopropyl-β-D-Thiogalactopuranside, Research Organics, Cleveland, USA) el cultivo se mantuvo en incubación a 37°C por 4 horas más. Pasado este tiempo el cultivo bacteriano fue centrifugado a 454 x g por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó por decantación y la pastilla se resuspendió en PBS 1x para romper a las células bacterianas mediante sonicación con 3 pulsos cada uno de 1 minuto con un minuto de descanso entre cada pulso (VirTis VirSonic 475 Cell Disrupter, USA). Los cuerpos de inclusión de la proteína ESAT-6 se lavaron 2 veces con PBS 1x-Triton X 100 al 2% y se solubilizaron con un amortiguador desnaturante por 18 horas a 4°C en movimiento suave. El material soluble se clarificó por centrifugación a 20196 x g por 15 minutos a 4°C y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -70 ° C hasta su purificación. La

proteína CFP-10 se obtuvo de forma soluble por lo que después de sonicar las bacterias la fracción soluble se almaceno en alícuotas de 1 ml a -70°C hasta su purificación.

7.1.1. Purificación por afinidad a níquel.

La purificación de la proteína recombinante ESAT-6 se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando una columna empacada con 2 ml de Ni-NTA Agarose® (Qiagen, Venlo, Netherlands). Se equilibrio con 4 ml del amortiguador desnaturalizante (50mM NaH_2PO_4 , 50mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM imidazol pH 8). Se agregaron 2 ml de la proteína a purificar y posteriormente se realizaron 5 lavados con 4 ml del amortiguador de lavado (50mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl, 8 M Urea, 10 mM imidazol pH 8). Finalmente la proteína se eluyó con 3 ml del amortiguador de elusión (50mM NaH_2PO_4 , 50mM NaCl, 8 M Urea, 500 mM imidazol pH 8).

El plegamiento de la proteína se llevó a cabo por diálisis en membranas Spectra/Por® (MWCO 3500, DAIGGER, Broadwick St. USA) contra la solución amortiguadora en concentraciones decrecientes de urea (6, 4, 3, 2, 1, 0 M) sin imidazol. Se determinó la concentración de la proteína por el método de Lowry modificado y ajustado para placas de microtitulación, haciendo alícuotas de 1 ml y almacenando a -70°C hasta su utilización.

7.1.2. Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes en geles de poliacrilamida SDS-PAGE e Inmunotransferencia.

La producción de las proteínas recombinantes se evaluó con análisis electroforético en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Las muestras de proteínas se prepararon con un volumen igual al del buffer de carga 2X, se hirvieron en baño María por 5 minutos. La separación se realizó primero a 60 volts y posteriormente a 120 volts usando una solución de tris-glicina y SDS al 1% (250 mM Tris-base y 1.91 M glicina).

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride P-Innunobilon nylonv, Millipore, CO. Bedford, Mass) a 60 volts constantes durante 1 hora, en una solución de tris-glicina (250 mM Tris-base y 1.91 M glicina) con 10% de metanol absoluto. Para evidenciar la presencia de los antígenos las membranas se tiñeron con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Boehringer Mannheim Corp. Indpls, IN USA) y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-histidina peroxidasa (HRP-anti-his₆, Roche, Indianapolis USA) en una concentración 1:200 o con un anticuerpo policlonal anti-CFP-10 en una concentración 1:4000 con PBS-Tween-20 al 0.05% BSA al 2% a 25°C en agitación suave. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween-20 al 0.05% durante 3 minutos y se reveló con 10 µl de peróxido de hidrógeno al 30% en 10 ml de PBS con 3,3-diaminobencidina BAD (SIGMA Chemical CO, St Louis, MO USA). La reacción se detuvo con agua bidestilada.

Sin embargo, debido a los diversos problemas presentados en la expresión y purificación de las proteínas recombinantes se solicitó la donación de las mismas al Dr. Martin Vordermeier del grupo de Investigación en Tuberculosis bovina, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Surrey, UK.

7.1.3. Determinación de concentración de endotoxina

Se realizó el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) (Lonza, Walkersville USA) para la cuantificación de endotoxinas en las proteínas recombinantes tal y como lo indica el fabricante. Se colocaron 15 µg de las proteínas diluidas en 50 µl de agua libre de nucleasas. Se agregaron 50 µl del lisado de amebocitos, se incubaron 10 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó el sustrato cromogénico y se dejó incubar otros 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con una solución de SDS al 10%. Las densidades ópticas se leyeron en un lector para placas de ELISA automático, utilizando el filtro de 405 nm.

Dado que el límite de endotoxinas en un producto está relacionado con su dosis máxima se utilizó el procedimiento descrito por la guía directiva de la FDA de 1987 para calcular el límite de endotoxinas (116).

El límite de endotoxina es expresado como K/M, donde:

K= 5.0 UE/Kg, representa la dosis pirogénica umbral en humanos y conejos.

M= representa la máxima dosis por Kg que puede ser administrado en un período de una hora.

En este estudio consideramos que la dosis máxima de las proteínas recombinantes que puede ser usado es de 0.1mg, entonces:

$$\text{Límite de endotoxina} = \frac{5 \text{ EU/Kg}}{0.1 \text{ mg}} = 50 \text{ UE/mg}$$

El límite de endotoxina presente en la proteínas recombinantes es de 50 UE/ mg.

7.2. Determinación de la producción de Interferón Gamma (IFN- γ)

7.2.1. Colección de sangre para estímulo celular

Se colectaron 10 ml de sangre de los animales evaluados, en tubos vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA), la muestra se tomo antes de la prueba de la tuberculina o 3 días después. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se procesaron durante las primeras 10 horas de haberse obtenido. El estímulo de los linfocitos en las muestras de sangre periférica se hizo utilizando placas para cultivo celular de 96 pozos. En cada pozo se depositaron 250 μ l de sangre, las células se estimularon por duplicado con el PPD bovino, PPD aviar y con 4 μ g de concentración final del cóctel proteico (2 μ g ESAT-6 y 2 μ g CFP-10). Como control positivo se utilizó 1 μ g de la Lectina de *Phytolacca americana* Pokewee (SIGMA Chemical CO. St Louis, MO USA). Como control negativo se uso PBS 1x estéril. Las placas se incubaron por 16 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 824 x g por 20 minutos a 4°C y se depositaron en placas de 96 pozos nuevas las cuales se almacenaron a -20°C para la posterior

evaluación de la producción de IFN- γ empleando la prueba comercial de BOVIGAM® (Pfizer Animal Health, Victoria Australia)

7.2.2. Evaluación de la producción de IFN- γ

El IFN- γ liberado en los plasmas de los cultivos, se midió usando la prueba de diagnóstico BOVIGAM® (*Mycobacterium bovis Gamma Interferon Test Kit for Cattle*, Pfizer Animal Health, Victoria Australia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas (O.D.) de las placas de IFN- γ se leyeron en un lector de placas de ELISA automático (Multiskan Ascent, THERMO) utilizando el filtro de 450 nm.

Se utilizaron los controles positivos y negativos incluidos en el kit, por duplicado en cada placa. Para la validación de la prueba se evaluaron las O.D. de los controles y se aceptó un rango del control negativo de < 0.130 y > 0.700 en el positivo. Se uso el criterio de valores de $PPD\ B - PPD\ A \geq 0.1$ y $PPD\ B - PBS \geq 0.1$ para determinar una respuesta positiva y lo contrario para una respuesta negativa. Y un valor ≥ 0.7 O.D. en las células estimuladas con Pokewee para considerar valido el análisis.

7.3. Aislamiento de ADN micobacteriano

Se recolectaron los exudados nasales de todos los animales evaluados, utilizando hisopos estériles sumergidos en 2 ml de PBS 1x estéril. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a $20196 \times g$ durante 10 minutos y los sedimentos nasales se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. Mediante un método descrito para micobacterias (117) se extrajo el ADN de los sedimentos, se homogenizó con 400 μl de TE (100mM tris-HCl, 10mM EDTA pH 8), con 50 μl de lisozima (10mg/ml) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó por 16 horas a 37°C . Posteriormente se agregaron 75 μl de SDS al 10% y 50 μl de proteinasa K (1mg/ml) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 20 minutos a 65°C . Se agregaron 100 μl de NaCl 5 M y posteriormente 100 μl de una solución de NaCl 5M con 5% de N-cetyl-N,N,N-trimetyl bromuro de amonio (CTAB) (SIGMA-Aldrich, USA) y se incubó 10 minutos a 65°C . El ADN se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (SIGMA-Aldrich, USA). El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de

isopropanol absoluto (SIGMA-Aldrich, USA) y se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas (GIBCO, Auckland, N.Z) La concentración y pureza del ADN se evaluó por espectrometría (D.O. a 260/280 nm) utilizando un espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, USA).

7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó un protocolo de PCR anidado e iniciadores previamente descritos para la amplificación de un fragmento del gen *mpb70* (118).

El PCR simple se realizó mediante la amplificación de un producto de 372 pb del gen *mpb70* con los iniciadores *mpb70* F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') y *mpb70* R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') utilizando el siguiente protocolo de amplificación, un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 45 segundos, y finalmente un ciclo de 72°C por 5 minutos. Posteriormente el PCR anidado se realizó utilizando 1 µl de la reacción anterior para amplificar un producto de 208 pb del mismo gen, utilizando los iniciadores M22 F (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCTGGGC-3') y M22 R (5'-CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC-3'). En este caso se utilizó un sistema Touchdown para la amplificación del producto debido a la amplificación de bandas inespecíficas con el protocolo propuesto. El sistema consiste en 7 ciclos iniciales a 94°C por 30 segundos y 70°C por 30 segundos, 10 ciclos con las mismas temperaturas disminuyendo 1°C cada ciclo, y 8 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y un período de extensión a 72°C por 30 segundos.

Para descartar la presencia de inhibidores del PCR y demostrar la integridad del ADN se realizó un PCR control con iniciadores específicos para amplificar un fragmento de 375 pb del gen *cyb*, que codifica el citocromo b del bovino, con los iniciadores *cyb* F (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y *cyb* R (5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'). El protocolo de amplificación es similar al PCR simple para *mpb70*, a excepción de la temperatura de alineamiento que se realizó a 58°C. Los protocolos de amplificación se realizaron con el equipo (Thermo-Hybaidd, USA).

Para la amplificación de los productos de PCR se tomaron 2 µl de ADN extraído de los exudados nasales juntos con la siguiente mezcla de reactivos en un volumen final de 25µl (Cuadro 7-1).

Cuadro 7-1. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa

Reactivo	PCR simple		PCR anidado	
	Concentración reacción	Volumen (µl)	Concentración reacción	Volumen
10X Buffer de la reacción	1X	2.5	1X	2.5
50 mM MgCl ₂	2.5 mM	1.25	1.5 mM	0.75
5 mM mezcla dNTP	200 µM	1	200 µM	1
20 µM Iniciador F	0.4 µM	0.5	0.2 µM	0.25
20 µM Iniciador R	0.4 µM	0.5	0.2 µM	0.25
Agua	-	17.05	-	19.05
ADN	-	2	-	1
5U/µl Taq DNA polimerasa	1 U	0.2	1 U	0.2

Posteriormente, una alícuota de 10 µl de cada producto de amplificación se separó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.005%) y solución TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8). El producto de la reacción fue visualizado utilizando un fotodocumentador (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, UK). Para determinar el tamaño de los segmentos amplificados se empleó un marcador de peso molecular 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA ladder ready to-use, Fermentas, USA).

7.5. Determinación de la sensibilidad del PCR simple y anidado

Con el fin de determinar la sensibilidad del método de identificación de *M. bovis* mediante PCR se inocularon experimentalmente 2 ml de PBS 1X con 1×10^6 ufc de *M. bovis* AN5. Se realizaron diluciones décuples seriadas para obtener concentraciones desde 10 bacterias hasta 1×10^5 ufc en un volumen total de 2 ml. La extracción de ADN y la reacción de PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente.

7.6. Descripción del origen de los bovinos utilizados

7.6.1. Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT)

El CAIT es una de las cuencas lecheras más importantes del país, está ubicado en el kilómetro 57 de la carretera federal México-Pachuca. En este lugar se realiza la explotación intensiva de bovinos especializados en la producción lechera de la raza Holstein. Existe evidencia clínica, patológica y bacteriológica de la presencia de *M. bovis* en esta cuenca lechera. De acuerdo a los dictámenes de pruebas existentes, el establo en el que se trabajó cuenta con una prevalencia aparente del 32% (estimado de acuerdo al última tuberculinización realizada) Los bovinos utilizados en esta investigación tienen una edad promedio de 3.5 años.

7.6.2. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en el Altiplano

Este centro ubicado en Tequisquiapan, Querétaro se dedica a la enseñanza, investigación y difusión de la producción animal a través del desarrollo de modelos prácticos productivos con bovinos, caprinos, ovinos, mediante sistemas de autogestión forrajera. El sistema de bovinos productores de leche se basa en la producción de leche en pradera mediante un esquema de pastoreo intensivo con semovientes de raza Holstein del tipo neozelandés, Jersey y la cruce de ambos, a efecto de producir leche de alta calidad, rica en sólidos. Además de la presencia de *M. bovis* (prevalencia aparente < 1%), existe la evidencia serológica de paratuberculosis en la población bovina.

7.6.3. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical

El CEIEGT se encuentra en el estado de Veracruz, en el municipio de Martínez de la Torre. Se dedica a la enseñanza, investigación y difusión de la producción ganadera tropical a través de un modelo práctico de producción de bovinos en un sistema de doble propósito, vaquillas F1 (Holstein x Cebú) para la producción de leche, ovinos de pelo y especies acuícola, con base en el aprovechamiento de los recursos tropicales, principalmente los forrajes. El hato se encuentra libre de tuberculosis y brucelosis desde el año 1994.

7.6.4. Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal

El CEPIPSA se encuentra en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan en México, D.F. En este lugar se realiza la explotación intensiva de bovinos especializados en la producción lechera de la raza Holstein. El hato se encuentra libre de tuberculosis y brucelosis; sin embargo, existe la evidencia de la presencia de paratuberculosis bovina.

7.7. Estudio Piloto

7.7.1. Animales experimentales

Para seleccionar los animales del grupo experimental, se tomaron muestras de sangre e hisopos nasales de 20 bovinos reactivos al PPD bovino, de un establo del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT). De estos animales se seleccionaron 10 que resultaron positivos al PCR y a la prueba de IFN- γ , considerándolos infectados por *Mycobacterium bovis*.

Los animales del grupo control pertenecen al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, de la FMVZ - UNAM.

7.7.2. Determinación de la concentración del cóctel proteico ESAT-6 y CFP-10 para el estudio in vivo

Para determinar la concentración del cóctel proteico a utilizar en la prueba intradérmica se diseñaron los siguientes tratamientos (Cuadro 7-2).

Cuadro 7-2. Tratamientos administrados intradérmicamente a los bovinos del grupo experimental y grupo control, en un volumen total de 0.1ml.

Tratamiento	Concentración por proteína	Concentración total
PPD aviar	-	100 µg
PPD bovino	-	100 µg
T1 (ESAT-6, CFP-10)	5 µg	10 µg
T2 (ESAT-6, CFP-10)	10 µg	20 µg
T3 (ESAT-6, CFP-10)	15 µg	30 µg
T4 (ESAT-6, CFP-10, MPB83)	10 µg	30 µg
PBS 1x	-	-

El área donde se administró los tratamientos se rasuró previamente. El sitio de aplicación superior está 10 cm debajo de la cresta y el sitio inferior aproximadamente 13 cm debajo del sitio anterior, lateralmente se dejó un espacio de aproximadamente 15 cm entre cada tratamiento. La administración intradérmica se realizó con jeringas desechables de 1ml con graduación de 0.1ml y agujas hipodérmicas desechables calibre 24 de 0.5 cm de largo (Figura 7-1).

La lectura de las reacciones se realizó cada 24 horas, durante 4 días con un vernier graduado en mm. Antes de la administración de cada tratamiento se midió el grosor de la piel. De esta forma se analizaron las respuestas intradérmicas de los animales infectados con *Mycobacterium bovis* y los animales control.

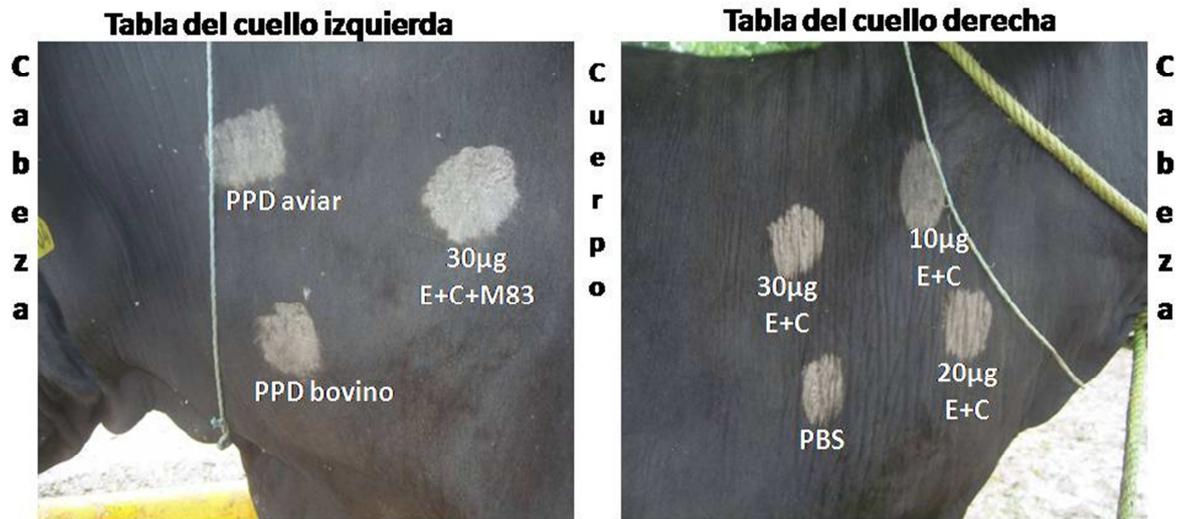


Figura 7-1. Puntos de inoculación para la evaluación de la concentración del cóctel proteico a utilizar en animales naturalmente expuestos y libres de tuberculosis bovina. Se utilizaron 4 puntos de inoculación en la tabla del cuello derecha donde se administraron 10, 20 y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y PBS como control negativo. En la tabla del cuello izquierda se inoculó el PPD bovino, PPD aviar y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10+MPB83. Todos los antígenos fueron administrados en un volumen de 0.1ml.

7.8. Estudio de campo

El número de animales a muestrear se determinó según lo recomendado por Argimon P. y Jiménez J. (119). Los autores indican que para calcular del tamaño de muestra para analizar la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica se puede emplear la fórmula de estimación de una proporción.

Por lo cual se empleó la siguiente ecuación:

$$N = \frac{Z\alpha^2 P (1 - P)}{d^2}$$

Donde:

N: número de sujetos necesarios

Z_α : valor de Z correspondiente al riesgo α fijado (1.96)

P: valor de la proporción esperada (sensibilidad 85%, especificidad 97%)¹

d: precisión con que se desea estimar el parámetro (0.05)

Al despejar la ecuación anterior para determinar cuántos animales infectados se necesitan se calcula que se necesitan 196 vacas infectadas con tuberculosis bovina.

$$N = \frac{1.96^2 (0.85)(1 - 0.85)}{0.05^2}$$
$$N = \frac{3.8416 (0.85) (0.15)}{0.0025} = 196$$

En el mismo sentido, al despejar la ecuación anteriormente mencionada para determinar cuántos animales no infectados se necesitan se determinó que se necesitan 45 vacas no infectadas con tuberculosis bovina.

$$N = \frac{1.96^2 (0.97)(1 - 0.97)}{0.05^2}$$
$$N = \frac{3.8416 (0.97) (0.03)}{0.0025} = 45$$

Sin embargo, al hacer la corrección por pérdida de muestras utilizando la ecuación:

$$N_a = N \left[\frac{1}{(1 - R)} \right]$$

¹ Los estudios *in vitro* han mostrado que el cóctel proteico (ESAT-6 y CFP-10) tiene una sensibilidad del 85% y una especificidad del 97% (10).

Donde:

N: representa el número de sujetos teórico;

N_a: el número de sujetos ajustado,

R: la proporción esperada de pérdidas (0.20)

Se estimó que se tendrían que muestrear a 245 vacas enfermas y 57 vacas sanas, con un gran total de 302 vacas.

La selección de los animales se realizó al azar de acuerdo a la disponibilidad de los mismos en los ranchos estudiados. Por lo que en cada rancho se muestrearon los siguientes animales:

Cuadro 7-3. Número de bovinos muestreados en el estudio de campo.

<i>Origen</i>	<i>Número de animales</i>	<i>Estatus del hato</i>
CAIT	138	Alta prevalencia de TB (>5%)
CEIEPAA	76	Baja prevalencia de TB (<1%), co-infección con <i>M. paratuberculosis</i>
CEIEGT	59	Libre TB
CEPIPSA	30	Libre TB, co-infección con <i>M. paratuberculosis</i>
TOTAL	303	

TB= Tuberculosis bovina

7.8.1. Tuberculinización y administración intradérmica del cóctel proteico

Para determinar la utilidad del cóctel proteico en el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis bovina, se inoculó en la tabla del cuello del bovino el PPD aviar y PPD bovino, tal y como lo indica la norma oficial mexicana para realizar la prueba cervical comparativa (50). Al mismo tiempo se inoculó la concentración del cóctel proteico determinada en el estudio piloto y PBS 1x, dejando un espacio lateralmente de aproximadamente 15 cm entre cada tratamiento (Figura 7-2).



Figura 7-2. Puntos de inoculación de los antígenos para el estudio de campo en animales naturalmente expuestos y libres de la enfermedad.

El área donde se administraron los tratamientos se rasuró previamente. La administración intradérmica se realizó con jeringas desechables de 1ml con graduación de 0.1ml y agujas hipodérmicas desechables calibre 24 de 0.5 cm de largo. La lectura de la reacción se realizó con un vernier graduado en mm, 72 horas posteriores a la inoculación. Antes de la administración de cada tratamiento se midió el grosor de la piel.

7.9. Análisis estadístico

En el estudio piloto se seleccionaron animales cuyos registros anteriores mostraban en 2 ocasiones un resultado positivo hacia el PPD bovino en la prueba intradérmica. Se considera un animal infectado con *M. bovis* aquel que cumple con este requisito y que además tuvo resultados positivos en la prueba de IFN- γ y es positivo al PCR a partir de

exudado nasal. Un animal sano o no infectado es aquel que proviene de un hato libre de tuberculosis donde las pruebas diagnosticas confirmaron este estatus. La sensibilidad y especificidad se calculó con el paquete estadístico Win Episcope 2.0 y el punto de corte se analizó con una curva ROC (por su nombre en inglés, *Receiver Operating Characteristic*) utilizando el software GraphPad Prism 5® (USA).

En el estudio de campo los animales de cada hato se seleccionaron aleatoriamente, en este caso los resultados de la prueba cervical comparativa y la prueba de IFN- γ utilizando los PPDs se compararon con los resultados obtenidos en la prueba intradérmica y la prueba de IFN- γ empleando el cóctel proteico ESAT-6 + CFP-10.

Los animales clasificados como sospechosos por la prueba cervical comparativa fueron considerados negativos en análisis de los resultados. Las diferencias entre los tratamientos se determino con la prueba Kruskal Wallis utilizando el software GraphPad Prism 5. El índice Kappa se calculo con el paquete estadístico EPIDAT 3.1. La concordancia se determino en base a la siguiente escala (119):

Concordancia	Índice Kappa
Muy baja	<0.02
Baja	0.21 a 0.40
Moderada	0.41 a 0.06
Buena	0.61 a 0.80
Muy buena	0.080

8. Resultados

8.1. Producción de las proteínas recombinantes

Se realizó una cinética de crecimiento de cada una de las cepas *E.coli* C41: pRSET-ESAT-6 y M15:pREP4 pQE32-CFP10. La fase logarítmica intermedia se alcanzó a las 3.5 horas de crecimiento que es cuando la Tasa de Crecimiento Específico (TCE) se desacelera y el Tiempo de Duplicación (TD) aumenta. Es por esto que se eligió este momento para adicionar el inductor (Figura 8-1).

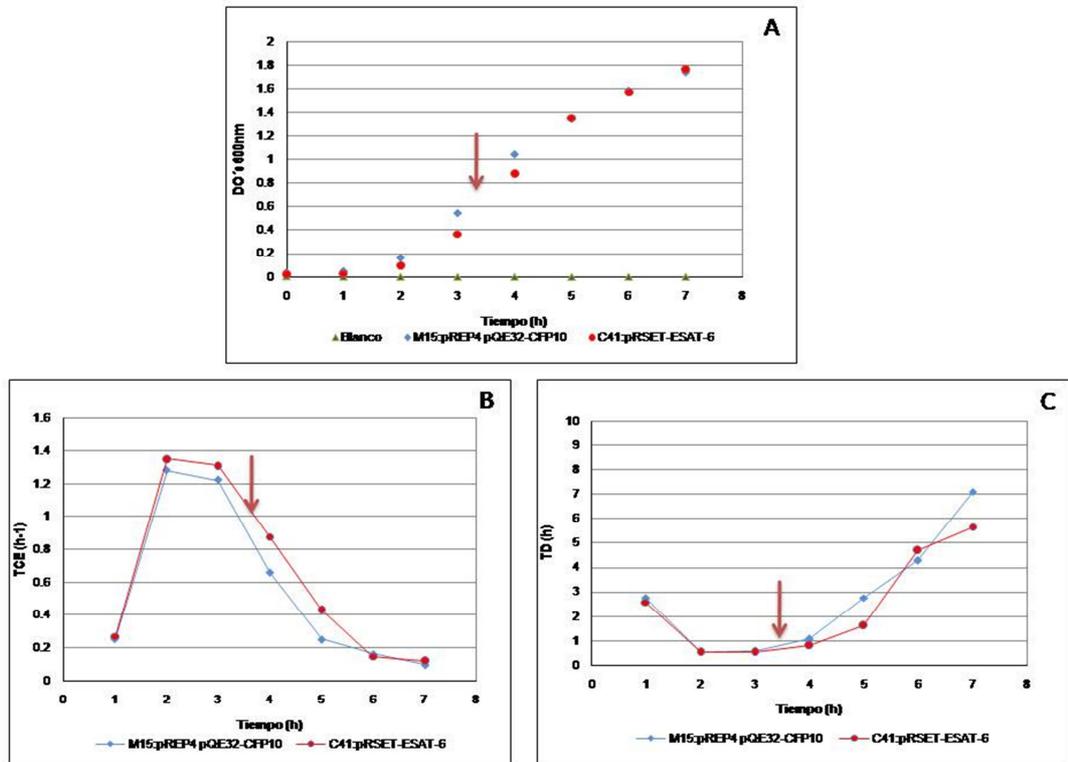


Figura 8-1. Cinética de crecimiento de la cepas de expresión *E.coli* C41: pRSET-ESAT-6 y M15:pREP4 pQE32-CFP10. A) Cinética de crecimiento de ◆ M15:pREP4 pQE32-CFP10 y ● C41: pRSET-ESAT-6 crecidas en medio líquido LB con carbenicilina (100 mg/ml). El medio de cultivo LB se utilizó como control negativo ▲ Blanco. B) Gráfica del promedio de los datos de la Tasa de Crecimiento Específico ($TCE=h^{-1}$) y C) el Tiempo de Duplicación ($TD=h$) calculados a partir de la cinética de crecimiento para cada una de las cepas recombinantes. Las flechas indican el momento en que se decidió realizar la inducción de la expresión de las proteínas.

Se evaluaron 3 concentraciones de IPTG 100, 250 y 500 μM , para la inducción de la expresión de la proteína ESAT-6, la cual se identificó mediante SDS-PAGE, su identidad se corroboró con un anticuerpo monoclonal anti-histidina. Como se observa en la Figura 8-2 la expresión de la proteína es similar entre las diferentes concentraciones de inductor, por lo que se decidió utilizar una concentración final de 250 μM de IPTG para la inducción de la expresión de la proteína ESAT-6.

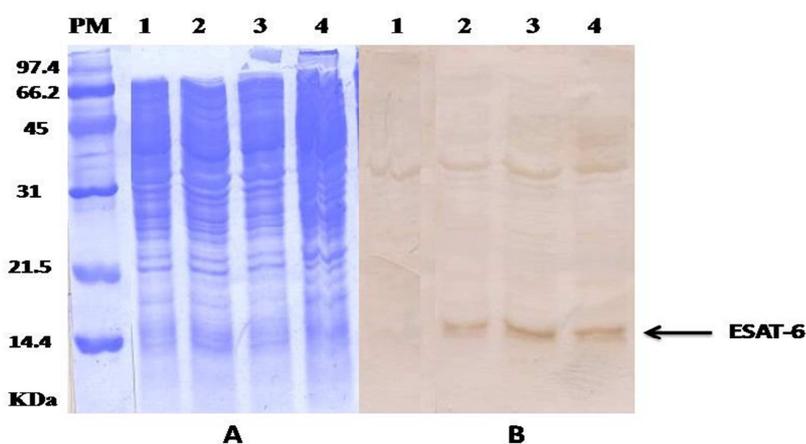


Figura 8-2. Expresión de la proteína recombinante *E. coli C41-pRSETesat6* con diferentes concentraciones de IPTG. A) La membrana de PVDF se tiñó con azul de coomassie y B) posteriormente se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-histidina (1/2000) para verificar la producción de la proteína ESAT-6 (14.4 kDa). Se indujo la expresión de la proteína con 100, 250 y 500 μM IPTG a las 3.5 hrs de cultivo (PM: *Peso molecular*, Carril: 1) *Bacteria sin inducción*, 2) *Bacteria inducida con 100 μM* , 3) *Bacteria inducida con 250 μM* , 4) *Bacteria inducida con 500 μM*). La flecha señala la proteína recombinante ESAT-6.

Se realizó un cultivo de 1 L de caldo LB con carbenicilina (100 mg/ml), la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 se indujo con 250 μM de IPTG a las 3.5 horas de crecimiento como lo previamente determinado. Después de verificar la expresión de la proteína, los cuerpos de inclusión se lavaron dos veces con una solución de PBS 1X - Triton X-100 al 2% y se solubilizaron en un amortiguador desnaturante (Urea 8M, 50mM NaH_2PO_4 , 50mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) por 18 horas en movimiento suave a 4°C (Figura 8-3).

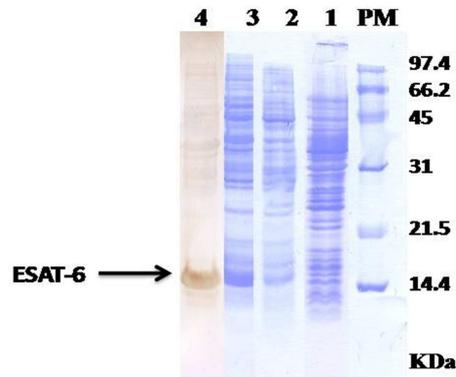


Figura 8-3. Expresión de la proteína recombinante ESAT-6 de un cultivo de 1 L de medio LB con carbenicilina (100mg/ml). La membrana de PVDF se tiñó con azul de coomassie y posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-his para verificar la producción de la proteína ESAT-6 (14.4 kDa). Se indujo la expresión de la proteína con 250 μ M IPTG a las 3.5 hrs de cultivo, se lavaron y solubilizaron los cuerpos de inclusión con Urea 8M. (PM: *Peso molecular*, Carril: 1) *bacteria con inducción*, 2) *bacteria sin inducir*, 3) *Cuerpo de inclusión*, 4) *Western blot del cuerpo de inclusión (α -his 1/2000)*. La flecha señala la proteína recombinante.

La proteína recombinante ESAT-6, se purificó por cromatografía de afinidad a metales, utilizando una columna empacada con Ni-NTA Agarosa. La proteína se unió a la columna empleando un amortiguador con 10 mM de imidazol, se hicieron varios lavados con un amortiguador con una alta concentración de cloruro de sodio (500mM) con el objetivo de contrarrestar las interacciones iónicas de proteínas contaminantes, finalmente la proteína se eluyó con 500 mM de imidazol (Figura 8-4).

La renaturalización de la proteína se hizo mediante diálisis contra la solución de equilibrio en concentraciones decrecientes de urea (6, 4, 3, 2, 1, 0 M). Al terminó se determinó la concentración de la proteína por el método de Lowry. En total se obtuvieron 9 mg de la proteína ESAT-6 pura a partir de un cultivo de 1 L.

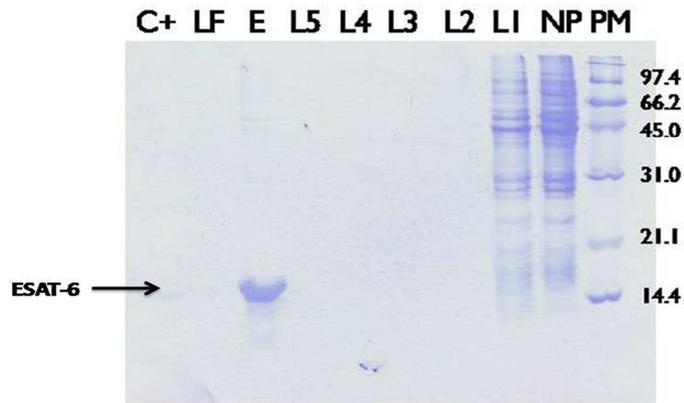


Figura 8-4. Purificación de la proteína recombinante ESAT-6. Se analizaron las 8 fracciones obtenidas, se observa que la proteína se eluye exitosamente al aplicar el buffer de elusión, no así en los lavados. (PM: Peso molecular, NP: No pegado, L1: Lavado 1, L2: Lavado 2, L3: Lavado 3, L4: Lavado 4, L5: Lavado 5, E: Elusión, LF: Lavado Final, C+: Control positivo).

En el caso de la proteína recombinante CFP-10, al inicio de este proyecto de investigación se trabajó con la cepa *E. coli* Rosseta DE3 pET15b-CFP10; sin embargo, al no tener resultados positivos (*datos no mostrados*) se decidió cambiar de sistema de expresión por el plásmido pQE32 de Qiagen®, con lo cual se logró la expresión de la proteína recombinante CFP-10. Como se mostró en la Figura 8-1 al realizar la cinética de crecimiento se determinó que la inducción de la expresión debería realizarse a las 3.5 horas de cultivo; esta se realizó con 250 μ M de IPTG. A diferencia de la proteína ESAT-6, la proteína CFP-10 se obtuvo de forma soluble (Figura 8-5). La identificación de la proteína se corroboró con un anticuerpo policlonal contra la proteína CFP-10.

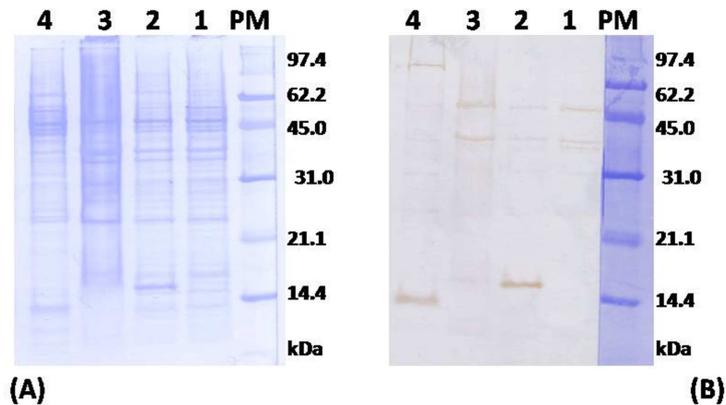


Figura 8-5. Expresión de la proteína recombinante CFP-10 de un cultivo de 1 L de medio LB con carbenicilina (100mg/ml). A) La membrana de PVDF se tiñó con azul de coomassie y B) posteriormente se incubó con un anticuerpo policlonal anti-CFP10 para verificar la producción de la proteína CFP-10 (12-14 kDa). La inducción de la expresión de la proteína se realizó con 250 μ M de IPTG a las 3.5 hrs de cultivo, la bacteria se liso para recuperar la proteína de la fracción soluble (PM: *Peso molecular, carril: 1*) bacterias no inducidas, 2) bacterias inducidas, 3) Fracción insoluble, 4) Fracción soluble. El Western blot se realizó con anticuerpos policlonales de conejo anti-CFP10 (1/4000).

El vector de expresión pQE32 permite la adición de un tallo de histidinas en el extremo N-terminal lo que permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a metales. Sin embargo, al realizar la purificación de la proteína CFP-10 se observa que no se pega a la columna de afinidad (Figura 8-6 panel A, carril 2), por lo que se decidió solubilizar la proteína con un amortiguador con Urea 4 M para exponer el tallo de histidina, pero este procedimiento tampoco tuvo éxito (Figura 8-6 panel B, carril 2). Es importante mencionar que el anticuerpo monoclonal anti-histidina no reconoce la proteína, esta solo puede ser identificada con el anticuerpo policlonal anti-CFP-10 (Figura 8-6 panel C).

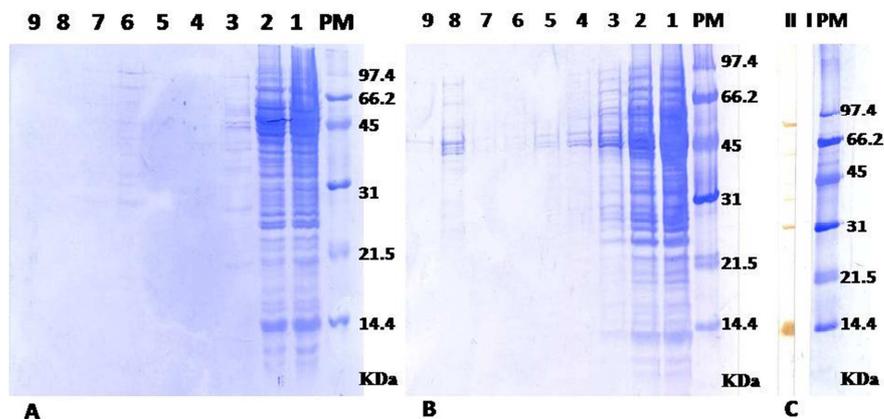


Figura 8-6. Purificación de la proteína recombinante CFP-10 mediante cromatografía de afinidad a metales. A) Membrana de PVDF teñida con Azul de Coomassie que muestra la purificación de la proteína CFP-10 en forma soluble. B) Membrana de PVDF teñida con Azul de Coomassie que muestra la purificación de la proteína CFP10 previamente solubilizada con urea 8M. C) Western blot para el reconocimiento de la proteína CFP10 con el anticuerpo monoclonal α -histidina (I) y con el anticuerpo policlonal α -CFP-10 (II). (PM: *Peso molecular, carril: 1) Muestra soluble antes de la purificación, 2) Fracción de muestra no pegada, 3-6) Fracciones del lavado, 7-8) Fracciones de elusión, 9) Fracción de lavado*).

A causa de los problemas en la expresión y purificación de las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10 se decidió solicitar la donación de las mismas al Dr. Martín Vordermeier del grupo de Investigación en Tuberculosis bovina en Reino Unido.

Antes de iniciar el estudio piloto en los bovinos, se corroboró la concentración de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y MPB83 por el método Lowry modificado y ajustado para placas de microtitulación. De la misma forma, se visualizó la pureza de las proteínas mediante un gel SDS-PAGE colocando 15 μ g de proteína (Figura 8-7).

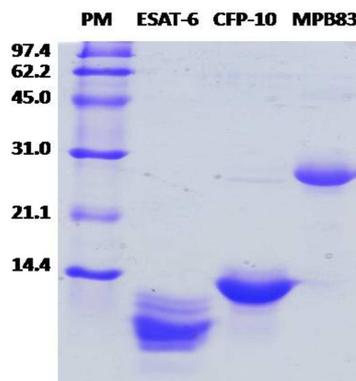


Figura 8-7. Gel SDS-PAGE 15% teñido con azul de coomassie de las proteínas donadas por el Dr. M.Vordermeir.

Se realizó el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus*, LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) para la cuantificación de endotoxinas en las proteínas recombinantes. Cuya concentración se muestra en el Cuadro 8-1.

Cuadro 8-1. Concentración de endotoxina en las proteínas recombinantes donadas por el Dr. M. Vordermeier.

Proteína	Endotoxina (UE/ml)
ESAT-6	1.28
CFP-10	1.18
MPB83	1.05
PBS 1 X	0.48

De acuerdo al cálculo del límite de endotoxinas (50 UE/mg) (116), la concentración de endotoxina presente en las proteínas recombinantes es mínima, por lo que el efecto observado en los siguientes estudios no se verá alterado por este factor.

8.2. Estudio Piloto

8.2.1. Prueba de IFN- γ

Se seleccionaron 20 bovinos, los cuales fueron reactivos al PPD bovino en dos pruebas consecutivas. Al realizar la prueba de IFN- γ , 7 de los 20 animales resultaron negativos en la prueba con el PPD bovino.

Para determinar una respuesta positiva o negativa hacia el cóctel proteico en la prueba de IFN- γ se realizó una curva ROC con los resultados de los 20 animales provenientes del hato infectados y de los 10 animales provenientes del hato libre de tuberculosis. Con esto se evaluó el efecto del punto de corte en la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFN- γ utilizando el cóctel proteico. El punto de corte elegido para el cóctel proteico es de 2 ODIs (Índices de Densidad Óptica), lo que concuerda con lo anteriormente reportado (Cuadro 8-2) (10).

Cuadro 8-2. Efecto del punto de corte en la prueba de IFN- γ al cóctel proteico para identificar correctamente animales infectados o no de tuberculosis bovina.

<i>Punto de corte (ODIs*)</i>	<i>Sensibilidad %</i>	<i>Especificidad %</i>
≥ 1.0	85	60
≥ 2.0	65	100
≥ 3.0	50	100

*ODIs (Índices de densidad óptica= OD Cóctel proteico/ OD sin antígeno)

8.2.2. PCR

A partir del DNA genómico de los exudados nasales de las vacas infectadas y sanas se realizó el PCR simple de *mpb70* para verificar la presencia o ausencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Solamente se amplificaron los productos esperados en las muestras de los animales infectados, no así en los animales sanos (Figura 8-8).

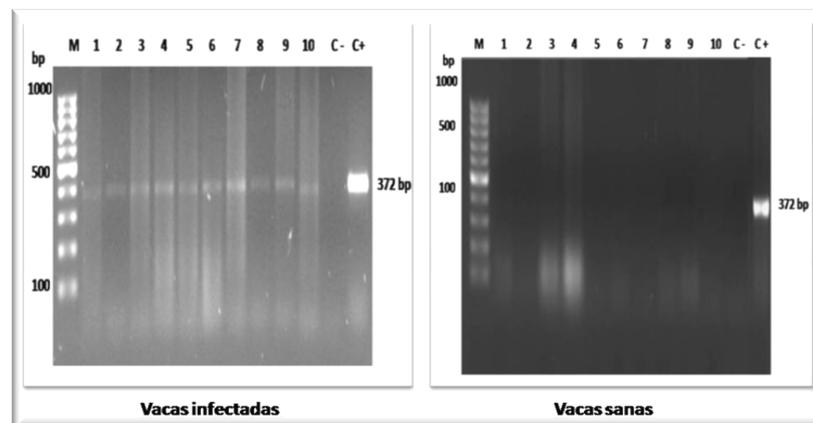


Figura 8-8. Resultados del PCR simple para *mpb70* en muestras de exudado nasal de las vacas infectadas con *M. bovis* y de las vacas no infectadas. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular de 100bp, carriles identificados 1 al 10 el producto de la amplificación de 372bp del gen *mpb70* de las vacas empleadas en el estudio piloto.

Para la evaluación intradérmica del cóctel proteico solamente se utilizaron 10 animales de los 20 previamente seleccionados, debido a que fueron PCR positivos y tuvieron resultados positivos hacia el PPD bovino en la prueba de IFN- γ .

8.2.3. Prueba de hipersensibilidad retardada

En las pruebas intradérmicas el PPD es usado a una concentración de 100 μg , pero la dosis óptima para un cóctel proteico formado por 2 pequeñas proteínas puede ser diferente, por lo que se inocularon 3 concentraciones diferentes del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en cada animal: 10, 20 y 30 μg . Así como 30 μg del cóctel ESAT-6+CFP-10+MPB83. De la misma forma, las reacciones se midieron cada 24 horas durante 4 días para evaluar la cinética de respuesta a dichas concentraciones. La respuesta a los antígenos alcanzó su pico máximo a las 72 horas, como lo clásicamente determinado. Los animales infectados respondieron fuertemente al PPD bovino, pero las respuestas a las diferentes concentraciones del cóctel proteico fueron significativamente menores. La concentración del cóctel proteico con la que se observaron mejores respuestas fue con 20 μg del cóctel ESAT-6+CFP-10 (Figura 8-9).

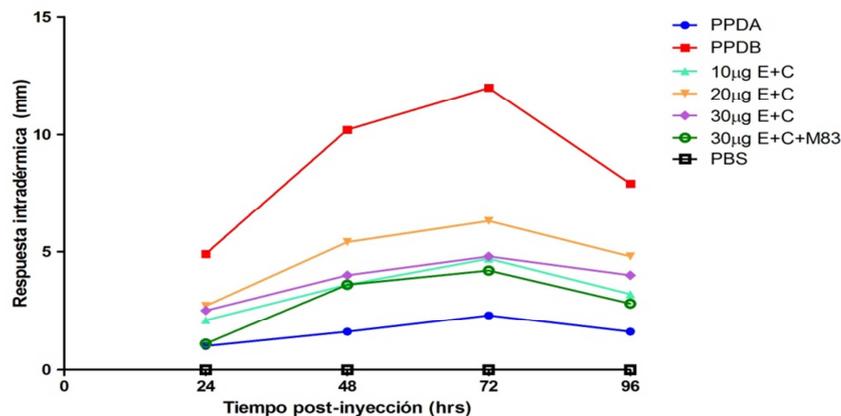


Figura 8-9. Cinética de la respuesta intradérmica a los antígenos PPDB, PPDA, y a las diferentes concentraciones del cóctel proteico, en los animales infectados con *M. bovis*. Los resultados están representados como incremento en el grosor dérmico cada 24 horas (lectura final-lectura inicial)

La mediana en la respuesta intradérmica con 20 μg del cóctel E+C a las 72 horas fue de 4.5mm, comparados con los 12.5mm vistos en las reacciones con PPD bovino. La mediana de la respuesta al tratamiento con 30 μg del cóctel E+C+M83, que incluye 10 μg

de cada proteína fue de 4.0 mm, el empleo de la proteína MPB83 no mejoró la respuesta intradérmica y macroscópicamente la induración es menos definida (Figura 8-10).

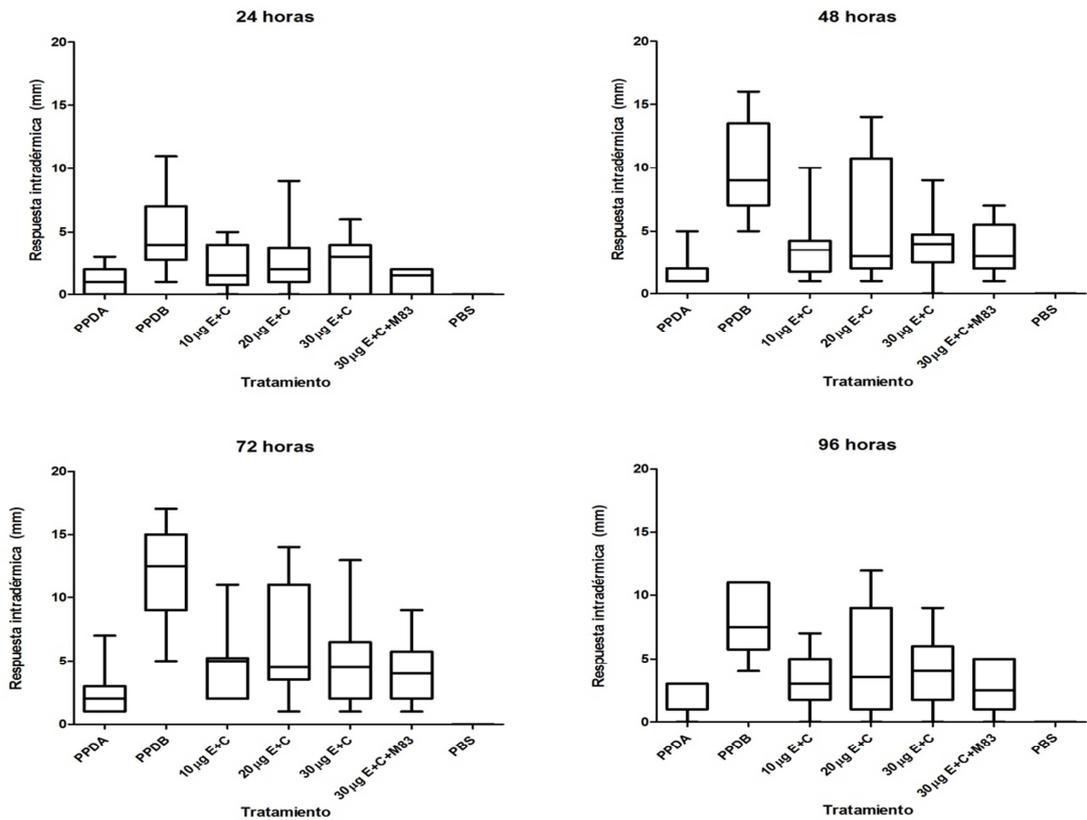


Figura 8-10. Respuestas intradérmicas a los antígenos PPDB, PPDA y a los 10,20 y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y a los 30 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10+MPB83 en los animales infectados con *M. bovis* a las 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación. Los resultados están expresados como la diferencia en el incremento del grosor dérmico entre la lectura final e inicial. La caja señala los valores comprendidos entre el cuartil 1 y 3 (percentil 25 y 75, respectivamente), la línea central de su interior es el cuartil 2 (percentil 50 ó mediana). Por fuera de la caja las líneas superiores e inferiores indican los valores máximos o mínimos, respectivamente.

Los animales sanos respondieron débilmente al PPD bovino y a las diferentes concentraciones del cóctel proteico, habiendo mayores respuestas hacia el PPD aviar. La mediana en la respuesta intradérmica al PPD aviar fue de 2.0 mm, comparado con los 1.0mm del PPD bovino. Las diferentes concentraciones del cóctel proteico tuvieron poco incremento en el grosor dérmico siendo la máxima respuesta de 0.5mm a las 72 horas con 10µg del cóctel E+C (Figura 8-11).

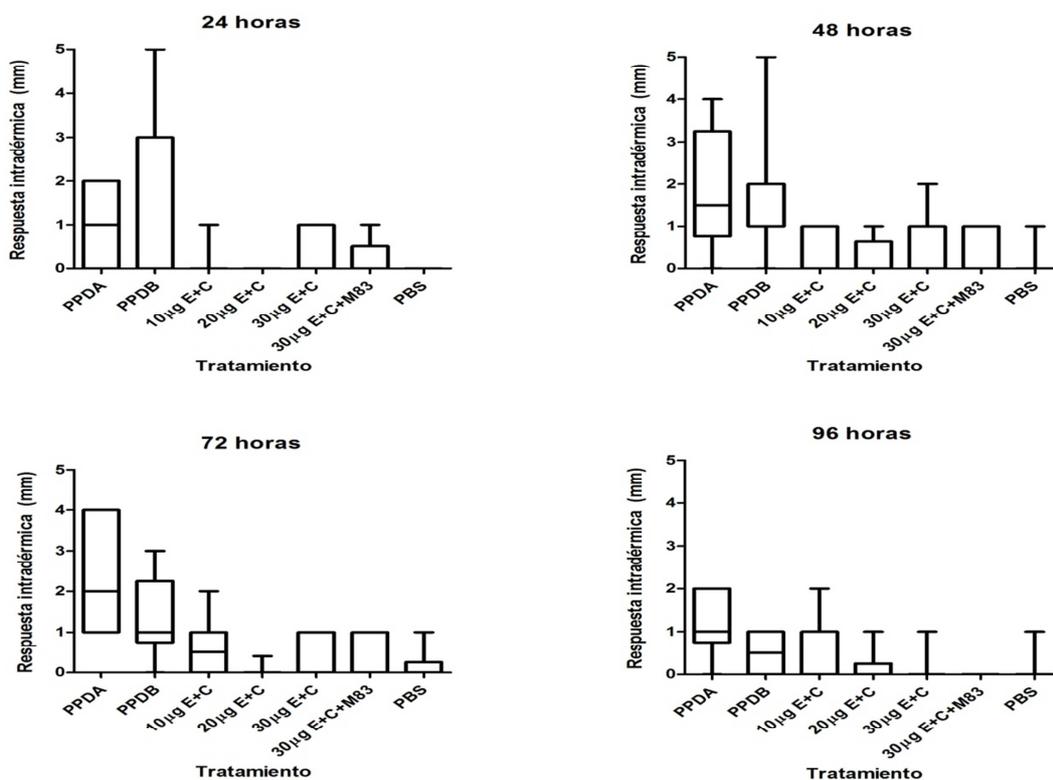


Figura 8-11. Respuestas intradérmicas a los antígenos PPDB, PPDA y a los 10, 20 y 30µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y a los 30 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10+MPB83 en los animales libre de tuberculosis bovina a las 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación. Los resultados están expresados como la diferencia en el incremento del grosor dérmico entre la lectura final e inicial. La caja señala los valores comprendidos entre el cuartil 1 y 3 (percentil 25 y 75, respectivamente) y la línea central de su interior es el cuartil 2 (percentil 50 ó mediana). Por fuera de la caja las líneas superiores e inferiores indican los valores máximos o mínimos, respectivamente.

Al comparar las respuestas intradérmicas a las 72 horas de los animales enfermos y sanos (Figura 8-12), se puede observar que los animales infectados responden más fuertemente al PPD bovino y al cóctel proteico, a diferencia de los animales no infectados quienes responden principalmente hacia el PPD aviar. La concentración del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 que mostró una mejor respuesta fue con 20 µg de proteína total con una mediana de 4.5 mm en animales enfermos, la cual no indujo respuestas en los animales sanos.

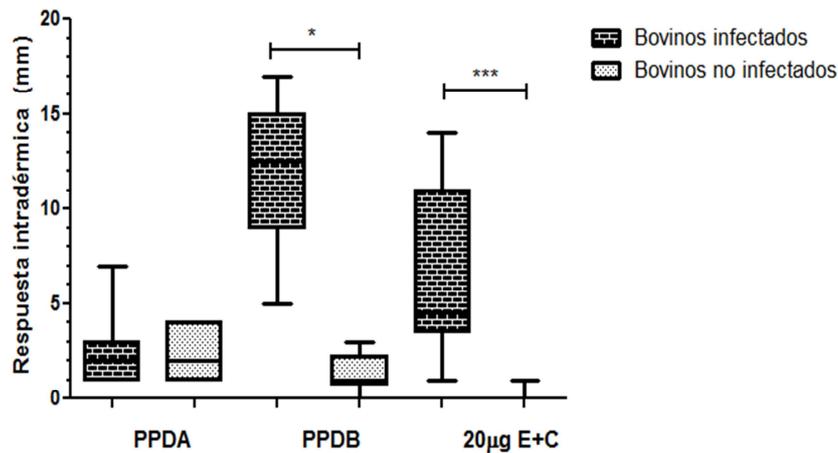


Figura 8-12. Comparación de las respuestas intradérmicas a las 72 horas hacia los antígenos PPDB, PPDA y 20µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en los animales infectados o no con tuberculosis bovina. Los resultados están expresados como la diferencia en el incremento del grosor dérmico entre la lectura final e inicial. La caja señala los valores comprendidos entre el cuartil 1 y 3 (percentil 25 y 75, respectivamente) y la línea central de su interior es el cuartil 2 (percentil 50 ó mediana). Por fuera de la caja las líneas superiores e inferiores indican los valores máximos o mínimos, respectivamente. La diferencia estadística entre las respuestas fue determinada con la prueba de Kruskal Wallis (*P <0.05, ***P<0.001).

La Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) indica que el resultado de los valores obtenidos al PPD bovino y PPD aviar se deben de graficar, el punto de intersección indica el resultado de la prueba y de acuerdo a la gráfica oficial se interpreta el resultado como reactor, negativo o sospechoso. Sin embargo, en el caso del uso del cóctel proteico de forma intradérmica no hay un parámetro para determinar a un animal como infectado o no, por lo cual se realizó una curva ROC de los valores obtenidos al cóctel proteico y determinar el punto de corte a estos antígenos.

La curva ROC se realizó con los resultados obtenidos con el tratamiento 2. Se observa que con un incremento de 1.0 mm se obtiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% (Cuadro 8-3).

Cuadro 8-3. Efecto del punto de corte al cóctel proteico en la prueba intradérmica para identificar correctamente animales infectados o no de tuberculosis bovina.

<i>Punto de corte (mm)</i>	<i>Sensibilidad %</i>	<i>Especificidad %</i>
≥ 0.5	100	90
≥ 1.0	95	100
≥ 1.5	90	100
≥ 3.0	80	100
≥ 4.5	50	100

8.3. Estudio de campo

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio piloto, se decidió realizar el estudio de campo empleando 20 µg del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 realizando la lectura de la reacción a las 72 horas y utilizando como punto de corte un incremento ≥ 1.0 mm para determinarla como una reacción positiva hacia el cóctel proteico. En el caso de la prueba de IFN-γ se consideró una respuesta positiva hacia el cóctel proteico un índice ≥ 2.0 ODIs.

8.3.1. Respuesta *in vitro* hacia el cóctel proteico

La respuesta *in vitro* hacia el PPDB, PPDA y cóctel proteico muestra una correlación con la prevalencia de la enfermedad, siendo las respuestas mayores en alta prevalencia. El índice de respuesta hacia el PPDB fue significativamente mayor en el hato de alta prevalencia (Me= 2.39 ODIs) a diferencia de la mediana en el índice de respuesta en el hato con baja prevalencia (Me= 1.06 ODIs) (P<0.001). La mediana en el índice de respuesta hacia el PPDA en alta prevalencia fue de 1.71 ODIs, a diferencia los 1.18 ODIs del hato de baja prevalencia (P<0.001). De la misma forma, los índices de respuesta hacia el cóctel proteico fueron significativamente mayores en hatos de alta prevalencia (Me= 1.95 ODIs) en comparación con el hato de baja prevalencia (Me=1.3 ODIs) (P<0.001). (Figura 8-13 panel A).

En los hatos libres la mediana en el índice de respuesta hacia el PPDB (1.64 y 1.02 ODIs) y PPDA (1.82 y 1.2 ODIs) con o sin presencia de MAP, respectivamente, fue mayor en el hato sin la infección con paratuberculosis ($P < 0.01$). En ambos hatos el índice de respuesta hacia el cóctel proteico no fue significativamente diferente ($Me = 1.074$ y 0.98 ODIs con o sin presencia de MAP, respectivamente) ($P > 0.05$). (Figura 8-13 panel B).

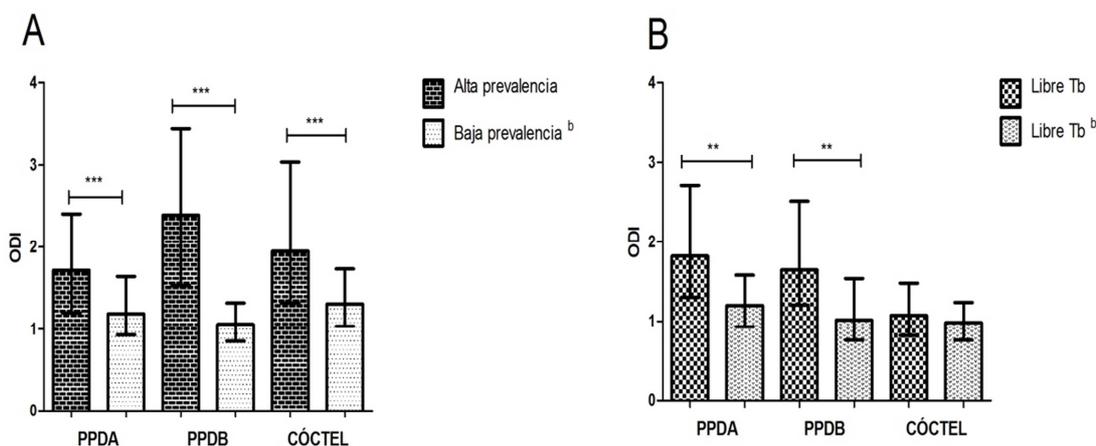


Figura 8-13. Efecto de la prevalencia en el índice de respuesta *in vitro* hacia el PPDB, PPDA y cóctel proteico mediante la prueba de IFN- γ . Los resultados están representados como medianas con rango intercuartil (barras) (ODIs = OD muestra/OD PBS control). Se considera hato con alta prevalencia $>5\%$, y hato con baja prevalencia $<1\%$. ^b Hato con co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. La diferencia estadística entre las respuestas fue determinada con la prueba de Kruskal Wallis (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

8.3.2. Respuesta *in vivo* hacia el cóctel proteico

Para evaluar el potencial del cóctel proteico se analizó la respuesta intradérmica inducida bajo diferentes prevalencias de la infección, así como la influencia de la co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Se estudiaron 2 hatos infectados con *M. bovis* con alta o baja prevalencia, este último con co-infección con MAP; de la misma forma se estudiaron 2 hatos control libres de tuberculosis bovina, uno de ellos con presencia de MAP.

La respuesta intradérmica hacia los antígenos PPDB, PPDA y cóctel proteico fueron mayores en el hato de alta prevalencia a tuberculosis bovina, el PPDB indujo las mayores respuestas ($Me = 9.5$ mm) (Figura 8-14 panel A).

En el hato de baja prevalencia las respuestas intradérmicas hacia el PPDB y PPDA fueron similares (Me= 1.0 mm), lo que puede ser causado por la co-infección con MAP (Figura 8-14 panel A).

En los hatos libres de tuberculosis las mayores respuestas se observaron hacia el PPDA, siendo mayores en el hato con co-infección con MAP. No se observaron respuestas hacia el cóctel proteico en los hatos libres de tuberculosis bovina, a pesar de la presencia de MAP (Figura 8-14 panel B).

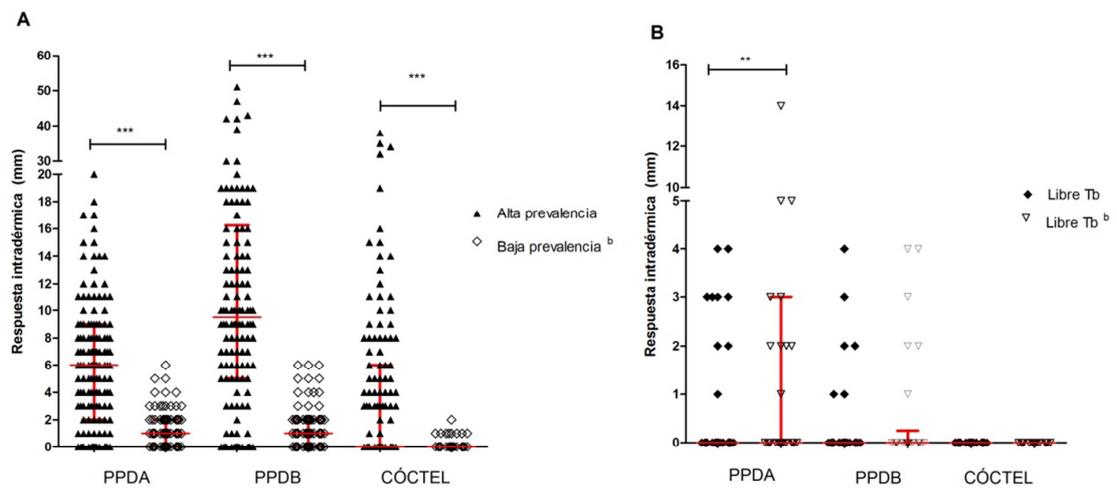


Figura 8-14. Respuestas intradérmicas hacia los antígenos PPDB, PPDA y cóctel proteico. A) Respuestas intradérmicas hacia los antígenos PPDB, PPDA y cóctel proteico en hatos con alta (▲) y baja prevalencia (◇) a tuberculosis bovina. Se considera hato con alta prevalencia >5%, y hato con baja prevalencia <1%. B) Respuestas intradérmicas hacia los antígenos PPDB, PPDA y cóctel proteico en hatos libres de tuberculosis bovina con (▽) o sin (◆) presencia de MAP. Los resultados están expresados como la diferencia en el incremento del grosor dérmico entre la lectura final e inicial. Las barras rojas representan las medianas y rango intercuartil. La diferencia estadística entre las respuestas fue determinada con la prueba de Kruskal Wallis (**P<0.01, ***P<0.001).

^b Hato con co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

8.3.3. Evaluación del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en la prueba de IFN- γ en el diagnóstico de la tuberculosis bovina

Se compararon los resultados de la prueba cervical comparativa (PCC) y los índices de respuesta inducidos hacia el cóctel proteico y hacia el PPD (PPDB-PPDA) en la prueba de IFN- γ .

En el hato de alta prevalencia de tuberculosis bovina con la prueba cervical comparativa hubo 45.6% de reactivos (63/138), 21% de animales negativos (29/138) y 33.3% de animales sospechosos (46/138). Sin embargo, para el análisis de los resultados los animales sospechosos fueron considerados negativos a la prueba cervical comparativa, teniendo así 54.3% (75/138) de animales negativos a la PCC.

Con el empleo del PPD en la prueba de IFN- γ 90 animales fueron clasificados como positivos, de los cuales 56 fueron reactivos a la PCC y 34 fueron negativos a la PCC. 48 animales fueron negativos en la prueba de IFN- γ , 7 de ellos fueron reactivos a la PCC y 41 fueron negativos a la PCC. La concordancia por índice Kappa fue moderada ($K=0.421$, $P<0.001$) (Figura 8-15 panel A).

Por otra parte, con el empleo del cóctel proteico en la prueba de IFN- γ 73 animales fueron clasificados como positivos, de los cuales 44 fueron reactivos a la PCC y 29 fueron negativos a la PCC. 65 animales fueron negativos en la prueba de IFN- γ , 19 de ellos fueron reactivos a la PCC y 46 fueron negativos a la PCC. La concordancia por índice Kappa entre las pruebas fue baja ($K=0.308$, $P<0.001$) (Figura 8-15 panel B).

Al comparar los índices Kappa obtenidos se observa que no hay diferencia estadística al utilizar el PPD o el cóctel proteico en la prueba de IFN- γ en hatos con alta prevalencia a tuberculosis bovina ($Kappa\ global= 0.372$, $P=0.287$).

	Prueba Cervical Comparativa			Total
		+	-	
IFN- γ (PPD)	+	56	34	90
	-	7	41	48
Total		63	75	138

A

	Prueba Cervical Comparativa			Total
		+	-	
IFN- γ (Cóctel)	+	44	29	73
	-	19	46	65
Total		63	75	138

B

Figura 8-15. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba de IFN- γ empleando el PPD (A) o el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 (B) en el hato con alta prevalencia a tuberculosis bovina. PPD= (PPDB-PPDA).

En el hato de baja prevalencia de tuberculosis bovina con el uso del PPD en la prueba de IFN- γ se detectó 5 animales positivos, de los cuales 1 fue reactor a la PCC ($K=0.318$, $P<0.001$). En cambio, al emplear el cóctel proteico en la prueba de IFN- γ se detectaron 15 animales positivos los cuales fueron negativos a la PCC ($K= -0.025$, $P=0.620$) (Figura 8-16).

Al comparar los índices Kappa obtenidos se observa que la concordancia es muy baja al utilizar el PPD o el cóctel proteico en la prueba de IFN- γ en hatos de baja prevalencia a tuberculosis bovina (Kappa global= - 0.0217, $P=0.159$).

	Prueba Cervical Comparativa			Total
		+	-	
IFN- γ (PPD)	+	1	4	5
	-	0	71	71
Total		1	75	76

A

	Prueba Cervical Comparativa			Total
		+	-	
IFN- γ (Cóctel)	+	0	15	15
	-	1	60	61
Total		1	75	76

B

Figura 8-16. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba de IFN- γ empleando el PPD (A) o el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 (B) en el hato de baja prevalencia a tuberculosis bovina con co-infección con MAP. PPD = (PPDB-PPDA).

8.3.4. Evaluación del cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en la prueba intradérmica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina

Al analizar los resultados de la prueba cervical comparativa (PCC) y el cóctel proteico empleado de forma intradérmica en el hato con alta prevalencia 63 animales respondieron positivamente hacia el cóctel proteico, de los cuales 48 fueron reactores a la PCC y 15 fueron negativos a la PCC. Es importante mencionar, que 14 de estos animales fueron clasificados como sospechosos a la PCC y uno fue animal catalogado como negativo (Cuadro 8-4). Es decir se identificaron 11% (15/138) animales más que no fueron identificados con la PCC (Figura 8-17 panel A), lo que sugiere un aumento en la sensibilidad en la prueba intradérmica usando el cóctel proteico. La concordancia entre las pruebas fue moderada ($K=0.561$, $P<0.001$).

En el hato de baja prevalencia, con la PCC solo se detectó un animal reactor, mientras que con el cóctel proteico se detectó 8 animales infectados los cuales no fueron identificados por la PCC. (3 de estos animales fueron clasificados como sospechosos por la PCC, Cuadro 8-4) La concordancia entre las pruebas fue nula ($K= -0.0240$, $P=0.729$) Figura 8-17 B).

Al comparar los índices Kappa obtenidos se observa que no hay concordancia al utilizar el cóctel proteico de forma intradérmica entre hatos de alta y baja prevalencia a tuberculosis bovina ($Kappa\ global= 0.0259$, $P<0.001$).

	Prueba Cervical Comparativa					Prueba Cervical Comparativa			
		+	-	Total			+	-	Total
Cóctel intradérmico	+	48	15	63	Cóctel intradérmico	+	0	8	8
	-	15	60	75		-	1	67	68
	Total	63	75	138		Total	1	75	76

A **B**

Figura 8-17. Concordancia entre la prueba cervical comparativa y la prueba intradérmica empleando el PPD el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 en el hato de alta (A) o baja (B) prevalencia a tuberculosis bovina con co-infección con MAP.

En el Cuadro 8-4 se resume el número de animales identificados por el cóctel proteico en la prueba de IFN- γ o en forma intradérmica, los cuales no fueron identificados por la prueba cervical comparativa en hatos de alta y baja prevalencia a tuberculosis bovina.

Cuadro 8-4. Número de animales detectados con el uso del cóctel proteico en forma intradérmica y en la prueba de IFN- γ , en animales sospechosos y negativos determinados por la prueba cervical comparativa en hatos del alta y baja prevalencia.

<i>Prevalencia</i>	<i>Prueba Cervical Comparativa</i>	<i>n</i>	<i>IFN-γ (%)</i>	<i>Prueba intradérmica (%)</i>
Alta	Sospechoso	46	20	14
	Negativo	29	9	1
	Total		29 (39)	15 (20)
Baja	Sospechoso	10	4	3
	Negativo	65	11	5
	Total		15 (20)	8 (11)

8.3.5. Uso del PCR a partir de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina

En el presente estudio se tomaron muestras de exudado nasal de todos los bovinos analizados con el objetivo de evaluar su uso y el efecto que tiene sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

En el hato de alta prevalencia con el uso aditivo del protocolo de PCR a partir de exudado nasal es posible identificar 38 animales más que no son identificados por las pruebas intradérmicas (27.5%), quedando solamente 16 animales sospechosos (11.5%) y 7 animales negativos a estas pruebas, debido quizá a un estado anérgico de la infección. De los 48 animales que respondieron positivamente hacia los 2 antígenos en la prueba intradérmica, 30 fueron PCR positivos. Por otra parte, de los 63 reactores al cóctel proteico intradérmico, 40 fueron PCR positivos. Una proporción similar en los reactores al PPD se confirmaron por PCR (38/63) (Figura 8-18 panel A).

Al analizar el diagnóstico con el uso de la PCC e IFN- γ con los PPDs se observa que con el PCR es posible identificar un 14.5% (20/138) más animales que no son identificados con estas pruebas. Mientras que 34 (24.6%) animales tuvieron respuestas positivas en las 3 pruebas (Figura 8-18 panel B).

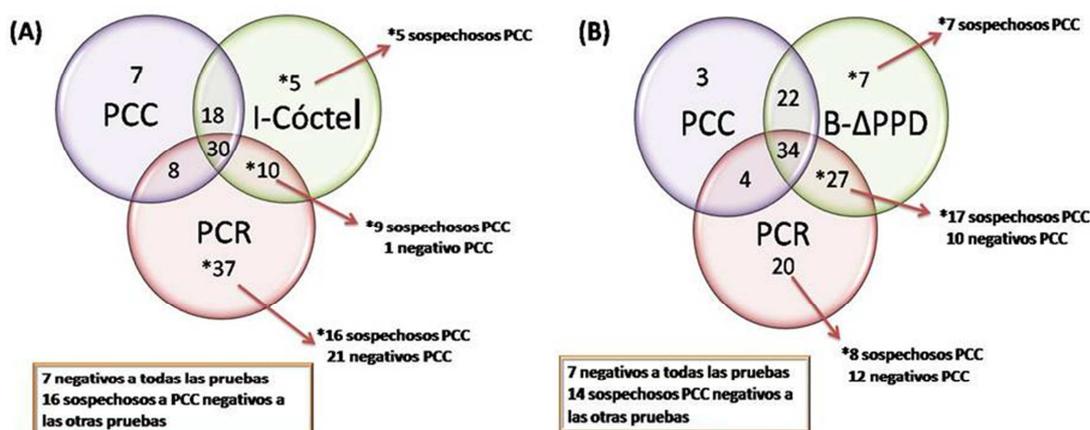


Figura 8-18. Diagramas de Venn que muestran el efecto aditivo del uso del PCR a partir de la extracción de ADN de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el hato de alta prevalencia (n= 138). (A) Se muestra la relación de los resultados de la prueba cervical comparativa (PCC), el cóctel proteico intradérmico (I-Cóctel) y el PCR. (B) Relación de los resultados a la prueba cervical comparativa (PCC), prueba de IFN- γ con Δ PPD (B-PPDB) y PCR.

En el hato de baja prevalencia con el primer método diagnóstico propuesto, es decir, con la PPC y cóctel proteico intradérmico el uso del PCR nos permite identificar 22 animales más, mientras que el segundo método (PCC y prueba de IFN- γ con PPD) nos permitiría identificar 28 animales más. En este caso, se puede observar que con el empleo intradérmico del cóctel proteico es posible identificar a un mayor número de animales, a diferencia del empleo del PPD en la prueba de IFN- γ (Figura 8-19).

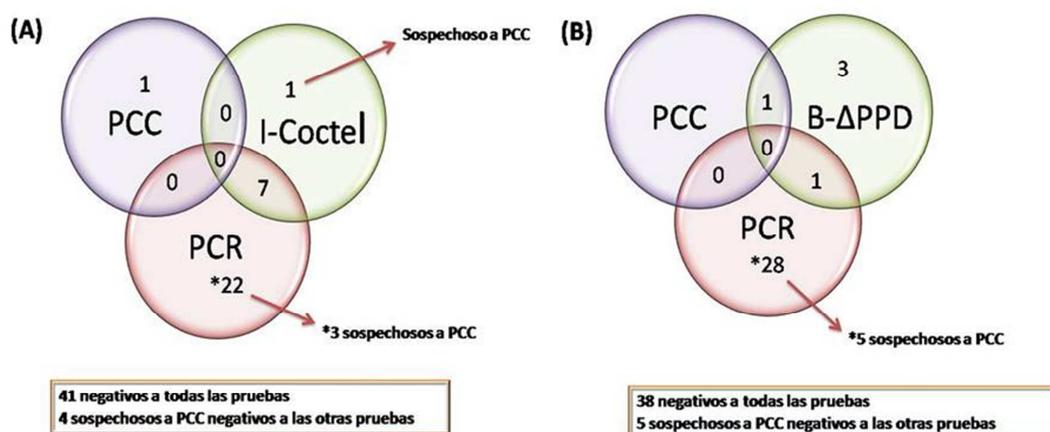


Figura 8-19. Diagramas de Venn que muestran el efecto aditivo del uso del PCR a partir de la extracción de ADN de exudado nasal en el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el hato de baja prevalencia. (n=76) (A) Se muestra la relación de los resultados de la prueba cervical comparativa (PCC), el cóctel proteico intradérmico (I-Cóctel) y el PCR. (B) Relación de los resultados a la prueba cervical comparativa (PCC), prueba de IFN- γ con Δ PPD (B-PPDB) y PCR.

8.3.6. Evaluación del cóctel proteico en bovinos libres de la infección con *M. bovis* y la influencia de la infección por *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

En la Figura 8-20 se muestra que el cóctel proteico no induce respuestas intradérmicas en animales no infectados, a pesar de la infección con MAP, a diferencia del uso de los PPDs. La mayor respuesta en estos hatos fue hacia el PPDA, siendo más evidente la respuesta hacia este antígeno en el hato con infección con paratuberculosis.

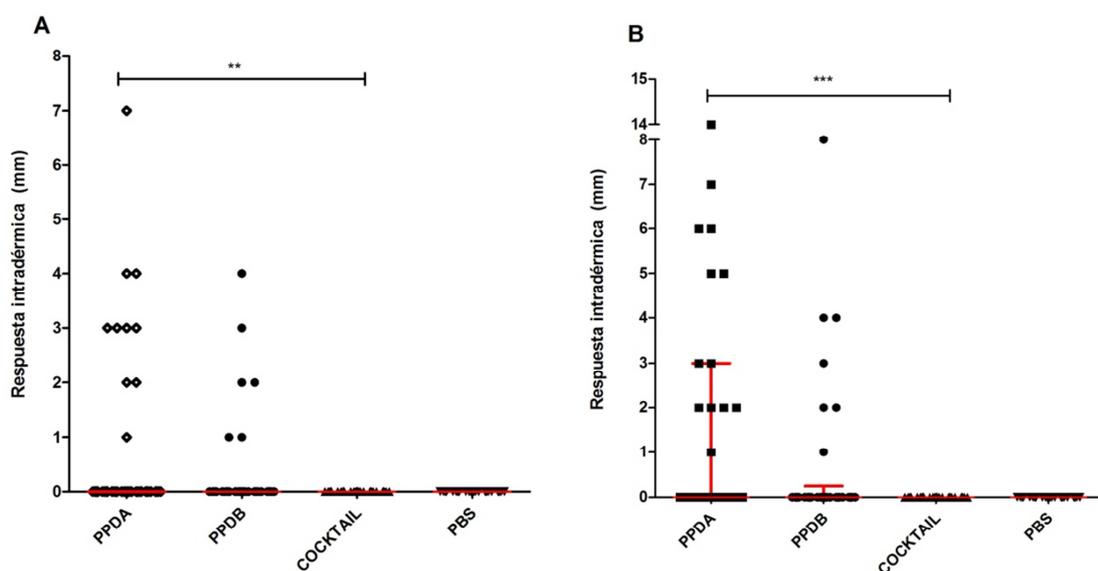


Figura 8-20. Respuestas intradérmicas inducidas por el PPDA, PPDB y cóctel proteico en animales libres de la infección con *M. bovis*. (A) Hato sin evidencia de infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. (B) Hato con infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Los resultados están expresados como la diferencia en el incremento del grosor dérmico entre la lectura final e inicial. Las barras rojas representan las medianas y rango intercuartil. La diferencia estadística entre las respuestas fue determinada con la prueba de Kruskal Wallis (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

8.4. Sensibilidad del método de detección de *M. bovis* mediante PCR simple y anidado

Se determinó que con el PCR simple de mpb70 es posible detectar 1×10^4 ufc, mientras que el límite mínimo de detección del protocolo de PCR anidado es de 1×10^2 ufc (Figura 8-21).

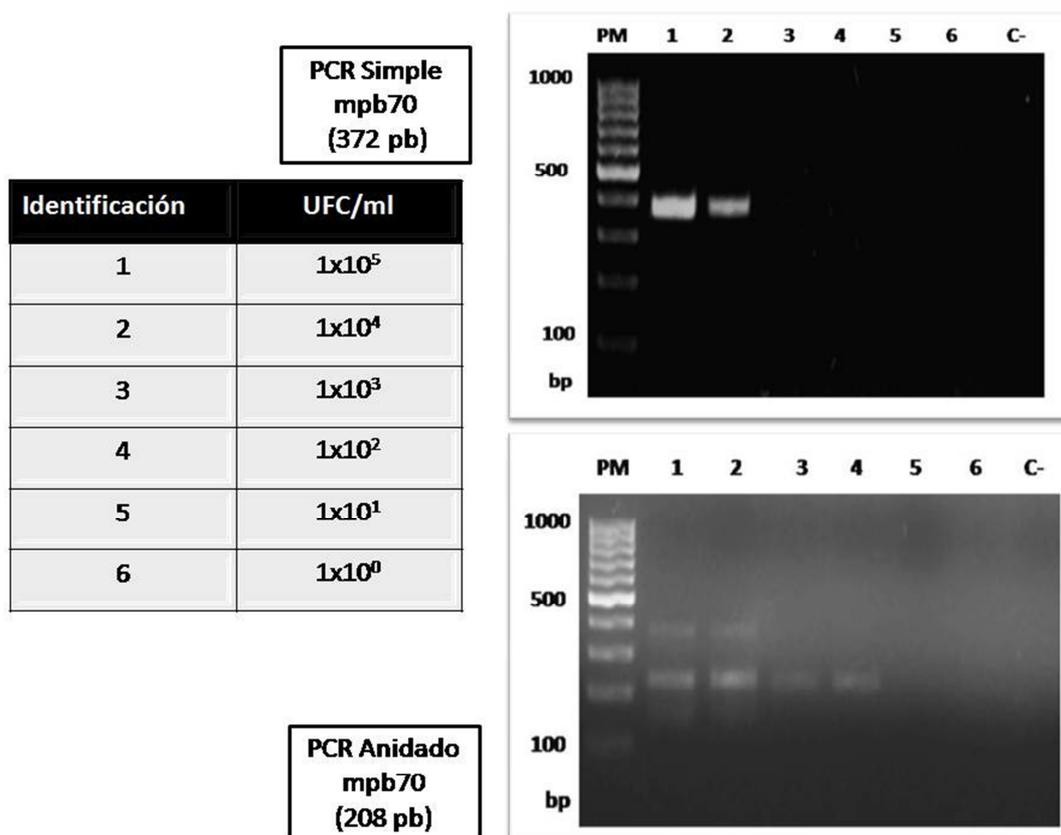


Figura 8-21. Sensibilidad de la prueba de PCR simple y anidado a partir de exudado nasal. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se observa en el primer carril el marcador de peso molecular de 100bp, carriles identificados 1 al 6 producto de la amplificación del gen mpb70 a partir de una solución de PBS 1X inoculada experimentalmente con distintas concentraciones de *M. bovis* AN5.

9. DISCUSIÓN

Los esfuerzos que se han hecho en el control de la tuberculosis bovina, han permitido la disminución de la prevalencia de esta enfermedad en varios estados de la república (38); sin embargo, su erradicación es complicada debido a varios factores, uno de ellos es la baja especificidad del PPD actualmente utilizado en las pruebas diagnósticas, por esto es necesario la implementación de pruebas con mayor especificidad que permitan la identificación de los verdaderos negativos. A partir de la descripción de la prueba de IFN- γ (41) se han hecho innumerables investigaciones para evaluar su capacidad diagnóstica mostrando ser más sensible y específica que la prueba intradérmica. Sin embargo, la exposición a otras micobacterias o la co-infección con *M. avium* subsp *paratuberculosis* afecta la especificidad de esta prueba, incrementando el número de reacciones falsas positivas (120).

En el presente estudio se compararon las respuestas inducidas hacia el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 y hacia el PPD en animales libres de tuberculosis bovina y animales infectados naturalmente, con el objetivo de analizar las ventajas que ofrece el uso del coctel proteico en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Estas comparaciones se realizaron en la prueba *in vitro* de IFN- γ y en la prueba *in vivo* de intradermorreacción.

Respecto a la prueba de IFN- γ , en el hato de alta prevalencia más del 60% de los animales reactivos a la prueba cervical comparativa tuvieron respuestas positivas hacia ambos antígenos en la prueba de IFN- γ , adicionalmente 40% de los animales clasificados como sospechosos o negativos a la prueba de la tuberculina tuvieron respuestas positivas hacia ambos antígenos, por lo que es más probable que la mayoría de estos animales estén infectados y no hayan sido identificados por la prueba de campo. Por lo tanto, si la prueba de IFN- γ se realizará en animales negativos y sospechosos a la prueba intradérmica, con el uso del PPD se detectaría 25% más de animales; mientras que, con el uso del cóctel proteico esta proporción sería del 21%.

Sin embargo, el mayor beneficio del uso del cóctel proteico en la prueba de IFN- γ se observa en hatos de baja prevalencia, en donde el 20% de estos animales mostraron

respuestas positivas hacia el cóctel proteico. En este caso con el PPD una baja proporción de animales pudo ser clasificado como positivo, esto debido a una fuerte reacción hacia el PPD aviar debido a la co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* lo que disminuye la especificidad de las pruebas basadas en el uso del PPD. Esto ha sido previamente reportado en ganado infectado experimentalmente con *M. avium* (107, 121-122) y en hatos con una co-infección con MAP, en donde se reportó que el 50% de los animales tuvo respuestas falsas negativas en la prueba de IFN- γ (123).

Es importante señalar que también se observó una diferencia significativa tanto en el tamaño de la reacción intradérmica como en el índice de respuesta en la prueba de IFN- γ en los hatos de alta y baja prevalencia de tuberculosis, siendo mayores las respuestas en el hato de alta prevalencia, esto puede ser explicado en parte, por el nivel de exposición hacia *M. bovis* y por el grado de infección, ya que existe una correlación positiva entre el tamaño de la reacción intradérmica y la extensión de la patología (54). Sin embargo, también se ha descrito una disminución en las respuestas *in vivo* e *in vitro* en animales con una co-infección con paratuberculosis, resultando en una disminución de la sensibilidad (123).

Los resultados anteriores demuestran la necesidad de realizar pruebas secundarias a la prueba de intradermorreacción para aumentar la sensibilidad y especificidad de esta prueba. En hatos de alta prevalencia la prueba de IFN- γ puede ser realizada usando el PPD o el cóctel proteico. En hatos de baja prevalencia o con co-infección con paratuberculosis lo ideal es el uso del cóctel proteico ya que la respuesta hacia estos antígenos no se ve afectada por esta co-infección.

A pesar de que el uso del cóctel proteico en la prueba de IFN- γ ha demostrado tener una mayor especificidad que la prueba cervical comparativa, sobre todo en hatos de baja prevalencia (124-125), su aplicabilidad es difícil, debido a su alto costo y a las limitaciones logísticas en su desarrollo. Es por ello que se analizó la influencia en el diagnóstico de la tuberculosis bovina al emplear el cóctel proteico pero de forma intradérmica junto con la prueba cervical comparativa.

Como primer paso se realizó un estudio piloto con 10 animales infectados naturalmente, los cuales se seleccionaron en base a los resultados positivos de la prueba de IFN- γ y PCR, además de que habían sido reactivos a la prueba cervical comparativa en dos

ocasiones anteriores. Se probaron diferentes concentraciones del cóctel proteico, 5, 10 y 15 μg de cada proteína con el objetivo de determinar la concentración óptima y el tiempo de lectura de la reacción. En estudios anteriores se reportó que era necesario el uso de altas concentraciones de proteína para inducir reacciones intradérmicas en bovinos ($\geq 400 \mu\text{g}$) y además era necesario un mayor tiempo de lectura de la reacción (96 horas en lugar de 72 horas) (15). Sin embargo, en el presente estudio fue posible obtener respuestas con la dosis mínima (5 μg de cada proteína), siendo mejores con una concentración de 10 μg . El pico máximo de la reacción se observó a las 72 horas, lo que tiene la ventaja de que la lectura de la reacción hacia el PPD y hacia el cóctel proteico puede realizarse al mismo tiempo.

Además de las diferentes concentraciones del cóctel proteico analizadas, se evaluó un cuarto tratamiento compuesto por una combinación de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y MPB83, esta última proteína se incluyó debido al potencial mostrado en pruebas intradérmicas en cobayos (108); sin embargo, su inclusión no mejoró la respuesta inducida por el cóctel proteico ESAT-6+CFP-10 por lo que se decidió no incluirla en estudios posteriores. En un reciente reporte que analiza el potencial de estos antígenos en la prueba intradérmica en bovinos infectados naturalmente, los autores mencionan un efecto aditivo con el uso de la proteína MPB83 aunque este no es significativo (126).

Los resultados de las reacciones intradérmicas inducidas por la dosis de 10 μg de cada componente del cóctel proteico en animales infectados y libres de tuberculosis bovina fueron usados para realizar una curva ROC y analizar el efecto del punto de corte en la sensibilidad y especificidad de la prueba con estos antígenos. Con un incremento $\geq 1 \text{ mm}$ la sensibilidad y especificidad estimada es de 95% y 100%, respectivamente.

Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos con esta dosis del cóctel proteico (10 μg de cada proteína) y con la prueba cervical comparativa (PCC) en el hato de alta y baja prevalencia de tuberculosis bovina. En el hato de alta prevalencia hubo 63 reactores a la prueba cervical comparativa (45.6%) el mismo número de animales positivos hacia el cóctel proteico, pero no los mismos animales; ya que con el uso del cóctel proteico se pudo identificar al 30.4% de animales catalogados como sospechosos a la PCC, y un animal catalogado como negativo. Es decir se identificó un 11% más de animales que no

fueron identificados con la PCC. Lo que demuestra un aumento en la sensibilidad de la prueba intradérmica empleando el cóctel proteico.

A pesar de que la respuesta intradérmica con el cóctel proteico es menor que la respuesta obtenida con el PPD, su uso en paralelo permite una mayor identificación de animales infectados, permitiendo esclarecer el resultado sospechoso de la prueba cervical comparativa, sin necesidad de repetir la prueba 60 días después.

La respuesta hacia los antígenos en la prueba intradérmica en el hato de baja prevalencia con co-infección con MAP es muy diferente, con la PCC solo se pudo detectar un animal reactor, mientras que 13 % fue clasificado como sospechosos, esto debido a una fuerte respuesta hacia el PPD aviar. Sin embargo, el cóctel proteico identificó 8 animales infectados (10.5%), de los cuales, 3 fueron clasificados como sospechosos y 5 como negativos por la prueba cervical comparativa. Por lo que el uso del cóctel proteico en hatos con co-infección con MAP, compensa la baja especificidad del PPD.

En resumen, se puede decir que el uso del cóctel proteico permite identificar a una importante proporción de animales que escapan a la identificación con la prueba cervical comparativa, incrementando su sensibilidad y especificidad empleándolo en la prueba de IFN- γ o en forma intradérmica; sin embargo, esta última ofrece la ventaja de que se puede realizar al mismo tiempo que la prueba cervical comparativa evitando los problemas logísticos que conlleva la prueba *in vitro* (Cuadro 8-4).

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis bovina se realiza con el aislamiento de la micobacteria; sin embargo, en algunos casos es imposible obtener un aislamiento a pesar de que los bovinos sean reactores a las pruebas intradérmicas, esto es más frecuente en prevalencias bajas de la infección. En los últimos años ha habido un gran avance en el desarrollo de herramientas de biología molecular que permiten una identificación más rápida de la infección. Una de estas pruebas es el PCR, el cual generalmente se realiza después de la extracción de ADN de los tejidos sospechosos; sin embargo, una herramienta poco empleada es el PCR a partir de la extracción de ADN de exudados nasales, debido a que es necesario que el animal este excretando la micobacteria para que pueda ser detectada (60). Estos períodos de excreción son intermitentes y varían de un individuo a otro por el

grado de infección o debido a una variación en la resistencia o susceptibilidad a la infección (127).

En el presente estudio se evaluó el beneficio del uso de este protocolo de PCR en un diagnóstico integral de la tuberculosis bovina. Se realizó un sistema de PCR anidado, ya que en este estudio se demostró que con el PCR simple se puede detectar 1×10^4 ufc en solución salina, mientras que con el PCR anidado es posible detectar hasta 1×10^2 ufc en solución salina. La sensibilidad de este sistema se puede mejorar con otros métodos de extracción de ADN más eficientes; sin embargo el método empleado es económico, simple de realizar y tiene una sensibilidad aceptable (92).

Como se mostró anteriormente el uso del cóctel proteico de forma intradérmica en paralelo con la prueba cervical comparativa es una opción más práctica que puede llevarse a cabo y que permite la identificación de varios animales que no son identificados por esta última prueba. Si se usará el PCR en estos animales se podría detectar a un importante número de animales que están excretando la micobacteria y que son una fuente de infección para el resto del hato. En el hato de alta prevalencia, como se esperaba hubo un alto número de animales identificados por PCR (62%) (85/138), 31 de los cuales tuvieron respuestas positivas hacia ambos antígenos aplicados de forma intradérmica.

El PCR nos permitió corroborar algunos de los resultados obtenidos con el cóctel proteico, de los 63 reactores hacia el cóctel proteico en el hato de alta prevalencia, 40 fueron PCR positivos (63%). Mientras que el hato de baja prevalencia más del 80% (7/8) de los reactores al cóctel fueron PCR positivos. Es importante mencionar que el hecho de que el resto de los animales que respondieron hacia este cóctel y fueron PCR negativos, no significa que no estén infectados, simplemente pueden estar en un período de no excreción de la micobacteria.

Un dato interesante es que en el hato de baja prevalencia hubo un número alto de animales PCR positivos, los cuales no pudieron ser identificados con las otras pruebas diagnósticas, esto puede ser debido a la baja respuesta en las pruebas *in vivo* e *in vitro* en estos animales, que impide un incremento significativo en el grosor intradérmico causado por la co-infección con MAP o por una sensibilización (55, 123). Esto confirma que la

sensibilidad de las pruebas de campo se ve afectada por la presencia de paratuberculosis, enmascarando la prevalencia real de la infección por tuberculosis bovina.

La especificidad del cóctel proteico fue evaluada en hatos libres de la infección. No se observó ninguna respuesta intradérmica hacia el cóctel proteico a pesar de la infección con paratuberculosis, a diferencia de las reacciones inducidas hacia el PPD aviar y PPD bovino. Demostrando ser altamente específico. Esto concuerda con los resultados obtenidos en animales vacunados con *M. bovis* BCG, los cuales tuvieron fuertes respuestas intradérmicas hacia el PPD pero no hacia el cóctel proteico el cual está compuesto por antígenos que solo se encuentran presentes en el complejo *M. tuberculosis* (126).

Una de las principales limitantes de este estudio fue la falta del aislamiento para confirmar una infección con *M. bovis*. Esto nos hubiera permitido determinar la sensibilidad y especificidad del cóctel proteico; sin embargo con la alta especificidad observada en hatos libres de la infección y con los resultados obtenidos en los animales infectados podemos proponer el uso del cóctel proteico en la prueba intradérmica en paralelo con la prueba cervical comparativa, sobre todo en hatos de baja prevalencia, o en hatos con una co-infección con paratuberculosis.

Finalmente, uno de los objetivos del presente estudio era la expresión y purificación de las proteínas recombinantes ESAT-6 y CFP-10 con el fin de realizar la evaluación anteriormente analizada y contar con el sistema de expresión para las próximas investigaciones. Sin embargo, debido a los problemas en la expresión de estas proteínas, tuvimos la necesidad de solicitar la donación de estas; a pesar de ello, se continuaron los trabajos de expresión y purificación. Al término de este proyecto se concluyó la estandarización de la expresión y purificación de la proteína ESAT-6. Respecto a la proteína CFP-10 se logró obtener un sistema de expresión eficiente; sin embargo, la purificación de esta proteína ha sido complicada debido a que no puede ser purificada mediante cromatografía de afinidad a metales. A pesar de esto, se ha intentado su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico obteniendo resultados alentadores, de la misma forma, se está trabajando en la estandarización de la repurificación de esta proteína mediante exclusión molecular. Con el objetivo de tener la

capacidad de producir y purificar ambas proteínas en cantidad suficiente para las próximas evaluaciones.

10. CONCLUSIONES

- Es posible inducir reacciones intradérmicas en bovinos con el uso de pequeñas concentraciones (10 µg de proteína) de antígenos altamente purificados.
- El uso intradérmico del cóctel proteico en paralelo con la prueba cervical comparativa permite la identificación de animales sospechosos a la prueba cervical comparativa.
- En hatos con co-infección con paratuberculosis el cóctel proteico mejora la identificación de los animales infectados con tuberculosis bovina, incrementando así la especificidad del diagnóstico.
- El uso de estos antígenos altamente específicos no induce reacciones en animales sensibilizados a la exposición por micobacterias ambientales o infectados con paratuberculosis.

11. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar más estudios de campo para evaluar el comportamiento del cóctel proteico administrado de forma intradérmica en diferentes prevalencias de tuberculosis bovina. De la misma forma se debe evaluar el uso de otros antígenos que mejoren la sensibilidad de este cóctel y que permitan la identificación de un mayor número de animales. Algunos de estos antígenos pueden ser TB10.4, PE5, PE13, Rv3615c y OmpATb los cuales identifican animales infectados que no son detectados con las proteínas ESAT-6 y CFP-10 y que podrían tener un efecto aditivo (10, 126, 128-129).

De la misma forma es importante evaluar el uso de péptidos sintéticos de estas proteínas, ya que al ser sintetizados químicamente es más fácil su estandarización y control en la calidad.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 1994;40:153-77.
2. Thoen OC, Barletta RG. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA: Blackwell 2006. p. 18-29.
3. López Marin LM, Díaz Otero F, Vallecillo Maza AJ, Esquivel Solís H, Gutierrez-Pabello JA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2006;48(2):173-8.
4. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Diseases* 1996;77:103-8.
5. Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research* 2005;36:411-36.
6. Milián SF, Pérez GL, Arriaga DC, Escartín CM. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 2010;97(1):37-44.
7. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, Mc.Gill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam[®]) assay. *Veterinary Microbiology* 2006;112:171-9.
8. van Pinxteren LAH, Ravn Pernille, Agger Else Marie, Pollock JM, Andersen P. Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 y CFP10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:155-60.
9. Whelan A, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. Modulation of the Bovine Delayed Type-Hypersensitivity Responses to Defined Mycobacterial Antigens by a Synthetic Bacterial Lipopeptide. *Infection and Immunity* 2003;71(11):6420-5.
10. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, Gutierrez-Pabello JA, Suarez-Güemes F, McNair J, Cataldi A, Espitia C, Andersen P, Pollock JM. Optimizing Antigens Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:4326-35.
11. Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody KA, Andersen P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected Cattle by Using Recombinant Mycobacterial Antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6(1):1-5.
12. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. Use of recombinant proteins in antibody test for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 2002;85:379-89.

13. Andersen P, Weldingh K. ESAT-6/CFP10 Skin Test Predicts Disease in *M. tuberculosis*-Infected Guinea Pigs. PLoS ONE 2008;3(4).
14. Bai Y, Xue Y, Gao H, Wang L, Ding T, Bai W, Fan A, Zhang J, Qunxing A, Xu Z. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MP764 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. Protein Expression and Purification 2008;58:189-96.
15. Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P. Specific Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 Identify Tuberculosis-Infected Cattle. Journal of Clinical Microbiology 2003;41(5):1856-60.
16. Lyashchenko KP, Manca C, Colangeli R, Heijbel A, Williams AM, Gennaro ML. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Specific for Tuberculosis Infection and Immunity 1998;66(8):3606-10.
17. Ernst DJ, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. Journal of Clinical Investigation 2007;117(7):1738-45.
18. Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith EG, Gordon SV. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. Veterinary Microbiology. [Review]. 2006;112:127-39.
19. Mostowy S, Behr MA. The Origin and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinics in Chest Medicine. [Review]. 2005;26:207-16.
20. Neill SD, Pollock JM, Bryson DG, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology 1994;40:41-52.
21. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated Calves. Journal of Comparative Pathology 1999;121:321-37.
22. Phillips CJC, Foster CRW, Morris RS, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Research in Veterinary Science. [Review]. 2003;74:1-15.
23. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. The Veterinary Journal 2002;163:115-27.
24. Trejo Márquez H, Gorocica P, Porrás F, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 2003;16:41-7.
25. Pieterss J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. Cell Host and Microbe 2008;3:399-407.
26. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? Nature Reviews 2007;5:39-47.
27. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans JT, Forster F, Neill SD. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J Comp Pathol 1998;119(1):27-44.
28. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. Tuberculosis. [Review]. 2004;84:93-101.
29. Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. Current Opinion in Immunology 2003;15:1-6.

30. Herrera BMT, M. TR, Juárez CE, Sada DE. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2005;18(4):327-36.
31. Berrington WR, Hawn TR. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews* 2007;219:167-86.
32. Schluger NW, Rom WN. The Host Immune Response to Tuberculosis. . *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:679-91.
33. Wood PR, Rothel JS. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 1994;40:125-35.
34. Pérez GR, Milián SF, Arriaga DC, Romero TC, Escartín CM. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública de México* 2008;50(4):286-91.
35. LoBue P. Public Health Significance of *M. bovis*. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA.: Blackwell Publishing; 2006. p. 6-12.
36. Toledo OP, Milian SF, Santillán FM, Ramírez CIC. Aislamiento e Identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Veterinaria México* 1999;30:227-9.
37. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. *Mycobacterium bovis* tuberculosis in binational communities. *Emerging Infectious Diseases* 2008;14(6):1-16.
38. SENASICA. Situación Actual de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. 2010; Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>.
39. Thoen OC, Ebel ED. Diagnostic Tests for Bovine Tuberculosis. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 2nd ed. Iowa, USA: Blacwells 2006. p. 49-53.
40. OIE. World Organization for Animal Health. 2010; Available from: http://www.oie.int/eng/en_index.htm.
41. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 1990;67:134-7.
42. de la Rua RD, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 2006;81:190-210.
43. Gradmann C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes and Infection*. [Review]. 2006;8:294-301.
44. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-bases diagnosis of tuberculosis. *The Lancet* 2000;356:1099-104.
45. Sell S, Max E. Delayed-Type Hypersensitivity. *Immunology, Immunopathology, and Immunity*. 6th. Washington, D.C.: ASM Press; 2001.
46. Francis J, Choi CL, Frost AJ. The diagnosis of tuberculosis in cattle with special reference to bovine PPD tuberculin. *Australian Veterinary Journal* 1973;49:246-51.

47. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 1994;40:114-24.
48. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. [Historical Review]. 2006;100:1862-70.
49. McIntosh CW, Konst H. Tuberculin. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1947;11(12):344-51.
50. NOM-031-ZOO-1995 NOM. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
51. Francis J, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin test using bovine PPD and other tuberculins. *Veterinary Record* 1978;103:420-35.
52. Francis J, Seiler RJ, Frost AJ. The efficiency and dose of bovine purified protein derivative tuberculin. *Australian Veterinary Journal* 1978;54:44-6.
53. Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan A, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer MV, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. [Mini Review]. 2010;136:1-11.
54. Goodchild AT, Clifton-Hadley RS. The Fall and Rise of Bovine Tuberculosis in Great Britain. In: Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM, editors. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Iowa, USA: Blacwells; 2006. p. 100-16.
55. Coad M, Clifford D, Rhodes S, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan A. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary Research* 2010;41(14).
56. Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP. Effects of Different Tuberculin Skin-Testing Regimens on Gamma Interferon and Antibody Responses in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006;13:387-94.
57. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeiffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995;13:1123-30.
58. Doherty ML, Monaghan ML, Bassett H, Quinn PJ. Effect of a recent infection of purified protein derivative on diagnostic test for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science* 1995;58(3):217-21.
59. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal* 1992;69(1):1-4.
60. Palmer MV, Waters WR. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*. [Review]. 2006;112:181-90.
61. Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2001;13:117-22.

62. Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004;102(4):413-20.
63. Whelan A, Coad M, Peck ZA, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Record* 2004;155(7):204-6.
64. Thom ML, Hope JC, McAulay M, Villareal-Ramos B, Coffey TJ, Stephens S, Vordermeier HM. The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;114(1-2):25-36.
65. Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. Diversity of Antigen Recognition by Serum Antibodies in Experimental Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity* 1998;66(11):5344-9.
66. Lyashchenko KP, Whelan A, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and Infected with *M. bovis*. *Infection and Immunity* 2004;72(5):2462-7.
67. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, De Witte K, Tolson J, Ryan TJ, Lisle GW, Cox JC, Jones SL. A field evaluation of serological and cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 1992;31:71-9.
68. Kwok HF, Scott CJ, Snoddy P, Buick RJ, Johnston JA, Olwill SA. Expression and purification of diagnostically sensitive mycobacterial (*Mycobacterium bovis*) antigens and profiling of their humoral immune response in a rabbit model. *Research in Veterinary Science* 2010.
69. Ritacco V, Lopez B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Kantor IN. Further evaluation on an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 1990;37(1):19-27.
70. Harboe M, Wiker HG, Duncan JR, García MM, Dukes TW, Brooks BW, Turcotte C, Nagai S. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28:913-21.
71. McNair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock JM. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. *Scand J Immunol* 2001;53:365-71.
72. Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of Immunological Methods* 2000;242(1-2):91-100.
73. Jolley ME, Nasir MS, Surujballi OP, Romanowska A, Renteria TB, De la Mora A, Lim A, Bolin SR, Michel AL, Kostovic M, Corrigan EC. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Veterinary Microbiology* 2007;120(1-2):113-21.
74. Whelan C, Shuralev E, O'Keeffe G, Hyland P, Kwok HF, Snoddy P, O'Brien A, Connolly M, Quinn PJ, Groll M, Watterson T, Call S, Kenny K, Duignan A, Hamilton MJ, Buddle BM, Johnston JA, Davis WC, Olwill SA, Clarke J. Multiplex Immunoassay for

- Serological Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008;15(12):1834-8.
75. Green LR, Jones CC, Sherwood AL, Garkavi IV, Cangelosi GA, Thacker T, Palmer MV, Waters WR, Rathe V. Single-Antigen Serological Testing for Bovine Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009;16(9):1309-13.
 76. Waters WR, Palmer MV, Thacker T, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson RG, Greenwald R, Esfandiari J, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Yashchenko KP. Early Antibody Responses to Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006;13(6):648-54.
 77. Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood A, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal* 1990;67:389-92.
 78. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*. [Review]. 1994;40:53-63.
 79. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris J, Orloski KA, Buddle BM, Thacker T, Lyashchenko KP, Waters WR. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*. [Review]. 2010;57:205-20.
 80. Barrera L. The Basics of Clinical Bacteriology www.TuberculosisTextbook.com; 2007.
 81. Corner LA, Trajstman AC, Lund K. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal* 1995;43(4):129-35.
 82. Collins CH, Grange JM. The bovine tubercle bacillus. *Journal of Applied Bacteriology*. [Review]. 1983;55:13-29.
 83. Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald J, Hewinson RG, Gordon SV. The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vitro growth. *Molecular Microbiology* 2005;56(1):163-74.
 84. Rodrigues CS, Shenai SV, Almeida DVG, Sadani MA, Goyal N, Vadher C, Mehta AP. Use of BATEC 460 TB System in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007;25(1):32-6.
 85. Hines N, Payeur JB, Lorraine J, Hoffman LJ. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2006;18:243-50.
 86. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods* 2008;75:1-11.
 87. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates, and Nasal Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(4):1050-5.
 88. Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, Cataldi A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005;17(3):232-8.

89. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of Genetic Markers for Species Differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 1996;34(4):933-8.
90. De los Monteros LEE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Marin JFG, Martin C, Domínguez L, de Rafael L, Banquero F, Gomez ME, Blazquez J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *OxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraespecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:239-42.
91. Das S, Das SC, Verma R. Occurrence of RD9 Region and 500bp Fragment among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiology and Immunology* 2007;51(2):231-4.
92. Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinary Medicine* 2006;51(5):180-92.
93. Abdallah AM, Nicolaas C. Gey van Pittius, Patricia A. DiGiuseppe Champion, Jeffery Cox, Joen Luirink, Christina M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, Ben J. Appelmelk, Bitter W. Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology* 2007;5:883-91.
94. Simeone R, Bottai D, Brosch R. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology* 2009;12:1-7.
95. Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis*. [Review]. 2008;88:510-7.
96. Garces A, Atmakuri K, Chase MR, Woodworth JS, Krastins B, Rothchild AC, Ramsdell TL, Lopez MF, Behar SM, Sarracino DA, Fortune SM. EspA Acts as a Critical Mediator of ESX1-Dependent Virulence in *Mycobacterium tuberculosis* by Affecting Bacterial Cell Wall Integrity. *PLoS Pathogens* 2010;6(6):10.1371/journal.ppat.1000957.
97. Stanley SA, Raghavan S, Hwang WW, Cox JC. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *PNAS* 2003;100(22):13001-6.
98. Derrick SC, Morris SL. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology* 2007;9(6):1547-55.
99. Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, Brown EJ. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology* 2004;53(6):1677-93.
100. Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu Y, Liu J, McDonald KL, Szyk A, LaRonde-LeBlanc N, Gao LY. Evidence for Pore Formation in Host Cell Membranes by ESX-1-Secreted ESAT-6 and Its Role in *Mycobacterium marinum* Escape from the Vacuole. *Infection and Immunity* 2008;76(12):5478-87.
101. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. Individual RD1- region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 2004;51(2):359-70.

102. Trajkovic V, Natarajan K, Sharma P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. *Microbes and Infection* 2004;6:513-9.
103. Ganguly N, Giang PH, Gupta C, Basu KS, Siddiqui I, Salunke DM, Sharma P. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF- κ B transactivation by downregulation of reactive oxydative species (ROS) production. *Immunology and Cell Biology* 2008;86:98-106.
104. Fortune SM, Jaeger A, Sarracino DA, Chase MR, Sasseti CM, Sherman DR, Bloom BR, Rubin EJ. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *PNAS* 2005;102(30):10676-81.
105. Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier HM, Hewinson RG, Andersen P, Lisle GW. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Veterinary Record* 2003;153:615-20.
106. Pollock JM, Girvin RM, Lightbody KA, Clements RA, Neill SD, Buddle BM, Andersen P. Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Veterinary Record* 2000;146:659-5.
107. Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer MV, Robbe-Austermann S, Bannantine JP, Stabel JR, Whipple DL, Payeur JB, Estes DM, Pitzer JE, Minion FC. Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10 Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2004;11:729-35.
108. Vordermeier HM, Cockle PJ, Whelan A, Rhodes S, Palmer N, Bakker D, Hewinson RG. Development of Diagnostic Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* Infection in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999;6(5):675-82.
109. Haslov K, Andersen AB, Nagai S, Gottschau A, Sorensen AL, Andersen P. Guinea Pig Cellular Immune Response to Proteins Secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 1995;63(3):804-10.
110. Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, Zhao X, Vogelstein M, Spencer JS, McMurray DN, Gennaro ML. Immunological Characterization of Antigens Encoded by the RD1 Region of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome. *Scand J Immunol* 2001;54:448-52.
111. Kalra M, Krishen KG, Ahmad SJ, Verma I. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* specific RD antigens for delayed type hypersensitivity responses in guinea pigs. *Indian Journal of Experimental Biology* 2010;48:117-23.
112. Colangeli R, Spencer JS, Bifani P, Williams AM, Lyashchenko KP, Keen MA, Hill PJ, Belisle J, Gennaro ML. MTSA-10, the Product of the Rv3874 Gene of *Mycobacterium tuberculosis*, Elicits Tuberculosis-Specific, Delayed-Type Hypersensitivity in Guinea Pigs. *Infection and Immunity* 2000;68(2):990-3.
113. Elhay M, Oettinger T, Andersen P. Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea Pig. *Infection and Immunity* 1998;66(7):3454-6.

114. Wu X, Zhang L, Zhang J, Zhang C, Zhu L, Shi Y. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 2008;152:81-7.
115. Slogotskaya L. New skin testing with DIASKINTEST (recombinant protein CFP10-ESAT6) in TB diagnosis. European Respiratory Society Annual Congress; September 12-16; Vienna, Austria 2009.
116. Guideline on Validation of the *Limulus Amebocyte Lysate* Test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, (1987).
117. Belisle J, Sonnenberg G. Isolation of Genomic DNA from Mycobacteria. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacteria Protocols*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 31-44.
118. Serrano MBA, Romero TA, Arriaga DC, Torres RA, Pereira SAL, García SJA, Estrada CC. High Frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in Colostra from Tuberculous Cattle Detected by Nested PCR. *Zoonoses and Public Health* 2008;55:258-6.
119. Argimon PJ, Jiménez VJ. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 3rd ed. Madrid, España: ELSEVIER; 2004.
120. Aranaz A, De Juan L, Bezos J, Álvarez J, Romero B, Lozano F, Paramio JL, López SJ, Mateos A, Domínguez L. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Research* 2006;37:593-606.
121. Amadori M, Tagliabue S, Lauzi S, Finazzi G, Lombardi G, Teló P, Pacciarini L, Bonizzi L. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitized by mycobacteria of the avium/intracellulare group. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2002;49(2):89-96.
122. Hope JC, Thom ML, Villareal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clinical and Experimental Immunology* 2005;141(3):432-9.
123. Álvarez J, De Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Marqués S, Domínguez C, Mínguez O, Fernández-Mardomingo B, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology* 2009;135:389-93.
124. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutiérrez PJA, McNair J, Andersen P, Suárez GF, Pollock JM, Espitia C, Cataldi A. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine* 2010;96:161-9.
125. Aagaard C, Govaerts M, Okkels LM, Andersen P, Pollock JM. Genomic Approach to Identification of *Mycobacterium bovis* Diagnostic Antigens in Cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:3719-28.
126. Whelan A, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson RG, Vordermeier HM. Development of a Skin Test for Bovine Tuberculosis for Differentiating Infected from Vaccinated Animals. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48(9):3176-81.
127. Kao RR, Gravenor MB, Charleston B, Hope JC, Martin M, Howard CJ. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect

of current infection with bovine viral diarrhoea virus. *Journal of The Royal Society Interface* 2007;4:545-51.

128. Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Palmer MV, Thacker T, Whelan A, Hardegger R, Marg-Haufe B, Raeber A, Oesch B. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* OmpATb as a Novel Antigen for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009;16(9):1314-21.

129. Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. Screening of Highly Expressed Mycobacterial Genes Identifies Rv3615c as a Useful Differential Diagnostic Antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Infection and Immunity* 2008;76(9):3932-9.