



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**RESPUESTA INMUNE DE BECERRAS VACUNADAS CON
Mycobacterium bovis BCG, EN UN HATO DE ALTA PREVALENCIA DE
TUBERCULOSIS BOVINA**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

EVE-LYNE MARIE ISABELLE QUEVILLON

Tutor principal externo: **Dr. Fernando Díaz Otero**
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Tutor principal interno: **Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello**
FMVZ

Comité tutorial: **Dra. Camila Arriaga Díaz**
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 mes très chers parents:

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Je mets entre vos mains le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour, de votre tendresse, de longs jours d'apprentissage. Même loin de vous, votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents. Pour votre amour... Pour tous vos sacrifices... Pour tous l'enseignement que vous m'avez transmis... En témoignage de mon éternelle reconnaissance.

A mon cher frère:

Que j'aime tant et que je ne vois pas souvent, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je te porte. Je te suis reconnaissante pour la tendresse et gentillesse que tu m'as porté durant toutes ces années. Même loin, je sais que tu m'as toujours soutenu et cru en moi. Je te remercie simplement pour être le meilleur frère que j'eusse pu souhaiter d'avoir.

A ma meilleure amie Anie:

Pour notre sincère et profonde amitié et tous les moments agréables que nous avons passés ensemble (surtout au téléphone ...). Tu as toujours été là pour me soutenir, m'aider et m'écouter. Tu fais partie de ces personnes rares par leur gentillesse, leur générosité et leur grand cœur. Tu es une sœur pour moi et tu partageras toujours une partie de ma vie et de mon cœur. Je souhaite que notre amitié reste à jamais.

A Juan :

Por tu paciencia, tu comprensión y por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo.

A mi bro Felipao:

Por ser alguien muy especial en mi vida y demostrarme que en todo momento cuento contigo. Gracias por el apoyo que me brindaste para realizar este trabajo y llegar hasta el final del camino.

A Carroll et Richard

Je tiens à travers cette modeste dédicace à vous exprimer toute mon affection et mon profond attachement, merci pour votre affection, soutien et vos encouragements.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Díaz Otero:

La realización de esta tesis no habría sido posible sin su valiosa ayuda. Mi sincero agradecimiento no sólo por la formación académica, la cual sin duda fue muy importante, sino también por la confianza depositada en mí y por su ejemplo de trabajo y dedicación. Un agradecimiento especial por poder hacer del trabajo de todos los días un espacio para compartir alegrías, tristezas, problemas, proyectos ...

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello:

Por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, además de sus valiosas sugerencias y acertados aportes, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A la Dra. Laura Jaramillo Meza y la Dra. Camila Arriaga Díaz:

Un agradecimiento especial por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo, además de su predisposición para ayudar en todo momento y durante los más variados problemas.

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma:

Por la ayuda brindada y su incondicional colaboración, especialmente con los ensayos de citometría de flujo.

A mis compañeros de trabajo:

Felipe Ángel Castañeda, Xochitl Eva González, Ana Gabriela Vega, Lysett Corona y Brenda Argelia Viridiana quienes me acompañaron en esta trayectoria de aprendizaje y conocimientos. Les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo pero sobre todo cariño y amistad.

A los miembros de mi jurado:

Por su disposición a leer mi trabajo de tesis y apoyarme con sus observaciones, sugerencias y correcciones, necesarias para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT):

Por el apoyo financiero brindado para realizar mi doctorado.

A todos, sinceramente... Muchas gracias !!!

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infectocontagiosa causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que provoca grandes pérdidas económicas al sector pecuario, además de representar un problema de salud pública. Por ello, es necesario encontrar medidas efectivas para el control de la enfermedad. La inmunización de bovinos con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), especialmente neonatos, induce protección contra *M. bovis* y se ha propuesto como una estrategia de control de la TBb. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta inmune de bovinos neonatos vacunados con BCG cepa Phipps (1×10^6 unidades formadoras de colonias), una cepa poco estudiada tanto en humanos como en bovinos, en un hato de alta prevalencia de TBb y analizar la utilidad de diferentes pruebas diagnósticas de TBb en condiciones naturales de campo. Las becerras fueron monitoreadas durante 220 días y se evaluó la respuesta inmune celular y humoral, así como las subpoblaciones de células T, la activación celular y el patrón de citocinas inducido por la vacuna. Para la detección de la infección, se utilizaron los antígenos purificados ESAT-6 y CFP-10 en el ensayo de IFN- γ *in vitro*, para diferenciar animales vacunados de infectados y la PCR simple y anidada del gen MPB70, específico de los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Se observaron incrementos en la producción de IFN- γ *in vitro*, en los porcentajes de células T CD8⁺ y en los niveles de activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, 21-30 días post-vacunación. Sin embargo, ningún animal, vacunado o no vacunado, fue positivo a las pruebas de la tuberculina cervical comparativa (PTCC) aplicadas. La vacuna no indujo incrementos en los niveles de anticuerpos y en la expresión de IL-4 e IL-10. El diagnóstico realizado mediante la producción de IFN- γ inducida por ESAT-6 y CFP-10 y las pruebas de PCR del gen MPB70 fue confuso. Por lo tanto, se puede concluir que la vacuna BCG Phipps indujo una respuesta dirigida hacia el tipo Th1. Además, la vacunación no interfirió en la PTCC como lo reportado, lo que representa importantes implicaciones, ya que la vacuna se podría utilizar en las campañas de control de la TBb. Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 y las pruebas de PCR del gen MPB70 no resultaron útiles para el diagnóstico de la TBb, ya que no identificaron con certeza animales infectados con *M. bovis*. Más estudios en condiciones naturales de campo son necesarios para evaluar la protección conferida por la vacuna y la confiabilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas para detectar la TBb.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) is an infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), which produces great economic losses in animal husbandry and represents also an important public health problem. It is therefore necessary to find effective measures for the control of the disease. Immunization of cattle with bacillus Calmette-Guérin (BCG), especially neonates, induces protection against *M. bovis* and has been proposed as a strategy for bTB control. The aim of this study was to evaluate the immune response of neonate bovines vaccinated with BCG Phipps (1×10^6 colony forming units), a strain slightly studied both in human and bovine, in a bTB high-prevalence herd and to analyze the utility of different bTB diagnostic tests in natural field conditions. Calves were monitored for 220 days and the cellular and humoral immune responses, as well as T cell subpopulations, T cell activation and cytokine pattern induced by the vaccine were evaluated. For detecting the infection, the purified antigens ESAT-6 and CFP-10 were used in the *in vitro* IFN- γ assay, to differentiate vaccinated from infected animals. In addition, simple and nested PCR using the MPB70 gene, which is specific for *M. tuberculosis* complex members, were performed. Increases in the *in vitro* IFN- γ production, the percentages of CD8⁺ T and the activation levels of CD4⁺ y CD8⁺ T cells were observed, 21 to 30 days post-vaccination. However, no positive animal, vaccinated or unvaccinated, was detected in the comparative cervical tuberculin tests (CCTT) applied. The vaccine did not induce increases in the antibody levels and in the IL-4 and IL-10 expression. The diagnostic made by ESAT-6 and CFP-10-induced IFN- γ production and PCR tests using the MPB70 gene was confusing. Therefore, it can be concluded that BCG Phipps induced an immune response biased towards a Th1-type. In addition, vaccination did not interfere with CCTT as reported, which represents important implications, as the vaccine could be applied in bTB control campaigns. The ESAT-6 and CFP-10 antigens and the PCR tests using the MPB70 gene were not found useful for bTB diagnostic, as they didn't clearly identify *M. bovis*-infected animals. More studies are needed in natural field conditions to assess the protection conferred by the vaccine and the reliability of the diagnostic tests used to detect bTB.

ÍNDICE

RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de la tuberculosis.....	1
1.2 La tuberculosis humana en México.....	1
1.3 Generalidades de la tuberculosis bovina.....	2
1.4 Salud pública e impacto económico.....	3
1.4.1 Zoonosis.....	3
1.4.2 Economía y producción.....	4
1.4.3 Campaña contra la tuberculosis bovina.....	5
1.5 Características de las micobacterias patógenas.....	6
1.5.1 Género y especies.....	6
1.5.2 La envoltura micobacteriana.....	7
1.5.3 Micobacteriología.....	9
1.6 Patogénesis de la tuberculosis bovina.....	11
1.6.1 Fuentes y rutas de infección.....	11
1.6.2 Dosis mínima de infección.....	12
1.6.3 Excreción de <i>M. bovis</i>	13
1.6.4 Patología.....	14
1.6.5 Latencia.....	15
1.7 Inmunología de la tuberculosis.....	16
1.7.1 Reconocimiento de la micobacteria por el sistema inmune.....	17
1.7.2 Respuesta inmune innata.....	18
1.7.3 Respuesta inmune adaptativa.....	21
1.8 La vacuna BCG.....	25
1.8.1 Perspectivas históricas.....	25
1.8.2 Diferenciación de bovinos infectados con <i>M. bovis</i> de vacunados con BCG.....	26

1.8.3 El modelo de vacunación en becerros y medición de la eficacia vacunal.....	27
1.8.4 Progresos recientes en vacunas.....	28
1.8.5 Factores inmunes predictivos de la eficacia vacunal.....	29
1.8.6 La tuberculosis bovina como modelo de vacunas para la tuberculosis humana....	30
1.8.7 Futuro de la investigación de las vacunas contra la tuberculosis bovina.....	31
1.9 Pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	31
1.9.1 Prueba de la tuberculina.....	32
1.9.2 Ensayo de IFN- γ	33
1.9.3 Prueba de ELISA.....	34
1.9.4 Otras pruebas complementarias.....	35
2.0 Principios teóricos de la citometría de flujo.....	35
II. JUSTIFICACIÓN.....	37
III. HIPÓTESIS.....	37
IV. OBJETIVO GENERAL.....	37
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
6.1 Lugares de trabajo, animales de estudio y diseño experimental.....	39
6.2 Ensayo de IFN- γ	40
6.3 Prueba cervical comparativa de la tuberculina (PCCT).....	41
6.4 ELISA-detección de IgG.....	41
6.5 Extracción de ADN de exudado nasal.....	42
6.6 PCR simple y anidada.....	42
6.7 Citometría de flujo.....	43
6.8 Análisis estadístico.....	44
VII. RESULTADOS.....	45
7.1 Ensayo de IFN- γ	45
7.2 Prueba cervical comparativa de la tuberculina (PCCT).....	48

7.3 ELISA-Detección de IgG.....	49
7.4 PCR simple y anidada.....	51
7.5 Citometría de flujo.....	52
7.5.1 Subpoblaciones de células T WC1 ⁺ , CD4 ⁺ y CD8 ⁺	52
7.5.2 Activación de las células T WC1 ⁺ , CD4 ⁺ y CD8 ⁺	54
7.5.3 Producción de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-4) en linfocitos.....	59
VIII. DISCUSIÓN.....	65
IX. CONCLUSIONES.....	85
X. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.....	86
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	88

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) representa una enfermedad infectocontagiosa crónica, causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que se caracteriza por la formación de granulomas típicamente en los pulmones (Apt y Kondratieva, 2008). La enfermedad se transmite esencialmente por inhalación de bacilos en el aire, eliminados en la tos de individuos infectados. La TB es más común en hombres que en mujeres y afecta principalmente a adultos económicamente productivos (WHO, 2011).

A pesar de la disponibilidad de tratamientos altamente eficaces, la TB sigue siendo un importante problema de salud mundial. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la enfermedad como emergencia mundial de salud pública, con un estimado de 7-8 millones de casos y 1.3-1.6 millones de muertes por año. En 2010, se estimaba entre 8.5-9.2 millones de casos y 1.2-1.5 millones de muertes, incluyendo las muertes de personas co-infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por lo tanto, la TB representa la segunda causa de muerte a nivel mundial por enfermedad infecciosa, después del VIH (WHO, 2011).

La OMS estima que un tercio de la población mundial está infectada de forma latente por *M. tuberculosis* y que 5-10 % de los individuos infectados desarrollarán una TB activa durante su vida. La epidemia actual es sostenida y alimentada por dos factores principales: el VIH y el incremento de cepas resistentes de *M. tuberculosis* hacia medicamentos anti-tuberculosos de primera línea, dos factores globales difícilmente controlables (Dye et al., 1999; Wells et al., 2007).

1.2 La tuberculosis humana en México

México cuenta con un Programa Nacional contra la TB humana que sigue los criterios recomendados por la OMS, el cual emplea la vacunación de los recién nacidos con el bacilo Calmette-Guérin (BCG), la detección de casos por baciloscopia y ciclos cortos y rápidos de terapias multi-farmacéuticos (Secretaría de Salud, 1995).

De acuerdo con la información del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, en el país se registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de

TB pulmonar y cerca de 2 mil defunciones por esta causa (CENA VECE, 2007). En 2010, se registraron 18 884 casos nuevos de TB en todas sus formas clínicas, lo que refleja una disminución de 33 % respecto al año 1997. Del total de los casos notificados, 81.6 % correspondieron a la forma pulmonar, 5.7 % ganglionar, 1.6 % meníngea y 11.1 % a otras formas. La mitad de los casos no presentaron ninguna enfermedad concomitante, no obstante, las más frecuentemente son el diabete (20 %), VIH (6 %) y pediatría (5 %). En 2009, se registraron 1872 defunciones por TB pulmonar, lo que refleja una disminución importante (49 %) respecto al año de 1997 (CENA VECE, 2011).

La TB pulmonar presenta patrones de concentración bien definidos en los diferentes estados, con incidencias elevadas principalmente en occidente y Golfo de México e incidencias menores en los estados del centro. Cabe señalar que Baja California, Guerrero y Tamaulipas duplican la incidencia nacional y junto con Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua concentran 70 % de los casos identificados en el país. La incidencia entre los estados varía desde 2.9 por 100 mil habitantes en el Estado de México a 37.7 en Baja California, reflejando diferencias importantes en el riesgo de enfermarse (Secretaria de Salud, 2008).

1.3 Generalidades de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina (TBb) representa una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que afecta principalmente al ganado bovino, huésped natural de la bacteria (Phillips et al., 2003). Por lo general, la enfermedad se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en pulmones y nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio (Neill et al., 1988a). Por eso, se considera que la infección se transmite por vía aérea, mediante partículas de aerosoles conteniendo *M. bovis* (Neill et al., 2001).

El curso de la enfermedad es crónico y los síntomas varían según la distribución de las lesiones en el animal. En muchos casos, faltan síntomas característicos, incluso en las fases avanzadas de la enfermedad, cuando están afectados muchos órganos. Si están presentes, los signos clínicos se pueden manifestar por una tos, cambios de temperatura, disnea y otros síntomas de neumonía de menor intensidad, mostrando evidencias de una disfunción pulmonar. En casos avanzados, los nódulos linfáticos de la cabeza y del cuello son a menudo visiblemente dilatados y pueden obstruir las vías respiratorias, el tracto alimentario

o los vasos sanguíneos. En las fases terminales de la TBb, puede ocurrir una insuficiencia respiratoria aguda (OIE, 2009).

La infección de bovinos por *M. bovis* representa un modelo animal único, aplicable a la TB humana (Waters et al., 2003a). *M. tuberculosis* y *M. bovis* comparten más de 99 % de identidad genética, provocan un cuadro clínico similar y ambas inducen una inmunidad mediada por células (IMC) en el huésped. El modelo de infección con *M. bovis* en bovino ofrece oportunidades para mejorar la comprensión de la inmunopatogénesis de la TB. Conceptos actuales han sido derivados de estudios en TBb. Actualmente, tres herramientas esenciales, desarrolladas en ganado se utilizan para el control de la TB humana y bovina; la vacunación con BCG, la tuberculina como prueba de diagnóstico *in vivo* y el ensayo de interferón-gamma (IFN- γ) como biomarcador *in vitro* de la infección (Pollock y Neill, 2002; Dharmadhikari y Nardell, 2008; Waters et al., 2011). Además, debido a la importancia para la comunidad veterinaria de eliminar la TBb, los estudios de vacunación con BCG en campo permiten ampliar la comprensión de la inmunología de las vacunas y pueden mejorar el conocimiento de la eficacia vacunal en niños recién nacidos, ya que al igual que los becerros, son inmunocompetentes al nacer y desarrollan una inmunidad protectora post-vacunación (Hewinson et al., 2003). Por lo tanto, el modelo de TBb representa una herramienta valiosa y representativa de la TB humana y las asociaciones entre investigadores del campo humano y animal proporcionan beneficios mutuos.

1.4 Salud pública e impacto económico

Existen 3 razones principales para la erradicación de la TBb:

- a) el riesgo de infección de la población humana,
- b) las pérdidas en la productividad de los animales infectados,
- c) las restricciones comerciales impuestas por otros países (Cousins, 2001).

1.4.1 Zoonosis

La TBb se establece como una zoonosis importante en los años 1900, ya que la población humana puede infectarse con *M. bovis* por contacto directo con animales infectados y/o por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados. Antes de la implementación de programas de erradicación, se demostró una relación directa entre la

frecuencia de la TB pulmonar en humanos y la prevalencia de la TBb (Griffith, 1937; Hedvall, 1942). La vacunación de los recién nacidos con BCG, el control y/o erradicación de la enfermedad en el ganado y particularmente la pasteurización de la leche redujo drásticamente la incidencia de infección por *M. bovis* (Cousins, 2001). Actualmente, la correlación directa entre las infecciones por *M. bovis* en bovino y la población humana no está bien conocida, sin embargo, el peligro es mayor en los países en desarrollo, donde la vigilancia y las actividades de control son poco eficientes (De la Rúa-Domenech, 2006). Por ejemplo en México, de los 7 mil millones de litros de leche que se producen, 28 % no se pasteuriza y se consume o se transforma en derivados lácteos, implicando un alto riesgo para la salud pública (NOM, 1995).

En la mayoría de los países, especialmente aquellos en desarrollo, existen datos incompletos y dispersos respecto a la importancia relativa de la infección por *M. bovis* en humano, debido a la escasez de laboratorios capaces de aislar e identificar la especie, ya que el diagnóstico se hace hasta el género y no hasta la especie involucrada (Abalos y Retamal, 2004). En las últimas dos décadas, la infección humana con *M. bovis* ha sido responsable de una pequeña proporción (0.5-7.2 %) de TB en los países industrializados (De la Rúa-Domenech, 2006). Por el contrario, en los países en desarrollo, la infección por *M. bovis* representa probablemente una amenaza importante para la salud pública y algunos autores han especulado que la bacteria podría ser responsable de 10-15 % de los 7-10 millones de nuevos casos de TB humana (Cosivi et al., 1998; Ashford et al., 2001; Ayele et al., 2004).

1.4.2 Economía y producción

Hay más de 50 millones de animales infectados por *M. bovis* en el mundo, causando pérdidas económicas de aproximadamente 3 mil millones de dólares por año (Steele, 1995). En México, las pérdidas económicas debida a la TBb se encuentran alrededor de 450 millones de dólares por año (NOM, 1995). La enfermedad se ha detectado en prácticamente todos los países del mundo, con importantes variaciones en su control según el nivel de desarrollo de los mismos. En países en desarrollo, la TBb se caracteriza por tener un patrón endémico, cuya prevalencia es variable según áreas geográficas y tipos de producción. Entre los países desarrollados, los programas de control han tenido resultados variables y en algunos casos, las incidencias vuelven a elevarse debido a la presencia de reservorios

silvestres de la infección y movimientos de ganado portador no detectado oportunamente (Gallagher y Clifton-Hadley, 2000; Menzies y Neill, 2000; Gortazar et al., 2003).

En bovinos, la enfermedad genera una disminución en la productividad y se ha reportado que además de las pérdidas por muertes de los animales, la TBb disminuye la producción de leche en un 17 %, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia en un 15 %, la fertilidad en un 6 % y causa el decomiso de canales en rastros. Asimismo, la TBb genera limitaciones en el comercio internacional de productos pecuarios, trayendo como consecuencias el deprecio de los productos, descontrol en el mercado interno y disminución de los precios (WHO, 1994).

1.4.3 Campaña contra la tuberculosis bovina

En América Latina, la mayoría de los países emprendieron iniciativas para el control de la TBb, sin embargo, se estima que 24 % de la población bovina no se encuentra bajo ningún sistema de control (Gil y Samartino, 2000). En general, las prevalencias más altas se encuentran en los rebaños lecheros, siendo el tipo de ganado más importante en la transmisión de *M. bovis* al ser humano. El riesgo representado por el ganado de carne, por sus sistemas productivos particulares, es mucho menor, tanto para la manutención de la infección como para su transmisión a las personas (Abalos y Retamal, 2004). En México, se han reportado prevalencias del 16-19 % en ganado lechero (Milián et al., 2000; Enríquez-Cruz et al., 2010; SENASICA, 2011).

El control de la TBb está basado en la prueba diagnóstica de la tuberculina y la eliminación de los animales positivos (Morrison et al., 2000). En México, se lleva a cabo una campaña para el control y la erradicación de la enfermedad. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana, los animales positivos a la prueba de la tuberculina deben ser sacrificados (NOM, 1995), causando pérdidas económicas importantes en hatos lecheros de altas prevalencias, ya que no existe un programa de compensación financiera (López-Valencia et al., 2010). Esta estrategia permitió eliminar de algunos países la infección en la población bovina, sin embargo, no ha tenido un éxito general. Numerosas investigaciones han mostrado que existen reservorios en la fauna silvestre (tejón, jabalí y zarigüeya) de algunos países, que pueden actuar como foco de infección del bovino y representar un riesgo para el humano (Corner, 2006). En América Latina, no existen antecedentes que

sugieran un escenario parecido, probablemente debido a las tasas mayores de infección que aún prevalecen en bovinos, enmascarando focos de TB asociados a la transmisión desde la fauna silvestre (Abalos y Retamal, 2004).

Los fracasos en el control de la enfermedad se explican principalmente por fallas en el diagnóstico, la existencia de fuentes incontrolables de infección o el manejo de los animales infectados, lo cuales permanecen en los predios o son comercializados en otros planteles productivos (Morris et al., 1994). No obstante, los esfuerzos realizados en la Campaña Nacional contra la TBb han logrado que 83.11 % del territorio nacional (Fig. 1) se encuentre en fase de erradicación (SENASICA, 2011). Estudios han demostrado que la inmunización de bovinos con BCG induce protección contra *M. bovis* y la vacunación del ganado se ha propuesto como una alternativa para el control de la TBb (Buddle et al., 1995a, b, 1999; Vordermeier et al., 2001a, 2002).



Figura 1. Situación actual de la tuberculosis bovina en México (NOM, 1995).

1.5 Características de las micobacterias patógenas

1.5.1 Género y especies

Las bacterias del género *Mycobacterium* pertenecen al orden de los actinomicetos (Tabla 1). Sus miembros poseen excepcionalmente un alto contenido (61-71%) de guanina + citosina en su ADN genómico, además de un alto contenido de lípidos en su pared celular. Otros géneros relacionados (*Corynebacterium*, *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Dietzia*) presentan una estructura de la pared celular similar y una cierta similitud fenotípica (Palomino et al., 2007).

El complejo *M. tuberculosis* incluye 7 especies estrechamente relacionadas (Tabla 1), las cuales son patógenos obligatorios que causan la TB. Algunos miembros infectan exclusivamente al humano (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*), mientras que otros son especies adaptadas a animales como bovinos (*M. bovis*), cabras (*M. caprae*), roedores (*M. microti*) o focas (*M. pinnipedii*). Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* comparten 99.9 % de similitud a nivel de nucleótidos (Boddinghaus et al., 1990; Sreevatsan et al., 1997). Sin embargo, difieren ampliamente en términos de huéspedes, fenotipos y patogenicidad. El genoma de *M. tuberculosis* muestra menos de 0.05 % de diferencia con el de *M. bovis* (Brosch et al., 2002; Garnier et al., 2003).

Tabla 1. Linaje de los agents de TB (Palomino et al., 2007)

Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genero	<i>Mycobacterium</i>
Especies	<i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. bovis</i>
	<i>M. africanum</i>
	<i>M. microti</i>
	<i>M. canetti</i>
	<i>M. caprae</i>
	<i>M. pinnipedii</i>

1.5.2 La envoltura micobacteriana

Las micobacterias se caracterizan por tener una envoltura celular de estructura única, la cual causa una marcada resistencia al sistema inmune del huésped y a los antibióticos (Kolattukudy et al., 1997). La resistencia a sustancias antimicrobianas se atribuye a su alto contenido en lípidos únicos, los cuales causan una baja permeabilidad y una alta hidrofobicidad (Brennan y Nikaido, 1995). La patogenicidad y la supervivencia de las micobacterias en diferentes ambientes se han atribuido a la variación de los componentes estructurales de la pared celular (Guenin-Macé et al., 2009).

La envoltura de *M. tuberculosis* representa una organización molecular compleja, constituida por una estructura similar a una cápsula, una pared celular y una membrana plasmática (Brennan, 1989). La capa externa de la envoltura, similar a una cápsula, sirve de protección contra múltiples factores externos y tiene una interacción directa con el sistema inmune (Warwick et al., 1994). Además, esa estructura contiene el factor cuerda (trehalosa 6,6-dimicolato), que consiste en un residuo trehalosa y un disacárido de glucosa, unidos a ácidos micólicos (Fig. 2). Es abundante en las micobacterias patógenas y recibe ese nombre debido a que en cultivos, las bacterias forman agregados semejantes a cordones. Dependiendo de las especies y cepas, las moléculas de la cápsula varían en sus características y composición (Brennan, 1989, 2003; Wolinsky, 1990; Besra et al., 1994).

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%), los cuales representan una barrera efectiva frente a muchos agentes antimicrobianos convencionales (Brennan, 1989; Draper, 1998). Está constituida por el complejo macromolecular ácidos micólicos arabinogalactano-peptidoglucano (Crick et al., 2001; Brennan, 2003). Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para las micobacterias y bacterias de géneros relacionados (*Nocardia* y *Corynebacterium*) y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura (Steck et al., 1978).

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias, los derivados de fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como el lipoarabinomanano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB (Brennan, 1989). Además del LAM, otros lípidos únicos anclan de forma no covalente la membrana celular y tienen un papel importante en la virulencia (Meena y Rajni, 2010).

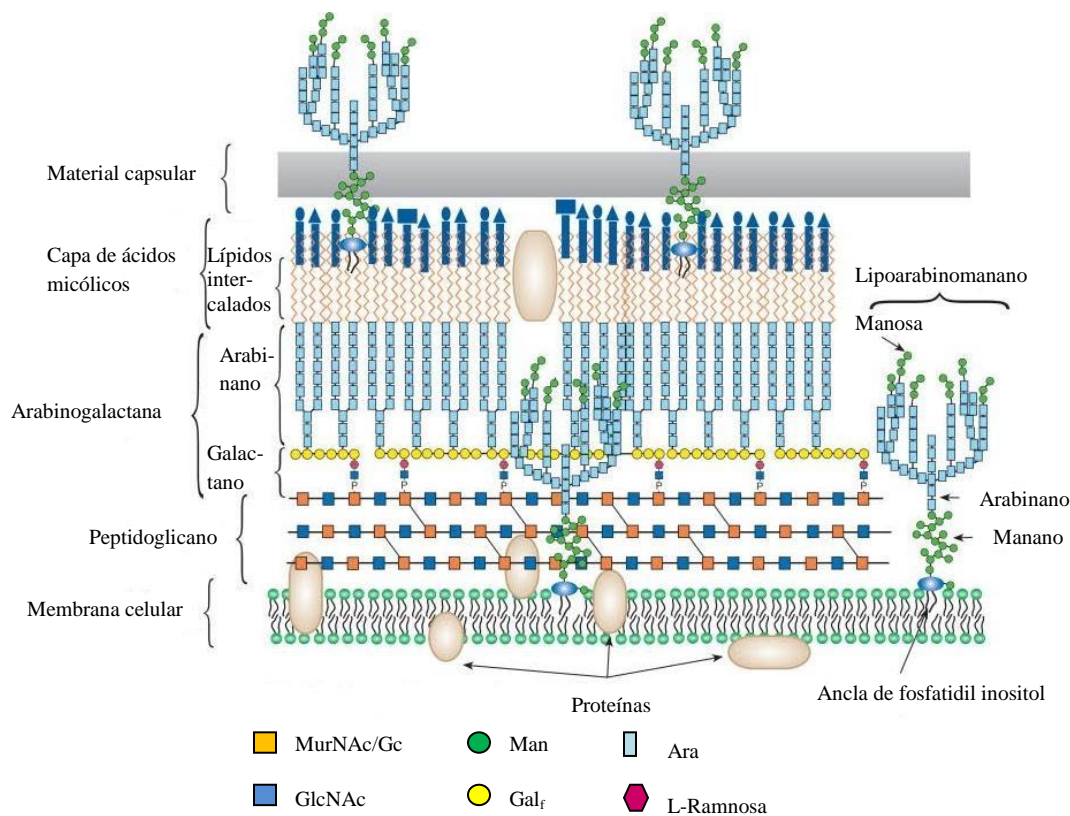


Figura 2. Estructura de la pared celular de las micobacterias (Brennan y Crick, 2007).

1.5.3 Micobacteriología

Dependiendo de las condiciones de crecimiento y del tiempo de cultivo, los bacilos pueden variar en tamaño y forma, desde cocobacilos cortos a bacilos largos. Los bacilos miden 3-5 μm de longitud y 0.2-0.6 μm de ancho, son inmóviles y no esporulados. A diferencia de las bacterias Gram negativas, las micobacterias no poseen una membrana adicional en la capa externa de la pared celular y son estructuralmente más relacionadas con bacterias Gram positivas, sin embargo, no pertenecen a ese grupo, ya que las moléculas de su pared son lípidos y no proteínas o polisacáridos. Estos lípidos (ácidos micólicos) les confieren la propiedad de resistir a la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos como el carbol fucsina (Fig. 3).

El bacilo tuberculoso puede crecer en medios de cultivos agregándoles glicerol como fuente de carbono, iones amonio y asparagina como fuente de nitrógeno y micronutrientes. *M. tuberculosis* es capaz de metabolizar el glicerol en piruvato, a

diferencia de *M. bovis*, ya que no todos los genes requeridos para la formación de piruvato son funcionales. Por lo tanto, su crecimiento es mejorado con piruvato. La albumina promueve el crecimiento, uniéndose a elementos tóxicos presentes en el medio. Otros componentes pueden utilizarse, como el Tween 80, que dispersa los bacilos en medios líquidos. La biotina y la catalasa han sido incorporadas en medios Middlebrook para estimular la reactivación de los bacilos (Wayne, 1982). En condiciones favorables, *M. tuberculosis* se divide cada 12-24 horas, representando un tiempo de generación lento en comparación con la mayoría de las bacterias (15 minutos a 1 hora). El crecimiento lento se debe parcialmente a la impermeabilidad de la pared celular, la cual limita la absorción de nutrimentos y explica la evolución crónica de la enfermedad.

El alto grado de conservación de secuencia entre los miembros del complejo *M. tuberculosis* hace compleja la diferenciación de las especies. Los aislados de *M. bovis* son resistentes a la pirazinamida, a diferencia de la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*. *M. bovis* es sensible a la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico a diferencia de *M. tuberculosis* (Palomino et al., 2007). Todas las micobacterias producen niacina, no obstante, *M. tuberculosis* acumula grandes cantidades de niacina por su incapacidad de procesarla (Kasarov, 1972). La catalasa-peroxidasa termolábil representa un marcador del complejo *M. tuberculosis*. Finalmente, a diferencia de *M. bovis*, *M. tuberculosis* reduce el nitrato, que conduce a la acumulación de nitrito (Palomino et al., 2007).

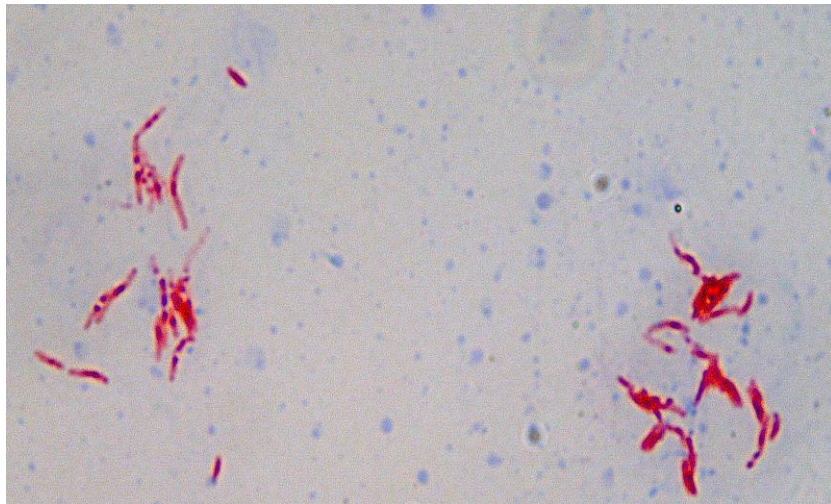


Figura 3. Tinción Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium bovis* 1000x (Quevillon, 2012).

1.6 Patogénesis de la tuberculosis bovina

La mayoría de la información actualmente disponible sobre la patogénesis de la TBb ha sido derivada de bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, lo cual tiene la ventaja del uso del hospedero natural de *M. bovis* (Kaufmann, 2003). Existe mucho interés en comprender los procesos que ocurren durante los cambios patológicos y la respuesta inmune hacia *M. bovis*. Para la comprensión completa de la TBb, es necesario disponer de información sobre aspectos tales como fuentes, rutas y dosis de infección, excreción del patógeno, patología y latencia (Neill et al., 1994a).

1.6.1 Fuentes y rutas de infección

La existencia de la TB se ha reportado en muchos mamíferos, incluyendo animales ungulados, primates y una gran variedad de especies exóticas (Lepper y Corner, 1983; Thoen et al, 1984; Pritchard, 1988). Estos animales representan fuentes potenciales de infección para el ganado, además de pastos contaminados, agua y fómites donde *M. bovis* puede sobrevivir (Mitscherlich y Marth, 1984). Los países que no han tenido éxito en erradicar la TBb han frecuentemente identificado fuentes de infección asociadas a la fauna local. Sin embargo, se ha reportado que la TB está normalmente ausente de la fauna silvestre, excepto cuando han existido contactos previos con el ganado y/o el hombre (Neill et al., 1994a). Por lo tanto, el bovino tuberculoso representa la fuente mayor de infección de la población bovina (McIlroy et al, 1986; Neill et al, 1989). Las condiciones bajo las cuales los bovinos transmiten la infección son poco conocidas, pero dependen probablemente de la generación de aerosoles, del número de bacilos excretados, de la densidad y el manejo de los rebaños (Pollock et al., 2006).

Existen varias vías por las cuales el ganado se puede infectar con *M. bovis*. La edad, el medio ambiente, el clima y el manejo de los animales son factores que pueden tener una influencia significativa. En casos de campo, la distribución de las lesiones muestra la participación predominante del tracto respiratorio y nódulos linfáticos asociados (Pritchard, 1988; Crews, 1991; Corner, 1994; Neill et al., 1994a, Whipple et al., 1996). Por lo tanto, la inhalación de *M. bovis* representa la ruta más probable de infección en bovinos. Además, modelos experimentales implicando desafío nasal o traqueal apoyan la efectividad de la ruta aerógena para la transmisión entre bovinos (Neill et al., 1988b; Buddle et al., 1994;

Cassidy, 1998; Cassidy et al., 1998, 1999a). La ingestión de *M. bovis* directamente de animales infectados, pastos contaminados, agua o fomites es considerada como una fuente de infección secundaria (Menzies y Neill, 2000). Las infecciones congénitas y la transmisión vertical a becerros, al igual que infecciones por ubre no son comunes en regiones con programas de erradicación intensivos. En casos extremadamente raros, la transmisión genital puede ocurrir (Neill et al., 1994a). Interesantemente, las investigaciones patológicas del tracto respiratorio superior han revelado la participación de las amígdalas dentro de los patrones clásicos de la enfermedad (Guarda et al., 1995; Cassidy et al., 1998, 1999b), indicando que el proceso preciso por el cual el ganado se infecta no es completamente entendido (Pollock y Neill, 2002).

1.6.2 Dosis mínima de infección

Las dosis de *M. bovis* con las cuales el ganado está expuesto en el campo son desconocidas, pero probablemente muy variables y repetidas. Existe una gran variación de dosis mínima infecciosa reportada en bovino, debido a diferencias en las especies de bovino, cepas bacterianas y vías de inoculación utilizadas. La dosis mínima de infección es altamente dependiente de la ruta de infección (Palmer y Waters, 2006). Por ejemplo, una revisión de estudios realizada por Francis (1947) reveló que dosis de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) eran requeridas para infectar el ganado por vía oral, mientras que tan solo 1-5 bacilos eran necesarios por vía aerógena. Estudios efectuados por Griffin y Dolan (1995), mostraron que 4×10^5 bacilos eran requeridos para una infección vía respiratoria y 1000 veces más por vía oral. Un modelo matemático de excreción de *M. bovis* sugiere que 1 solo bacilo es suficiente para provocar la infección vía aerosol (Neill et al., 1991), mientras que otro estudio demostró que solo 5000 UFC administrados en el alimento eran necesarios (Palmer et al., 2004). Estudios recientes han demostrado que 1 UFC (6-10 bacilos) es suficiente para inducir una enfermedad similar a la producida en bovinos infectados naturalmente, con una patología equivalente a la observada en animales que recibieron dosis de hasta 1000 UFC (Dean et al., 2005; Johnson et al., 2007). Por lo tanto, dosis muy bajas de bacilos, transmitidas por aerosol, son capaces de provocar la TBb.

1.6.3 Excreción de *M. bovis*

La excreción de *M. bovis* en leche, orina o heces es considerada como insignificante en TBb (Hardie y Watson, 1992; Morris et al., 1994), mientras que la excreción por el tracto respiratorio y la inhalación de gotas por vía aerógena es reconocida como la vía principal de transmisión (Neill et al., 1994a). Evidencias de la excreción se han demostrado en estudios de campo, donde más de 20 % del ganado tuberculoso tenía la bacteria en fosas nasales (Rempt, 1954; De Kantor y Roswurm, 1978; McIlroy et al., 1986; Neill et al., 1988a). De igual forma, en otro estudio se demostró que 50 % del ganado positivo a la prueba de la tuberculina poseían *M. bovis* en moco nasal o tejidos respiratorios tales como la mucosa nasal, cornetes o amígdalas (Cassidy et al., 1999a). Sin embargo, la ausencia de *M. bovis* en secreciones nasales no significa que el ganado no está excretando (Pollock y Neill, 2002). Estudios experimentales demostraron que después de un cierto periodo post-inoculación (80-100 días), se puede aislar la micobacteria consecutivamente de las secreciones nasales durante un tiempo (10-60 días), antes de que la excreción se vuelva intermitente, con tiempos que varían de 6 a 25 semanas entre cada excreción. El periodo inicial en el cual no se detecta *M. bovis* refleja posiblemente cambios fenotípicos en el organismo y/o interacciones con el huésped. Este periodo de adaptación parece ser inversamente relacionado con la dosis de infección (Neill et al., 1988a; 1989; 1991).

Stamp (1948) postuló que la gran mayoría de bovinos infectados excretan bacilos directamente de los pulmones. Gallagher (1980) declaró que el ganado infectado, con lesiones en los nódulos linfáticos del tracto respiratorio no excretaban organismos sin la presencia de lesiones pulmonares concomitantes. Por lo tanto, muchos investigadores han categorizado la TBb como abierta o cerrada (Neill et al., 1994a). Los casos abiertos son aquellos que las lesiones, principalmente en el pulmón, permiten la excreción de *M. bovis*, mientras que los casos cerrados no promueven la excreción. No obstante, otros investigadores comentaron que es imposible categorizar la TBb como abierta o cerrada, ya que en muchos casos no se detectan lesiones pulmonares macroscópicas sino lesiones pequeñas, detectables después de un examen meticuloso (Palmer y Waters, 2006). La realización de exámenes meticulosos ha revelado que 73 % de los bovinos con lesiones en los nódulos linfáticos tenían lesiones pulmonares. En 63 % de los casos, solamente una lesión pulmonar estaba presente y 70 % de estas lesiones eran menores a 1 cm de diámetro.

Por lo tanto, los autores concluyeron que todo el ganado con lesiones en nódulos linfáticos debería ser considerado como capaz de excretar *M. bovis* (McIlroy et al., 1986).

Finalmente, se ha reportado el aislamiento de *M. bovis* en secreciones respiratorias de animales infectados experimentalmente, sin lesiones macroscópicas, negativos a la prueba de la tuberculina, pero positivos en ensayos *in vitro* (Neill et al., 1992) y se demostró que hasta 10 % del ganado sin lesiones visibles puede ser positivo por cultivo (Corner, 1994). La existencia de bovino infectado, que no responde a la prueba de la tuberculina tradicional tiene implicaciones obvias para los programas de control y erradicación y cuestiona nuestra comprensión de las etapas iniciales de la enfermedad (Neill et al., 1994a).

1.6.4 Patología

Una lesión primaria se establece tras la interacción del huésped con el patógeno. Esta lesión, junto con la lesión del nódulo linfático cercano, se denomina complejo primario. El centro de la lesión está constituido por células epiteloides y gigantes tipo Langhan, derivadas de macrófagos, rodeadas de una zona de linfocitos, células plasmáticas y monocitos. Con la progresión de la lesión, se desarrolla una zona de fibroblastos, que rodea la lesión mediante la síntesis de colágeno, además de una región de necrosis caseosa central con mineralización. Macroscópicamente, el granuloma es por lo general un nódulo firme de color blanco o amarillento, con un centro necrótico caseoso amarillento. La calcificación en zonas de necrosis caseosas es común (Francis, 1947, 1958; Stamp, 1959; Dungworth, 1985) y la licuefacción y cavitación del granuloma han sido descrito en casos avanzados de TBb (Medlar, 1940). En bovinos, las lesiones del complejo primario se pueden curar por completo, progresar o persistir de manera latente (Fig. 4). La ruta de infección y la respuesta inmune del animal, junto con la virulencia del microorganismo determinan la manifestación de la enfermedad (Neill et al., 1994a).

Las lesiones primarias pueden ser únicas o múltiples, afectar a los pulmones izquierdo o derecho y ser uni- o bi-laterales y ocurren principalmente en el tercio distal de los lóbulos caudales. En general, las lesiones se encuentran en asociación con los focos pulmonares primarios, en nódulos linfáticos bronquiales y/o mediastinales, con las glándulas linfáticas drenando directamente la zona pulmonar inicialmente afectada (Medlar, 1940; Stamp, 1948; McIlroy et al, 1986). Con la progresión de la infección, los focos iniciales pueden

unirse para formar áreas más grandes de bronconeumonía caseosa y la difusión intrapulmonar puede ocurrir por las vías respiratorias o por diseminación hematológica, causando nuevas lesiones. Además, la diseminación hematológica desde los pulmones puede generar metástasis en órganos como hígado, riñones, ubre y meninges (Neill et al., 1994a).

1.6.5 Latencia

El concepto de infección latente es bien establecido en TB humana. Clínicamente, la latencia se define como la persistencia de una lesión tuberculosa sin progresión, provocada por la respuesta inmunitaria del huésped, conteniendo micobacterias viables que no se reproducen, en un individuo sin síntomas (Wayne y Hayes, 1996; Parrish et al., 1998; Orme, 2001; Gómez y McKinney, 2004). Se ha estimado que un tercio de la población humana mundial tiene este tipo de infección (Murray, 1999). Los individuos afectados no demuestran signos clínicos, no transmiten la enfermedad y muestran una prueba de la tuberculina positiva o evidencias de lesiones pulmonares antiguas en el examen radiológico. Tales sujetos son considerados fundamentales en la propagación de la TB, por reactivación de la infección, que sea por vejez o por inmunosupresión (Cassidy, 2006).

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* pueden entrar en un estado de latencia bajo condiciones *in vitro*, a diferencia de las no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (Wayne y Sohaskey, 2001). Se ha demostrado que tanto *M. tuberculosis* como *M. bovis* BCG pueden entrar en latencia *in vitro* y se cree que *M. bovis* virulenta también (Cunningham y Spreadbury, 1998). En humanos, *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden dar lugar a una forma latente de TB, que se puede reactivar décadas después (Fritsche et al., 2004). Se cree que la cavitación es la condición que induce un estado metabólicamente y morfológicamente de latencia *in vivo*. Se han reportado granulomas caseosos que conducen a la cavitación en bovinos, sin embargo, no se ha demostrado que las bacterias entran en un verdadero estado de latencia (van Rhijn et al., 2008).

Es confuso si la latencia y la reactivación ocurren en TBb, sin embargo, se ha sugerido que estos procesos también existen en la población bovina (Pollock y Neill, 2002). A partir del análisis del tamaño y distribución de las lesiones, Francis (1947) afirmó que la exacerbación de la enfermedad podría ocurrir después de periodos de inactividad. Existe información más reciente que apoya el concepto de latencia. Por ejemplo, se ha demostrado

la existencia de bovinos positivos a la prueba de la tuberculina o IFN- γ sin lesiones (Neill et al., 1994a; Monaghan et al., 1997a) o bovinos positivos al cultivo bacteriológico sin lesiones (Whipple et al., 1996; Cassidy et al., 1999b) o animales positivos a IFN- γ y negativos a la prueba de la tuberculina, que subsecuentemente se convierten en positivos, con lesiones al sacrificio (Monaghan et al., 1997b). Similarmente, durante el programa de erradicación de la TBb en Australia, animales previamente no detectados fueron identificados como positivos años después en algunos rebaños (Cousins et al., 1998). No obstante, es desconocido si estas manifestaciones representan latencia y reactivación de la enfermedad en estos animales. Por la tanto, la existencia de dichos animales, de manera análoga a la enfermedad en humano, genera dificultades importantes para la erradicación de la TBb, a través de su capacidad de perpetuar la infección en el caso de reactivación.

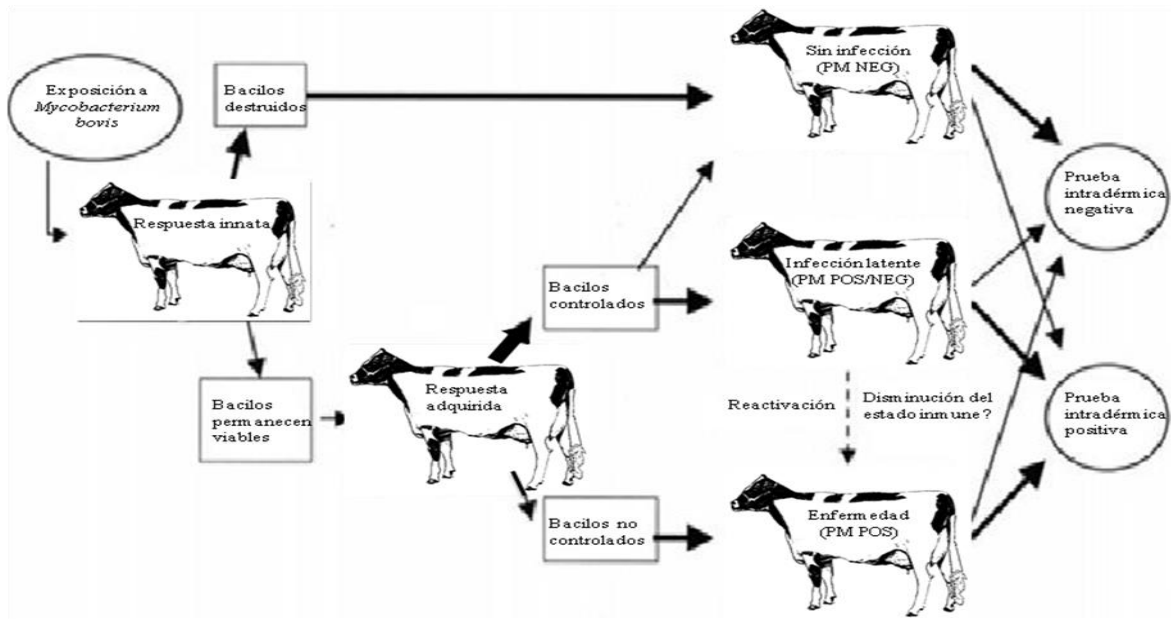


Fig. 4. Diagrama mostrando las consecuencias más probables derivadas de la exposición del ganado a *M. bovis*. Cuando dos eventos son posibles, la flecha más gruesa representa (arbitrariamente) la vía considerada más común. PM POS/NEG indica positivo o negativo a la evaluación post-mortem y análisis de laboratorio (Pollock y Neill, 2002).

1.7 Inmunología de la tuberculosis

Durante la última década, se ha conocido mucho sobre los mecanismos de la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis*. El primer paso es el reconocimiento de la micobacteria como patógeno invasor, seguido por la activación de la respuesta innata y la iniciación subsecuente de la respuesta adaptativa (Kleinnijenhuis et al., 2011).

1.7.1 Reconocimiento de la micobacteria por el sistema inmune

Después de la inhalación de aerosoles infectados con bacilos tuberculosos, los macrófagos residentes, principales células hospederas para su crecimiento intracelular, fagocitan la bacteria, a través de estructuras microbianas específicas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La pared celular representa la primera estructura en tener contacto y en ser reconocida por el sistema inmune (Pollock et al., 2006; Kleinnijenhuis et al., 2011) y se han identificado varios PAMPs en *M. tuberculosis*, incluyendo LAM, lipoproteínas y factores solubles (Means et al., 1999a,b). El reconocimiento de los PAMPs se realiza a través de moléculas denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), expresados principalmente en las células inmunitarias, en sus membranas celulares e intracelulares (Akira et al., 2001). Después del reconocimiento de la micobacteria, cascadas de señalización intracelulares son activadas, que conducen a la activación del factor de transcripción NF- κ B y a la producción de quimiocinas y citocinas pro- y anti-inflamatorias (Fig 5). La señalización inducida depende principalmente del tipo de PRRs implicado en el reconocimiento del patógeno (Kleinnijenhuis et al., 2011). Un gran número de PRRs son críticos en el reconocimiento y la fagocitosis de las micobacterias, como los receptores del complemento (CR), de manosa (MR), específicos de células dendríticas (DC-SIGN), de la proteína del surfactante A y D, basurero clase A, de lectina de unión a manosa, tipo Toll (TLRs), con dominio de oligomerización de nucleótido 2 (NOD2) y posiblemente de dectina-1 (Ernst, 1998; Ferguson y Schlesinger, 2000; Koppel et al., 2005; Berrington y Hawn, 2007). En humanos, los receptores más importantes para el reconocimiento de *M. tuberculosis* son el MR y CR3 en macrófagos (Schlesinger, 1993; Kang et al., 2005) y DC-SIGN en células dendríticas (Tailleux et al., 2003).

Se ha reportado que el CR y el receptor basurero clase A están principalmente implicados en la fagocitosis de *M. tuberculosis* y que la entrada de la bacteria por estos receptores es silenciosa, es decir que no desencadena los mecanismos microbicidas de los fagocitos. Otros receptores (TLRs, NOD2, MR, DC-SIGN, dectina-1) se asocian más al reconocimiento inmunológico. La activación a través de los TLRs, NOD2 y dectina-1 inicia esencialmente una respuesta pro-inflamatoria, mientras que la señalización a través de MR

o DC-SIGN tiene principalmente una respuesta anti-inflamatoria o función de modulación (Korbel et al., 2008; Kleinnijenhuis et al., 2011).

Los TLR representan una familia constituida de 12 miembros en mamíferos, que se expresan en membranas celulares y de vesículas endocíticas, principalmente de macrófagos y células dendríticas (Kleinnijenhuis et al., 2011). Aunque la interacción de los PAMPs de *M. tuberculosis* con los TLRs conduce a la fagocitosis, la interacción en sí no provoca la ingestión inmediata de la micobacteria, sino señales que inducen la transcripción de genes involucrados en las defensas innatas del huésped, principalmente la producción de óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-12 (Akira, 2003). Los TLRs involucrados en el reconocimiento de *M. tuberculosis* son TLR2, TLR4, TLR9 y posiblemente TLR8 (Means et al., 1999b; 2001; Tapping y Tobias, 2003; Bafica et al., 2005; Bulut et al., 2005; Davila et al., 2008). El TLR2 forma heterodímeros con ambos TLR1 o TLR6 y reconoce glicolípidos, glicoproteínas y lipoproteínas de la pared celular micobacteriana (Jones et al., 2001; Means et al., 2001; Thoma-Uszynski et al., 2001). Se cree que TLR2 es importante en las defensas innatas del huésped, a través de la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-12 (Underhill et al., 1999; Bafica et al., 2005; Pompei et al., 2007; Kleinnijenhuis et al., 2009). El TLR4 es activado por la proteína de choque térmico 60/65 (Ohashi et al., 2000; Bulut et al., 2005), secretada por varias especies de micobacterias y estaría implicado en la producción de TNF- α (Means et al., 1999b, 2001). Las funciones de TLR8 y de TLR9 no están bien definidas durante la infección con *M. tuberculosis*. Se han sugerido funciones redundantes de los TLRs en la defensa del huésped contra las micobacterias (Kleinnijenhuis et al., 2011) y a pesar del papel fundamental en el reconocimiento de *M. tuberculosis*, la función de cada TLR es solamente parcialmente comprendida (Berrington y Hawn, 2007).

1.7.2 Respuesta inmune innata

El reconocimiento de micobacterias patógenas por macrófagos residentes inicia la respuesta innata, que consiste en la activación celular y la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α y quimiocinas (Law et al., 1996; Tsao et al., 1999; Kleinnijenhuis et al., 2011). El TNF- α controla la infección disminuyendo la carga bacteriana y es importante en la formación del granuloma (Kindler et al., 1989; Flynn et al.,

1995), mientras que IL-1 β e IL-6 se asocian a la producción temprana de IFN- γ y a la resistencia de ratones a *M. tuberculosis* (Ladel et al., 1997; Juffermans et al., 2000; Saunders et al., 2000). Las citocinas IL-12 e IL-18 son producidas por macrófagos reclutados y activados y actúan en sinergia, induciendo la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK), además de la producción de IFN- γ en células NK y T, dirigiendo la respuesta inmune hacia el tipo Th1. El IFN- γ activa a los macrófagos, promoviendo la destrucción bacteriana mediante sustancias microbicidas y citocinas (Trinchieri, 1997; North y Jung, 2004) e incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II), mejorando la presentación de antígenos (Kleinnijenhuis et al., 2011). Por otro lado, las quimiocinas, producidas por leucocitos, macrófagos y células epiteliales, inducen la migración direccional de los leucocitos (Del Pozo et al., 1996; Sauty et al., 1999; Wickremasinghe et al., 1999). Conjuntamente con la respuesta inflamatoria, las células regulatorias (macrófagos activados) y citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , controlan la respuesta inmune, evitando una inmunopatología (Korbel et al., 2008).

Existen diversos mecanismos involucrados en la destrucción de *M. tuberculosis* en los fagosomas de macrófagos activados, como la producción de intermediarios reactivos de oxígeno o nitrógeno, la acidificación del fagosoma y su fusión con el lisosoma (van Crevel et al., 2002). Además, la proteína asociada a la resistencia natural de los macrófagos-1 (Nrampl), de la familia de transportadores de iones metálicos, está implicada en la destrucción de *M. tuberculosis* (Blackwell et al., 2000), ya que después de la fagocitosis, Nrampl se expresa en la membrana de los fagosomas y captura iones metálicos involucrados en la generación de radicales antimicrobianos (Zwilling et al., 1999). La apoptosis en fagocitos, inducida por el TNF- α , constituye otro mecanismo que limita el crecimiento de *M. tuberculosis* (Keane et al., 1997; Placido et al., 1997). Finalmente, la autofagia, un proceso celular en el cual componentes citoplasmáticos (organelos y patógenos intracelulares) son secuestrados en un autofagosoma y fusionados a los lisosomas para su degradación (Gutiérrez et al., 2004; Kundu y Thompson, 2008).

En respuesta a estímulos inflamatorios, los neutrófilos representan las primeras células en migrar de la sangre hasta el sitio de infección (Segal, 2005; Appelberg, 2007). Su papel durante una infección micobacteriana es muy controversial en humanos. Por un lado, se ha reportado que la quimiocina IL-8 es masivamente producida en pulmones de pacientes con

TB activa, causando la acumulación de neutrófilos, sin efecto sobre el crecimiento micobacteriano. Por otro lado, la mayoría de las publicaciones sugieren que los neutrófilos se activan, secretan varias citocinas (IFN- γ y TNF- α) y quimiocinas (IP-10, MCP-1 y MIP-1 α/β) en respuesta a *M. tuberculosis* (Riedel y Kaufmann, 1997; Kasahara et al., 1998; Aleman et al., 2001; Kisich et al., 2002), restringiendo el crecimiento micobacteriano *in vitro* (Brown et al., 1987; Majeed et al., 1998).

Las células NK poseen una función citotóxica y secretan citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ . Estas células comparten enzimas como granulicina, granzima y perforina con las células T citotóxicas, que al ser liberadas inducen la lisis de la célula blanco y/o de *M. tuberculosis* (Stenger et al., 1999; Krensky, 2000). Además, se ha reportado que restringen el crecimiento micobacteriano de manera dependiente de apoptosis (Brill et al., 2001; Millman et al., 2008). Aunque en los últimos años se comprobó que las células NK son capaces de promover una respuesta vigorosa contra *M. tuberculosis*, su función exacta *in vivo* sigue siendo enigmática (Korbel et al., 2008). Mientras que un estudio demostró que las células NK de pacientes tuberculosos podían generar una producción abundante de IFN- γ (Schierloh et al., 2007), otro estudio no identificó diferencia entre pacientes e individuos no infectados (Kulpraneet et al., 2007). Asimismo, en ratones infectados con *M. tuberculosis*, las células NK se acumularon en pulmones y secretaron IFN- γ en las primeras semanas post-infección. Sin embargo, la eliminación de estas células antes y durante la infección no afectó el crecimiento micobacteriano, indicando que a pesar de responder adecuadamente a la infección, podrían tener funciones redundantes con otras células inmunitarias, como las células T productoras de IFN- γ (Junqueira-Kipnis et al., 2003).

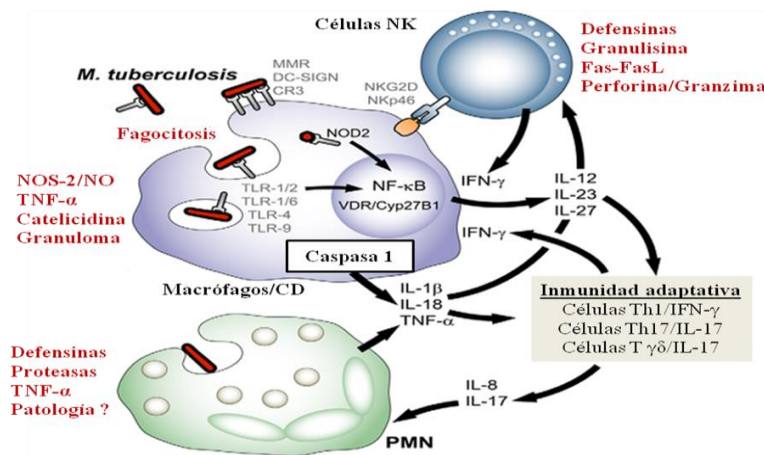


Figura 5. Inmunidad innata hacia *M. tuberculosis* (Korbel et al., 2008).

1.7.3 Respuesta inmune adaptativa

Es conocido que la inmunidad innata y la adaptativa están estrechamente conectadas. Los macrófagos, primeras células involucradas en la respuesta innata hacia las micobacterias, desempeñan un papel crucial en la inducción de la inmunidad adaptativa (Fig. 6). Tres procesos principales contribuyen al comienzo de la inmunidad adaptativa: la presentación de antígenos, la coestimulación y la producción de citocinas por células efectoras (Hirsch et al., 1999; van Crevel et al., 2002).

La presentación de antígenos micobacterianos implica diferentes mecanismos: las moléculas del CMH-II de macrófagos presentan péptidos micobacterianos a las células T CD4⁺, mientras que las moléculas del CMH-I, presentes en todas las células nucleadas, presentan péptidos a las células T CD8⁺ (Mazzaccaro et al., 1996). Además, las moléculas del CMH-I no polimórficas como CD1, que se expresan en macrófagos, pueden presentar lipoproteínas micobacterianas a las células T restringidas al CD1, permitiendo la activación de más células T al inicio de la infección (Lewinsohn et al., 1998). La expresión del CMH es un proceso dinámico regulado por citocinas; las pro-inflamatorias, principalmente IFN- γ , estimulan su expresión, mientras que las anti-inflamatorias la inhiben (van Crevel et al., 2002). La presencia de un alelo particular del CMH-I y/o II en un individuo determina su capacidad a responder a antígenos específicos. Algunos variantes alélicos de CMH se han asociados con la TB (Goldfeld et al., 1998; Ravikumar et al., 1999) y su polimorfismo explicaría la vulnerabilidad de ciertas poblaciones (Sousa et al., 1997).

La activación de las células T depende del reconocimiento por el TCR de péptidos antigénicos específicos unidos al CMH en la superficie de los macrófagos. Sin embargo, la unión del TCR sola no es suficiente para activar a las células T y puede llevar a la apoptosis o a un estado de anergia (Schwart, 1990). Una proliferación de las células T óptima y la adquisición de las funciones efectoras requieren señales de la molécula de coestimulación CD28. Después de su unión a sus ligandos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), CD28 incrementa la proliferación celular, incrementando la transcripción de IL-2 y de la proteína anti-apoptótica Bcl-X (Acuto y Michel, 2003). Una molécula estrechamente relacionada, CTLA-4, se une a los mismos ligandos que CD28 pero con una afinidad mucho mayor (Linsley et al. 1994; Collins et al., 2002). A diferencia de CD28, CTLA-4 restringe la activación celular, inhibiendo la producción de IL-2, la expresión del receptor de IL-2 y la

progresión del ciclo celular. Por eso, CTLA-4 se expresa tardíamente durante la expansión clonal de las células T activadas mediante CD28 (Egen y Allison, 2002).

En humanos como en bovinos, la inmunidad hacia la TB es predominantemente una IMC en fases tempranas de la infección, mientras que esta respuesta disminuye y es eventualmente remplazada por una respuesta humoral con la progresión de la enfermedad (Lenzini et al., 1977; Ritacco et al., 1991; Neill et al., 1994a). El establecimiento de una respuesta inmune de tipo Th1 es de particular importancia en la defensa contra *M. bovis*, la cual es caracterizada por la producción de IFN- γ , esencial para la activación de las rutas microbicidas de los macrófagos (Buddle et al., 2003a; Pollock et al., 2006). En bovinos infectados con *M. bovis*, las células T $\gamma\delta$ representan una fuente temprana de IFN- γ , el cual establece una conexión entre la inmunidad innata y adaptativa, modulando la respuesta inmune hacia el tipo Th1 (Kennedy et al., 2002; Price et al., 2007). En bovinos adultos, las células T $\gamma\delta$ representan 10-15 % de las células mononucleares de sangre periférica y hasta 40 % en bovinos jóvenes (Wyatt et al., 1994; Wilson et al., 1996). El antígeno de diferenciación Workshop Cluster 1 (WC1) es expresado en la mayoría de las células T $\gamma\delta$ en circulación (Mackay et al., 1986; Clevers et al., 1990; Morrison y Davis, 1991) y tiene un papel en la migración celular (Wijngaard et al., 1994), la regulación del ciclo celular (Kirkham et al., 1997; Takamatsu et al., 1997) y la producción de citocinas, incluyendo el IFN- γ (Baldwin et al., 2002). Sin embargo, en TBb, las células T CD4⁺ representan la subpoblación celular dominante productora de IFN- γ . Asimismo, las células T CD8⁺ han sido identificadas como células productoras de IFN- γ (Hope et al., 2000; Smyth et al., 2001), además de poseer propiedades citotóxicas contra *M. bovis* (Liébana et al., 2000).

La citocina IL-2 representa otra citocina de tipo Th1 secretada por las células T CD4⁺, que juega un papel importante en la respuesta inmune hacia *M. bovis* (Wood et al., 1992; Buddle et al., 1995a,b; Ng et al., 1997). La activación de células T en reposo por antígenos induce la síntesis de IL-2, la expresión de su receptor y su unión provoca la proliferación de las células T (Smith, 1984). El receptor multimérico se expresa con baja, media o alta afinidad para IL-2 y está formado por tres subunidades denominadas en función de su peso molecular: p55 o CD25 (subunidad α), p70 (subunidad β) y p64 (subunidad γ). Al combinarse, forman el receptor de baja (p55), media (p70/p64) y alta afinidad (p55/p70/p64). Sólo los receptores de media y alta afinidad son capaces de transmitir los

efectos biológicos de IL-2 (Hatakeyama et al., 1989). La regulación del receptor de alta afinidad se logra mediante la expresión de CD25, molécula ausente en células T en reposo. Después de una activación antigénica, las células T expresan rápidamente y transitoriamente CD25, por lo que esta proteína ha sido descrita como un marcador de activación de células T (Waldmann, 1989). En bovinos infectados con *M. bovis*, se ha demostrado que las tres subpoblaciones de células T ($WC1^+$, $CD4^+$ y $CD8^+$) sintetizan CD25 después de una exposición a antígenos micobacterianos (Smyth et al., 2001).

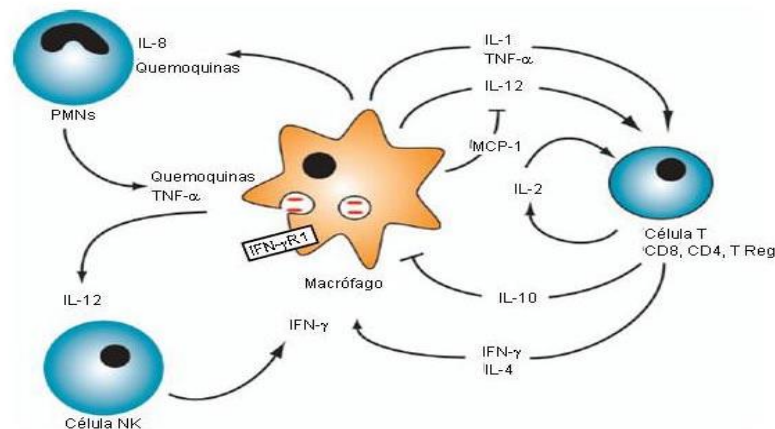


Figura 6. Respuesta inmune celular contra *M. tuberculosis* (Berrington y Hawn, 2007).

Otra subpoblación de células T $CD4^+$, denominadas Th17, son inducidas por *M. tuberculosis*. Estas células producen IL-17, una citocina inflamatoria capaz de inducir la expresión de quimiocinas y el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de infección. La respuesta Th17 hacia *M. tuberculosis* es dependiente de IL-23, secretada por macrófagos (Khader y Cooper, 2008). La IL-23 puede inducir células Th1 productoras de IFN- γ en ausencia de IL-12p70. Sin embargo, ni la respuesta Th1, ni la protección se pierde en ausencia de IL-23 (Kadher et al., 2005; Chackerian et al., 2006), indicando que el papel de IL-23 e IL-17 hacia *M. tuberculosis* es dispensable. La IL-23 tendría un papel secundario en comparación a IL-12, mediante la inducción de IFN- γ y la estimulación de las respuestas Th1 (Happel et al., 2005), mientras que IL-17 impactaría las respuestas inflamatorias (Khader et al., 2005; Umemura et al., 2007). En infecciones con *M. tuberculosis*, los niveles de IL-12 e IL-23 son cruciales para el equilibrio de células Th1 y Th17 y ambas respuestas son inducidas con la misma cinética, sin embargo, hay de 5-10 veces más células

Th1 que Th17 (Khader et al., 2005, 2007). De igual forma, las células T $\gamma\delta$, asociadas a la respuesta innata, representan la fuente principal de IL-17 contra *M. tuberculosis*. La producción de IL-17 por esas células es altamente dependiente de IL-23, provoca la acumulación temprana de neutrófilos y induce la producción de quimiocinas (Khader et al., 2005; Lockhart et al., 2006; Umemura et al., 2007). En contraste, en estudios de vacunación de ratones y desafío con *M. tuberculosis*, la ausencia de las células Th17 resulta en la pérdida del incremento de la respuesta Th1 y de la protección, indicando que la respuesta Th1 es dependiente de IL-23 e IL-17 (Khader et al., 2007).

En las infecciones micobacterianas, un cambio en la respuesta inmunitaria, del tipo Th1 al tipo Th2, se asocia a la progresión de la enfermedad, presencia de anticuerpos, anergia de la IMC (Ritacco et al., 1991; Dlugovitzky et al., 2000; Boussiotis et al., 2000), riesgo elevado de excreción de *M. bovis*, transmisión de la enfermedad (McCorry et al., 2005) y en humanos, reactivación de TB latentes (Howard y Zwillig, 1999). Las células Th2, inducidas por la IL-4, producen grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Dlugovitzky et al., 1997; García et al., 2009). La IL-4 causa la activación, proliferación y diferenciación de las células B (Hamblin, 1993), además de disminuir la producción de óxido nítrico (Bogdan et al., 1994) y la expresión del TLR2 en macrófagos (Krutzyk et al., 2003). En bovinos, se ha reportado la producción de IL-4 en un gran número de animales infectados con *M. bovis* (Rhodes et al., 2000a). Por otro lado, la IL-10, una citocina anti-inflamatoria, inhibe la producción de citocinas y proliferación de las células de tipo Th1 e incrementa la proliferación y diferenciación de las células B. En TB, la IL-10 antagoniza la respuesta pro-inflamatoria mediante la inhibición de las propiedades de macrófagos, de las respuestas de las células T CD4⁺ y de las funciones de las células presentadoras de antígenos (Hamblin, 1993; Rojas et al., 1999; Raja, 2004). Además, la IL-10 está implicada en el cambio de clase de IgM hacia IgG1 (Garraud y Nutman, 1996), crítico en la progresión de la enfermedad y en la evolución de la respuesta Th2 (Hussain et al., 1995, 2000; Erb et al., 1999). En ganado infectado con *M. bovis*, el incremento de IL-10 y IgG1 se asocia a una infección diseminada, correlaciona positivamente con el grado de patología y podría ser responsable de la supresión de la IMC (Welsh et al., 2005). Por lo tanto, IL-4 e IL-10 pueden inhibir las funciones de los macrófagos y modular negativamente las respuestas Th1. Su presencia en grandes cantidades constituye un elemento importante en

el agravamiento de la TB e indicaría formas severas de la enfermedad (Dlugovitzky et al., 1997; Goff et al., 2002). Sin embargo, a pesar de estos efectos adversos, las citocinas Th2 podrían también jugar un papel regulador, disminuyendo las lesiones pulmonares, la inflamación y el daño tisular (Moncada y Higgs, 1993).

1.8 La vacuna BCG

La aparición de reservorios de *M. bovis* en animales silvestres, así como el incremento del comercio interregional asociado a la propagación de la infección, intensificaron el interés de usar vacunas para el control de la TBb. Los estudios realizados en los últimos años demostraron una eficacia parcial de la BCG en bovinos y han señalado que: (1) las vacunas subunitarias pueden incrementar la inmunidad inducida por la BCG, (2) las respuestas inmunes de memoria provocadas por las vacunas protectoras correlacionan con la eficacia vacunal, (3) la BCG es especialmente protectora cuando se administra en neonatos y (4) la diferenciación de animales infectados de vacunados es posible utilizando métodos *in vitro* o *in vivo* (Waters et al., 2012).

1.8.1 Perspectivas históricas

Al principio de los años 1900, Calmette y Guérin desarrollaron una vacuna contra la TB humana, a partir de una cepa de *M. bovis*, mediante pases seriales de bacilos en un medio conteniendo papa, glicerina y bilis de bovino (Fine, 1995). La BCG se evaluó inicialmente en bovino y su eficacia se demostró 10 años antes de la primera vacunación de un niño en 1921 (Locht, 2010). En ganado, la inmunización contra la TB se llevó a cabo en muchos países y las estrategias empleadas incluyeron la inyección de varias tuberculinas y extractos micobacterianos inactivados, así como aislados de micobacterias de origen aviar, bovino, equino y humano. Ninguna vacuna demostró ser más eficaz que la BCG (Linton, 2005).

En bovino, la BCG se evaluó en numerosos ensayos experimentales. Mientras que las variaciones en el diseño experimental, como las cepas, dosis, rutas de vacunación y cepas de desafíos complicaron las comparaciones entre estudios, algunas conclusiones se pudieron sacar: una dosis única proporciona una inmunidad hacia *M. bovis* 2-4 meses post-vacunación, su eficacia en campo es variable (0-80%), bacilos vivos son necesarios para la protección y la revacunación no mejora la eficacia (Haring et al., 1930; Francis, 1958). Desde los años 1950, se realizaron muchos estudios en los cuales no se logró demostrar un

nivel adecuado de protección de la BCG (Glover y Richie, 1953; Berggren, 1977, 1981). Dentro de las principales razones que explican el fracaso, están las altas dosis de BCG utilizadas (10^8 - 10^{10} UFC), conocidas ahora por ser menos efectivas que las dosis bajas y la realización de los estudios en zonas de prevalencias muy altas, exponiendo los terneros tempranamente a la bacteria, a través del consumo de leche (Skinner et al., 2001). Estudios más recientes han demostrado una reducción de la gravedad de la enfermedad (disminución de la colonización por *M. bovis* y cambios patológicos asociados) y un nivel de protección consistente alrededor de 50 % (Vordermeier, 2010; Buddle et al., 2011). Otras conclusiones recientes incluyen que la BCG es más efectiva en becerros neonatos, que un refuerzo en un intervalo corto de tiempo no mejora la protección (Buddle et al., 2003b; Hope y Vordermeier, 2005), que las cepas Pasteur y Danesa proporcionan una eficacia similar (Wedlock et al., 2007) y que la vacuna se puede administrar oralmente, con buenos resultados si la dosis es adecuada (Buddle et al., 2005a, 2008, 2011). Además, estudios realizados en México (López-Valencia et al., 2010) y en Etiopía (Ameni et al., 2010) han revelado que la BCG puede proteger contra desafíos naturales de *M. bovis* y su seguridad se ha demostrado en bovino con las cepas Danesa, Pasteur, Russia, Glaxo, Goteborg (Murphy et al., 2008). Por lo tanto, las nuevas vacunas contra la TBb, en particular las cepas vivas atenuadas, deberán cumplir con normas de seguridad y estándares de eficacia establecidos por la BCG.

1.8.2 Diferenciación de bovinos infectados con *M. bovis* de vacunados con BCG

La vacuna BCG no se utilizó en varios países debido a su interferencia con la prueba diagnóstica oficial de la TBb basada en la tuberculina, ya que la mayoría de los antígenos presentes en el derivado proteico purificado (PPD) están presentes en la BCG (Buddle et al., 1999; Vordermeier et al., 1999, 2011). Por lo tanto, métodos para diferenciar al ganado infectado del vacunado son esenciales para la implementación de estrategias de vacunación. Las pruebas de diferenciación actuales utilizan sangre y son costosas, por lo cual es importante considerar la proporción de animales vacunados que se volverán positivos a la prueba de la tuberculina y por cuánto tiempo. Un estudio demostró que hasta 80 % de los bovinos podrían reaccionar positivamente a la prueba de la tuberculina 6 meses post-vacunación, mientras que a los 9 meses, la reactividad disminuyó hasta 8 % (Whelan et al.,

2011). Por lo tanto, la aplicación de la prueba de la tuberculina en animales vacunados y la utilización de la prueba de diferenciación sólo en animales vacunados reactivos a la prueba de la tuberculina podría reducir la frecuencia y el costo de la prueba (Waters et al., 2012).

Antígenos de diagnóstico específicos presentes en *M. bovis* virulenta y ausentes de la BCG se pueden utilizar tanto en ensayos de IFN- γ como en pruebas de tuberculina para diferenciar el ganado infectado del vacunado. Las proteínas Early Secretory Antigenic Target-6 (ESAT-6) y Culture Filtrate Protein 10 (CFP-10) son ampliamente utilizadas como antígenos diferenciales (Waters et al., 2009; Whelan et al., 2010; Vordermeier et al., 2010, 2011), ya que sus genes, encontrados en una región denominada región de diferencia 1 (RD1), son presentes en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y ausentes de la BCG y de la mayoría de las micobacterias ambientales (Mahairas et al., 1996; Behr et al., 2000; Behr, 2002; Gey Van Pittius et al., 2001; Pym et al., 2002). Otro antígeno denominado Rv3615c, una proteína altamente inmunogénica, ha demostrado su potencial como reactivo diferencial (Sidders et al., 2008). Ese antígeno, presente en la BCG, forma parte del sistema de secreción ESAT-6, pero no se encuentra dentro de la región RD1 (MacGurn et al., 2005). Sin embargo, su secreción es dependiente de una región RD1 intacta (Millington et al., 2011), lo que explica la ausencia de respuesta del ganado vacunado con BCG. El uso de Rv3615c, junto con ESAT-6 y CFP-10, incrementó la sensibilidad del ensayo de IFN- γ (Aagaard et al., 2003; Vordermeier et al., 2010, 2011). Asimismo, los antígenos diferenciales se pueden utilizar en la prueba de la tuberculina; un estudio reciente, en el cual se utilizaron combinaciones de ESAT-6, CFP-10, Rv3615c y/o MPB83, demostró una sensibilidad y una especificidad adecuadas de la prueba, sin comprometer la vacunación con BCG (Whelan et al., 2010).

1.8.3 El modelo de vacunación en becerros y medición de la eficacia vacunal

Las técnicas modernas de eficacia vacunal en becerros consisten en la administración de la vacuna en neonatos o animales hasta 6 meses de edad, el desafío con *M. bovis* a los 3-4 meses post-vacunación y el sacrificio 3-5 meses post-desafío. Las dosis de desafío son bajas y inoculadas por vía intratraqueal o en aerosol, resultando principalmente en una infección de los pulmones y nódulos linfáticos asociados, la cual imita estrechamente la infección natural (Buddle et al., 1994, 2005b; Palmer et al., 2002). Además, modelos de

infección natural por contacto entre animales se encuentran en desarrollo para la determinación de la eficacia vacunal en campo (Vordermeier et al., 2010). Los parámetros utilizados para demostrar la eficacia vacunal en becerros incluyen el cultivo bacteriológico cuantitativo y cualitativo, la evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas y parámetros inmunes asociados a la enfermedad (Waters et al., 2012).

Las vacunas contra la TBb no previenen la infección y en algunos casos, no previenen la formación de lesiones. Actualmente, las vacunas exitosas disminuyen la severidad de la enfermedad y/o la carga bacteriana en los órganos de interés. La eficacia vacunal se mide comúnmente (1) por la evaluación de las lesiones macroscópicas, utilizando un sistema de puntuación semi-cuantitativo que mide la gravedad en número y tamaño y (2) mediante cultivos bacteriológicos cuantitativos de los órganos de interés, en UFC/g de tejido (Wedlock et al., 2005a,b; Waters et al., 2009). Asimismo, el examen microscópico de las lesiones ha demostrado ser útil para medir la eficacia vacunal, el cual se basa en que las lesiones más avanzadas, con grandes regiones de necrosis caseosas y un número de bacilos moderado a grande, son lo más importante en la diseminación de la enfermedad en el hospedero y entre animales. La combinación de estos métodos proporciona una manera efectiva de medir la eficacia vacunal (Wangoo et al., 2005; Waters et al., 2007, 2009).

1.8.4 Progresos recientes en vacunas

En los últimos 15 años, se han logrado varios avances en la vacunación contra la TB, tanto en bovinos (Hope y Vordermeier 2005; Buddle et al., 2006; Buddle, 2010; Vordermeier et al., 2010) como en humanos (Kaufmann et al., 2010). En ganado, las nuevas vacunas incluyen cepas atenuadas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, vacunas de ADN, proteínas subunitarias y varias estrategias de inmunización/refuerzo con BCG y vacunas de ADN, proteínas o virus-vector. Algunas de estas vacunas incrementaron los efectos protectores de la BCG, sin embargo, ninguna de ellas, administrada sola, ofrece una protección igual o superior a la BCG. Por lo tanto, la opción disponible para la utilización inmediata en campo es la BCG sola o con un refuerzo subunitario, como el Ag85A con el adenovirus o poxvirus como vector, el cual demostró incrementar la proporción de animales sin lesiones asociadas a la TB (Vordermeier et al., 2009).

Otra estrategia de vacunación es el uso de cepas atenuadas de *M. bovis* que proporcionan una eficacia vacunal mayor a la BCG. Por ejemplo, dos cepas atenuadas WAg de *M. bovis* han demostrado proteger el ganado naturalmente pre-expuesto a micobacterias ambientales contra desafíos experimentales, a diferencia de la BCG que fue ineficaz, mostrando que en ciertas situaciones, otras cepas atenuadas de *M. bovis* pueden conferir una protección superior a la BCG (Buddle et al., 2002a). Varios estudios han evaluado la eficacia vacunal de mutantes $\Delta RD1$ de *M. bovis* (Jalapathy, 2006; Velmurugan et al., 2007; Ranganathan et al., 2009). Por ejemplo, la cepa Ravenel $\Delta RD1$ induce una protección y un patrón de seguridad similar a la BCG (Waters et al., 2009). Otros candidatos vivos atenuados prometedores incluyen mutantes de BCG que sobre-expresan epítomos inmunodominantes como las proteínas del complejo Ag85 (Horwitz et al., 2000) o la vacuna recientemente descrita IKE-PLUS, una mutante $\Delta esx-3$ de *M. smegmatis* complementada con *esx-3* de *M. tuberculosis* (Sweeney et al., 2011). Sin embargo, a pesar de los progresos realizados en el desarrollo de vacunas y refuerzos en TBb, estudios adicionales son necesarios.

1.8.5 Factores inmunes predictivos de la eficacia vacunal

En animales vacunados con BCG, se ha demostrado que la hipersensibilidad retardada (HR) no correlaciona con la protección de la vacuna, mostrando la disociación de las dos respuestas (Whelan et al., 2011). Por otro lado, las vacunas más efectivas contra la TB inducen respuestas específicas de IFN- γ ; sin embargo, los niveles inducidos no correlacionan necesariamente con la protección (Black et al., 2002). Por ejemplo, la vacunación con BCG cepa Danesa de bovinos confiere una protección similar a la de la cepa Pasteur, a pesar de inducir respuestas de IFN- γ significativamente más bajas (Wedlock et al., 2007). Un factor de confusión en las respuestas de HR e IFN- γ provocadas por las vacunas es la exposición previa a micobacterias ambientales. Especialmente con la BCG, es difícil evaluar el impacto de esa sensibilización en los niveles de HR e IFN- γ , ya que la vacuna y las micobacterias ambientales comparten antígenos. La exposición del ganado a micobacterias ambientales es común y es probable que las diferentes cepas y tipo de exposición influyan en el resultado de la vacunación (Waters et al., 2012).

Además de las respuestas provocadas por la vacuna, las respuestas generadas después del desafío pueden utilizarse para predecir el éxito o fracaso de la vacuna. Por ejemplo,

respuestas robustas o crecientes de IFN- γ hacia ESAT-6/CFP-10 después del desafío representan un indicador negativo de protección, ya que correlacionan con la patología asociada a la TB (Vordermeier et al., 2002; Dietrich et al., 2005; Waters et al., 2007, 2009). Similarmente, las respuestas de anticuerpos, particularmente IgG1 hacia MPB83, correlacionan con la carga bacilar y la patología evocada por la TB (Lyashchenko et al., 2004). Por otra parte, existen indicadores positivos de la eficacia vacunal después del desafío, como las respuestas específicas reducidas de IFN- γ , iNOS, IL-4, MIP-1 α (CCL3), una expansión reducida de las células T CD4⁺ y un perfil de activación disminuido (disminución de CD25 y CD44 e incremento de CD62L) de las células T estimuladas (Waters, et al., 2003a,b). Recientemente se han identificado candidatos adicionales (IL-22, LT- α , granzima A y B, CXCL-9 y CXCL-10) como biomarcadores de la eficacia vacunal en ganado (Thacker et al., 2011; Aranday-Cortes et al., 2012). Los indicadores ante-mortem ofrecen un método valioso de medir la protección antes del sacrificio y podrían procurar beneficios en ensayos de campo, además de permitir estudios más largos, cuando el desafío se realiza por contacto y el inicio de la infección no es conocido (Waters et al., 2012).

1.8.6 La tuberculosis bovina como modelo de vacunas para la tuberculosis humana

Durante las últimas décadas, se han desarrollado modelos animales para el estudio de enfermedades infecciosas. En TB, los estudios en bovinos y en humanos se han hecho en paralelo, proporcionando beneficios mutuos (Rowland y McShane, 2011). Generalmente, los estudios de vacunación efectuados con *M. tuberculosis* benefician a la investigación realizada en TBb. Por lo tanto, los estudios efectuados en TBb no representan modelos de desarrollo de nuevas estrategias aplicables a la TB humana. En TBb, la escasez de los recursos, de los investigadores disponibles y las instalaciones costosas limitan los estudios. La investigación de vacunas en TBb ofrece principalmente una garantía adicional de seguridad de la vacuna y la posibilidad de utilizar un sistema de hospedero/patógeno natural. No obstante, los estudios de TBb son directamente aplicables al estudio de la TB humana. Las regiones endémicas de TBb ofrecen una buena oportunidad de probar vacunas y medir la eficacia en campo, bajo condiciones naturales de transmisión y factores de confusión como la carga parasitaria, las micobacterias ambientales, la heterogeneidad de la población blanco, factores climáticos y geográficos y variables socioeconómicas. Los

ensayos clínicos en humanos son muy costosos y provocan varios dilemas de seguridad y de ética. Por lo tanto, los ensayos en bovinos proporcionan la oportunidad de recoger datos adicionales sobre factores asociados al campo, permitiendo desarrollar y optimizar las estrategias de vacunación. Además, varias regiones presentan prevalencias de TBb altas (México), moderadas (Inglaterra) o bajas (Estados Unidos), las cuales permiten reproducir diferentes condiciones útiles para la vacunación en humanos (Waters et al., 2012).

1.8.7 Futuro de la investigación de las vacunas contra la tuberculosis bovina

Las vacunas en TB humana, programadas para ensayos clínicos incluyen vacunas con bacilos vivos diseñadas para reemplazar la BCG y vacunas subunitarias para reforzar la BCG (Rowland y McShane, 2011). En bovinos, las prioridades para los próximos 5 años incluyen: (1) determinar la duración de la protección de la BCG y la eficacia de la revacunación, (2) identificar vacunas “vivas” con la posibilidad de diferenciar animales infectados de vacunados o vacunas subunitarias con una eficacia mayor a la BCG, (3) definir correlaciones inmunitarias de protección, (4) estandarizar procedimientos para ensayos de eficacia en campo y (5) seguir desarrollando ensayos de eficacia vacunal en reservorios de vida silvestre. Existen muchas variables que influyen la eficacia de las vacunas en condiciones naturales y solamente a través de ensayos de campo se podrá establecer el potencial de esas vacunas para el control de la TBb (Waters et al., 2012).

1.9 Pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina

El diagnóstico de la TBb se basa principalmente en la IMC, respuesta inmunológica predominante hacia *M. bovis* en las primeras etapas de la infección (Ritacco et al., 1991). En etapas más avanzadas, la inmunidad humoral se puede evaluar (Neill et al., 2001; Pollock y Neill, 2002; Welsh et al., 2005). La precisión de las pruebas se obtiene por la sensibilidad y especificidad, determinando las proporciones de falsos-negativos y falsos-positivos. La prueba de la tuberculina representa la herramienta ante-mortem principal por su rentabilidad y su confiabilidad. Sin embargo, diferentes factores comprometen su precisión. Consecuentemente, el ensayo de IFN- γ se ha desarrollado para complementarla, con dos objetivos principales: incrementar la detección de animales tuberculosos (sensibilidad) en regiones de altas incidencias (González-Llamazares et al., 1999; Whipple

et al., 2001) y reducir el sacrificio de animales falsos-positivos (especificidad) en áreas de bajas incidencias o donde el ganado muestra una sensibilización no específica a la tuberculina (de la Rua-Domenech et al., 2006). Otros ensayos complementarios, como pruebas de ELISA (Hanna et al., 1992), proliferación linfocitaria (Rhodes et al., 2000b) y PCR (Vitale et al., 1998) se han desarrollado, pero su aplicación permanece experimental. Ninguna de las pruebas disponibles en la actualidad permite una determinación perfectamente precisa de la infección en bovinos (de la Rua-Domenech et al., 2006).

1.9.1 Prueba de la tuberculina

Las pruebas intradérmicas son estándares internacionales para el diagnóstico ante-mortem de la TBb. Se basan en la inducción de una respuesta de HR, después de la inyección de la tuberculina o PPD (Monaghan et al., 1994; Anon, 2004a,b). Cuando el PPD bovino se inyecta en la piel de un animal sensibilizado a los antígenos que contiene, que sea por una infección con *M. bovis* o antígenos compartidos por otras especies, se observa una respuesta inflamatoria al sitio de inyección, 48-72 h después de la aplicación de la prueba (Lepper et al., 1977; Francis et al., 1978; Pollock et al., 2003; Anon, 2004b).

Existen diferentes tipos de pruebas de la tuberculina. La prueba simple se puede aplicar en la piel de la región del cuello (cervical) o de la base de la cola (caudal). En la prueba cervical comparativa, se inyectan simultáneamente el PPD bovino y aviar en la piel del cuello y la interpretación se basa en que los bovinos infectados con *M. bovis* muestran una respuesta superior hacia el PPD bovino que aviar, mientras que la infección con otras micobacterias promueve una relación inversa. Por lo tanto, esta prueba permite discriminar animales infectados con *M. bovis* de sensibilizados por micobacterias ambientales (Karlson, 1962; Francis et al., 1978; Monaghan et al., 1994; Pollock et al., 2003; Anon, 2004c).

El tipo de prueba tuberculínica a seleccionar depende generalmente de la prevalencia de la TBb y de la presencia de micobacterias ambientales. La prueba caudal representa la prueba principal para la detección rutinaria de la TBb, cuando se desconoce si hay presencia de la infección, mientras que la prueba cervical, más sensible, se utiliza para eliminar a los animales reactivos de los rebaños infectados (Francis et al., 1978; Monaghan et al., 1994; Anon, 2004b). La prueba comparativa es principalmente utilizada como una prueba complementaria en animales reactivos o sospechosos a la primera prueba (Tweedle

y Livingstone, 1994; Anon, 2004c), aunque el ensayo de IFN- γ la está reemplazando gradualmente (Ryan et al., 2000; Buddle et al., 2001; Anon, 2004c, 2005b).

Varios autores han reportado estimaciones de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de la tuberculina. Para la prueba caudal y cervical, la sensibilidad varía de 63.2 % a 100 % (promedio 83.9 %). Sin embargo, la prueba cervical es más sensible y menos específica que la prueba caudal. Para la prueba cervical comparativa, los estudios sugieren una sensibilidad entre 52.0 % y 100 % (promedio 80.0 %). En cuanto a la especificidad, los estudios demostraron que varía de 75.5 % a 99.0 %, con un promedio de 96.8 %, para la prueba caudal y cervical y de 78.8 % a 100 % para la prueba comparativa, con un promedio de 99.5 % (Francis et al., 1978; Monaghan et al., 1994; de la Rúa-Domenech et al., 2006). Indudablemente, un animal infectado no detectado representa una fuente de infección para los otros animales del hato, dificultando la resolución de la TBb. Por lo tanto, el uso de dos o más pruebas de diagnóstico y la eliminación del animal positivo a cualquier de las pruebas utilizadas representa una buena perspectiva a largo plazo para el control de la TBb.

1.9.2 Ensayo de IFN- γ

La prueba de IFN- γ es un ensayo en sangre completa *in vitro*, desarrollado en Australia a finales de los años 1980, para su uso en combinación con la prueba de la tuberculina caudal. La prueba fue aprobada como método de diagnóstico complementario oficial en Nueva Zelanda a finales de los años 1990, en Australia en 1991, en Estados Unidos en 2001 y por la Unión Europea en 2002 (Wood et al., 1991; Tweedle y Livingstone, 1994; Wood y Rothel, 1994; Cousins et al., 1998; Wood y Jones, 2001; Anon et al., 2004b).

La primera etapa de la prueba se basa en la incubación de la sangre con o sin antígenos micobacterianos durante 24 h y la recolección de los plasmas. En la segunda etapa, se cuantifica el IFN- γ presente en los plasmas por una prueba de ELISA, utilizando un kit comercial. El IFN- γ , liberado principalmente por los linfocitos T de memoria, tiene un papel importante en la respuesta inmune hacia la TBb, ya que participa en la activación de los macrófagos (Wood y Rothel, 1994; Wood y Jones, 2001).

El rendimiento de la prueba de IFN- γ ha sido evaluado en muchos países (Wood y Jones, 2001): su sensibilidad varía de 73.0 % a 100 % (promedio 87.6 %) y su especificidad se encuentra entre 85.0 % y 99.6 % (promedio 96.6 %). Importantemente, esta prueba detecta

una proporción de bovinos en un estado más temprano de la infección que la prueba de la tuberculina (Neill et al., 1994a; Monaghan et al., 1997b; Wood y Jones, 2001; Pollock et al., 2005). El uso de ambas pruebas mejora hasta 20 % la sensibilidad del diagnóstico con respecto a la prueba de la tuberculina sola, eliminando más (pero no necesariamente todos) animales infectados de manera más rápida (Wood et al., 1991; Whipple et al., 1995; González-Llamazares et al., 1999). Sin embargo, ambas pruebas comparten la desventaja de no detectar animales en estado de anergia hacia el PPD, aunque no existen datos disponibles sobre el número de dichos animales (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

1.9.3 Prueba de ELISA

Los animales con una enfermedad avanzada pueden llegar a no responder a la prueba tuberculínica y de IFN- γ , debido a una disminución de la IMC. Se ha especulado que estos animales, llamados anergicos, son altamente infecciosos y podrían ser la causa de la persistencia de la TBb en los rebaños (Lepper et al., 1977; Plackett et al., 1989; Yearsley et al., 1998). Se pueden detectar anticuerpos específicos de *M. bovis* en suero de estos animales por ensayos serológicos, particularmente por prueba de ELISA, en la cual se utilizan antígenos como el PPD bovino (Hanna et al., 1989), el filtrado de cultivo de *M. bovis* (Estrada-Chávez et al., 1995), así como antígenos específicos purificados (Fifis et al., 1992; Lyashchenko et al., 1998). Además, varios estudios han demostrado que el nivel de anticuerpo hacia *M. bovis* incrementa después de la aplicación de la prueba de la tuberculina, correlacionando positivamente con la severidad de la enfermedad (Lightboby et al., 1998; Lyashchenko et al., 2004; Thom et al., 2004). Se ha reportado que la prueba de ELISA tiene una alta especificidad y una baja sensibilidad (100 % y 60 % respectivamente), comparándola con la prueba de la tuberculina y de IFN- γ (Plackett et al., 1989; Fifis et al., 1992; Estrada-Chávez et al., 2001). Por lo tanto, las pruebas serológicas, aunque económicas y simples, no ofrecen una alternativa a las pruebas basadas en la IMC y se deberían de utilizar como pruebas complementarias en animales negativos a la prueba de la tuberculina y de IFN- γ (Vordermeier et al., 2001b; Pollock et al., 2005).

1.9.4 Otras pruebas complementarias

El cultivo bacteriológico convencional representa todavía la prueba de oro para la detección de *M. bovis* en muestras de bovinos y ambientales. Sin embargo, la prueba de PCR ofrece las ventajas de la sensibilidad, flexibilidad y rapidez. Esta prueba, que utiliza secuencias específicas de ADN de *M. bovis*, permite la detección rápida de la bacteria en muestras clínicas de ganado en pie y el monitoreo del ambiente (Vitale et al., 1998; Sreedevi y Krishnappa, 2004). Sin embargo, la PCR no ha demostrado hasta la fecha ser superior al cultivo en términos de sensibilidad, especificidad o confiabilidad. Las limitaciones se deben al número bajo de bacilos en las muestras, la excreción intermitente, una extracción ineficiente del ADN o la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. Mientras que los métodos de PCR pueden ser beneficiosos en la identificación de micobacterias en cultivo, es poco realista considerarlos como una alternativa al diagnóstico inmunológico de rutina de la TBb *in vivo* (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

2.0 Principios teóricos de la citometría de flujo

La citometría de flujo evalúa las características físicas y químicas de células en suspensión, procurando información sobre el tamaño celular, la granularidad o complejidad interna, así como de la intensidad de fluorescencia. Con esta tecnología, se pueden realizar recuentos y separaciones celulares o análisis de marcadores de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos y actividad enzimática entre otros (Bono et al., 1998; Castillo et al., 1999; Shapiro, 2003; Castillo, 2005).

La citometría de flujo se basa en la interacción de una fuente de luz con células en suspensión. Cada célula pasa por un sitio donde es impactada por un laser, el cual emite fluorescencia a una longitud de onda específica. La luz es desviada de acuerdo a las características propias de la célula y la variación de la longitud de onda así producida es captada y depurada por un sistema de lentes y espejos, que concentra esta luz y la transforma en pulsos de voltaje. Un sistema informático codifica e interpreta los pulsos de voltaje, con el fin de ser analizados por un software especializado. De este modo, es posible la medición de un gran número de células, en un periodo corto de tiempo y los datos obtenidos son de gran confiabilidad y exactitud (Castillo, 2005).

En términos técnicos, la citometría de flujo indica 3 cosas fundamentales sobre una muestra: (1) el tamaño de las células o dispersión frontal, que se relaciona con la luz que la célula no deja pasar de forma frontal; (2) la granularidad o complejidad interna, denominada dispersión lateral, representado por la luz dispersada a un ángulo de 90° de la luz incidente del láser y (3) la intensidad de la fluorescencia, que se puede registrar cuando un componente celular específico es marcado con fluorescencia (Laguado, 2007).

A la suspensión celular, se le puede agregar una sustancia fluorescente o fluorocromo acoplada a un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad por algún componente celular. El fluorocromo se excita cuando pasa por el laser y se detecta un cambio en la longitud de onda, identificando subgrupos de células dentro de las poblaciones celulares. Esta técnica permite la caracterización inmunofenotípica de diversos tipos celulares, muchos de ellos con una aplicación clínica concreta (Bono et al., 1998; Castillo et al., 1999; Castillo, 2005). Además, con los citómetros de flujo actuales, es posible detectar simultáneamente más de 15 canales de fluorescencia, usando fluorocromos que emitan a diferentes longitudes de onda (Laguado, 2007).

La citometría de flujo surge como una nueva tecnología en los laboratorios clínicos veterinarios y las aplicaciones más importantes se basan, aunque no se limitan, a estudios de la respuesta inmune hacia infecciones económicamente relevantes para la fabricación de vacunas (Javed et al., 2005), el mejoramiento de las vacunas existentes (Cassataro et al., 2005), la optimización genética de especies bovinas y equinas (Katska et al., 2002) y la fertilidad del ganado (Christensen et al., 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

El interés del estudio de la TBb se justifica ampliamente por el riesgo que la enfermedad representa para la salud pública, las limitaciones del comercio de productos pecuarios y la disminución de la productividad en animales enfermos. En los años recientes, se ha considerado la vacunación y métodos modernos de diagnóstico como posibles estrategias para el control y la erradicación de la enfermedad.

El estudio de la inmunidad celular y humoral inducida por la vacuna BCG cepa Phipps aportará información relevante sobre una cepa de BCG poco estudiada tanto en humanos como en bovinos, además de incrementar el conocimiento de los eventos que pueden ocurrir en condiciones naturales de campo. El uso tanto de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en el ensayo de IFN- γ como del gen MPB70 en la prueba de PCR, permitirá evaluar la capacidad diagnóstica de esas herramientas en estudios de campo, además de determinar su utilidad en el control y la erradicación de la TBb.

III. HIPOTESIS

La vacunación con *M. bovis* BCG cepa Phipps de becerras neonatas, en un hato de alta prevalencia de TBb, permitirá evaluar la respuesta inmune inducida por una cepa de BCG poco estudiada y analizar la utilidad de diferentes pruebas diagnósticas de TBb en condiciones naturales de campo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune de becerras neonatas vacunadas con *M. bovis* BCG Phipps, en un hato de alta prevalencia de TBb y analizar la utilidad de diferentes pruebas diagnósticas de TBb en condiciones naturales de campo.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Medir la respuesta inmune celular, mediante la prueba de detección de IFN- γ y de tuberculina y la respuesta inmune humoral mediante la prueba de ELISA provocadas por la vacuna.

- Evaluar por citometría de flujo las subpoblaciones de linfocitos T (WC1, CD4 y CD8), el nivel de activación celular (CD25) y el patrón de secreción de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-4) inducidos por la vacunación.
- Determinar el potencial de algunas pruebas diagnósticas de TBb como la prueba de PCR (MPB70) y el uso en la prueba de IFN- γ de antígenos purificados específicos (ESAT-6 y CFP-10).

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Lugares de trabajo, animales de estudio y diseño experimental

Los ensayos de laboratorio del presente trabajo se realizaron en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias del Distrito Federal, en el laboratorio de inmunología. El trabajo de campo se realizó en el Complejo Agro-Industrial Tizayuca, Hidalgo.

Se utilizaron 10 becerras de raza Holstein Friesian, alrededor de un mes de edad, provenientes de un hato lechero comercial con una prevalencia de 40 % de TBb. Para conocer el estatus inmunológico de los animales antes del comienzo del estudio, las becerras se evaluaron mediante las pruebas de IFN- γ y de ELISA, mientras que se aplicó la prueba cervical comparativa de la tuberculina (PCCT) a las madres. Cinco becerras se vacunaron con BCG cepa Phipps (donación de la Dra. Clara Ines Espitia Pinzón, Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, D.F., México), vía subcutánea en la tabla del cuello, a una dosis de 1×10^6 UFC en 1.5 ml de solución salina de fosfatos (PBS) y cinco becerras controles se inocularon con 1.5 ml de PBS (Tabla 1).

El seguimiento de los animales se realizó durante un periodo de 220 días. Las pruebas de IFN- γ y ELISA, además de la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T, la activación celular y el patrón de citocinas se realizaron a los 0, 7, 15, 21, 30, 60, 90, 100, 150, 210 y 220 días post-vacunación. La prueba de la tuberculina se aplicó a los 90 y 210 días postvacunación, mientras que la prueba de PCR en exudado nasal se realizó cada mes.

Tabla 1. Datos generales de las becerras al inicio del estudio

Grupos	No. Animal	Edad* (Días)	PCCT Madre**	IFN-γ (PPD bovino)***	ELISA\ddagger
BCG (n=5)	367	9	-	-	-
	764	39	+	-	-
	2545	38	-	-	-
	2700	46	S	-	-
	2970	34	-	-	-
Control (n=5)	105	22	ND	-	-
	173	32	S	-	-
	979	45	+	-	-
	2926	31	-	-	-
	3172	28	ND	-	-

*Edad de las becerras al comienzo del estudio; **Resultados de la PCCT de las madres (NOM, 1995);

***Interpretación de acuerdo a los criterios del kit comercial Bovigam; \ddagger Punto de corte de la prueba de ELISA $DO_{492nm} = 0.370$; S: sospechosa; ND: dato no disponible.

6.2 Ensayo de IFN- γ

Se colocaron alícuotas de 1,0 ml de sangre heparinizada en placas de cultivo de 48 pozos (Nuncclon, Roskilde, Denmark). La sangre se estimuló con 20 $\mu\text{g/ml}$ de PPD aviar y bovino y 4 $\mu\text{g/ml}$ de ESAT-6 y CFP-10 (donación del Dr. P. Andersen, Staten Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Se utilizó el mitogéno Pokeweed (PWM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) como control positivo (10 $\mu\text{g/ml}$), mientras que un alícuota permaneció sin estímulo (control negativo). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmosfera húmeda al 5% CO_2 durante 24 h y los plasmas colectados se congelaron a -70°C hasta su análisis (Rothel et al., 1990a).

La determinación de los niveles de IFN- γ se hizo en las muestras de plasma, siguiendo las instrucciones del kit comercial basado en la prueba de ELISA disponible para la detección de IFN- γ de bovino (Bovigam®, Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland). Las absorbancias de las muestras de plasma se leyeron mediante un lector de ELISA (Benchmark-Plus Microplate Spectrophotometer Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) a una densidad óptica de 450 nm (DO_{450nm}). Una muestra se consideró positiva cuando el valor de DO_{450nm} en presencia de PPD bovino menos el valor de DO_{450nm} en

presencia de PPD aviar > 0.1 y cuando el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ en presencia de PPD bovino menos el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ sin estímulo > 0.1 .

6.3 Prueba cervical comparativa de la tuberculina (PCCT)

Se administraron intradérmicamente el PPD bovino y el PPD aviar (PRONABIVE, D.F., México) en la tabla del cuello, a 12 cm de distancia. Se inyectó 0.1 ml (1 mg/ml) de PPD bovino y 0.1 ml (0.5 mg/ml) de PPD aviar. Se midió el grosor de la piel antes y 72 horas posteriores a la inoculación y una interpretación estándar de los resultados se realizó de acuerdo a los criterios de la Norma Oficial Mexicana (NOM, 1995).

6.4 ELISA-detección de IgG

Se realizaron pruebas de ELISA para detectar anticuerpos en suero (Estrada-Chávez et al., 2001), utilizando extractos proteicos de filtrados de cultivo (EPFC) de *M. bovis* cepa AN5 y de *M. avium* cepa D4 (PRONABIVE, D.F., México). Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nuncclon, Roskilde, Denmark) con 1 μg /pozo de EPFC de *M. bovis* o *M. avium*, diluido en una solución de carbonato 0.1 M durante 24 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 (PBS-T) al 0.1%, se bloquearon con 100 μl de solución de bloqueo (leche descremada al 3% en PBS-T) durante 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 μl de los sueros diluidos en PBS (1:100) 1 h a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente, se agregó 100 μl de proteína G conjugada con peroxidasa (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluida en PBS (1:10,000) durante 1 h a 37 °C. Después de los lavados, se agregó 100 μl de la solución de revelado, ortofenilendiamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 0.04 % y H_2O_2 al 0.04 % diluidos en 10 ml solución de citratos y las placas se incubaron 4 min a 37 °C. La reacción se paró con 50 μl de ácido sulfúrico 2 M y las densidades ópticas se leyeron a una $DO_{492\text{nm}}$.

Como control positivo, se utilizó el suero de un bovino que presentaba lesiones diseminadas de TB, en el cual se detectó la presencia de *M. bovis* por análisis histopatológico y aislamiento micobacteriano. Se utilizó un suero de un animal que provenía de un área de baja incidencia de TBb (Sonora, México) como control negativo; el

cual fue negativo a la PCCT, IFN- γ , PCR (exudados nasales) y análisis micobacteriológicos post-mortem (pulmones y nódulos linfáticos asociados).

6.5 Extracción de ADN de exudado nasal

Las muestras se colectaron de una cavidad nasal de los animales, utilizando hisopos estériles sumergidos en 5 ml de PBS estéril. La extracción del ADN se hizo por el método de bromuro de cetil-trimetil amonio o CTAB (Wilson, 1988). Se centrifugó 1 ml de sedimento de exudado nasal a 13 400 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó 400 μ l de TE 1X y 50 μ l de lisozima (10 mg/ml) y las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se añadió 70 μ l de SDS al 10 % y 5 μ l de proteinasa K (2 mg/ml) durante 20 min a 65 °C. Después, se agregó 100 μ l de NaCl 5M y 100 μ l de CTAB/NaCl durante 10 min a 65 °C. Se agregó 750 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó a 13 400 g durante 5 min. Se recuperó la primera fase, se adicionó 360 μ l de alcohol isopropílico absoluto y se dejó 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 13 400 g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70 % conservado a -20 °C. Se centrifugó a 13 400 g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se suspendió el ADN en 50 μ l de agua inyectable y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La integridad del ADN se analizó en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

6.6 PCR simple y anidada

Se realizó la PCR simple a partir de los iniciadores TB1-F, 5'GAACAATCCGGAGTTGACAA3' y TB1-R, 5'AGCACGCTGTCAATCATGTA3' (Invitrogen, D.F., México), que amplifican una región de 372 pb del gen que codifica para la proteína de secreción MPB70, presente en los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Cousins et al, 1991). La PCR para un volumen final de reacción de 25 μ l se efectuó con 2.5 μ M de cada iniciador, 12.5 μ l (250 U) del "Master mix" (AmpliTaQ Gold PCR Master Mix, Roche, New Jersey, USA) y 5 μ l de muestra. Las condiciones para 35 ciclos de amplificación (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) fueron: precalentamiento a 96 °C por 15 min, desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineación e hibridación a 58 °C por 30 seg, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C 5 min. Como control positivo, se utilizó el ADN de un aislado de *M.*

bovis proveniente de un bovino tuberculoso, mientras que agua inyectable se usó como control negativo. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio, conjuntamente con marcadores de peso molecular (Amresco K180-250 UL, 100 pb) y la reacción se visualizó utilizando un analizador de geles (UVP Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

Se realizó la PCR anidada a partir de los iniciadores M22/3, 5'GCTGACGGCTGCACTGTCGGGC3' y M22/4, 5'CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC3' (Invitrogen, D.F., México), que amplifican una región interna de 208 pb del segmento de 372 pb del gen MPB70 (Estrada-Chávez et al., 2004). La PCR para un volumen final de reacción de 25 µl se efectuó con 2.5 µM de cada iniciador, 12.5 µl (250 U) del "Master mix" (AmpliTaq Gold PCR Master Mix, Roche, New Jersey, USA) y 5 µl de producto de la PCR simple. Las condiciones para 25 ciclos de amplificación fueron: precalentamiento a 96°C por 12 min, desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineación e hibridación a 71 °C por 30 seg, extensión a 71 °C por 30 seg y extensión final a 72 °C 10 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio, conjuntamente con marcadores de peso molecular y la reacción se visualizó utilizando un analizador de geles.

6.7 Citometría de flujo

Se colocaron 2 ml de sangre completa periférica heparinizada en placas de cultivo de 24 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark). El primer pozo se estimuló con 7 µg/ml de EPFC de *M. bovis* y el segundo se usó como control sin estimulación. Los cultivos de sangre se incubaron 24 h a 37 °C en una atmosfera humedad al 5 % de CO₂, la sangre se colectó y los eritrocitos se lisaron durante 15 min con una solución de lisis conteniendo cloruro de amonio. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS para realizar la cuantificación y verificar la viabilidad celular mediante azul tripano. La concentración celular se ajustó a 500 000 células/tubo en una solución de PBS conteniendo 0.2 % de albumina fetal bovina y 0.2 % azida de sodio (PBA). Las células se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-bovino a temperatura ambiente durante 20 min. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios siguientes: CACTB32A (IgG1, WC1), CACT138A (IgG1, CD4), BAT82A (IgG1, CD8), CACT108A (IgG2a, CD25) de VMRD INC (Pullman, WA, USA). Después de lavar con PBA, las células se incubaron con el

anticuerpo secundario conjugado, ya sea con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) (115-095-205 o 115-115-206, Jackson ImmunoResearch; Baltimore Pike, USA), durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células marcadas se lavaron y se dejaron en 50 µl de paraformaldehído al 1% y posteriormente, se analizaron con un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA). Las subpoblaciones de linfocitos T se identificaron a partir de una gráfica de tamaño celular contra complejidad celular y 10 000 células se adquirieron por muestra. Los datos se analizaron mediante el Software FlowJo 7.6.1 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). El porcentaje de células positivas se determinó a partir de alícuotas controles de células en los cuales se omitió poner el anticuerpo primario (Smyth et al., 2001; Sopp et al., 2006).

El marcaje intracelular se realizó de la misma manera, sin embargo, se agregaron 10 µg/ml de brefeldina A en las últimas 4 h de incubación. Además, las células se permeabilizaron 5 min con una solución de saponina antes del marcaje. Los anticuerpos monoclonales siguientes se utilizaron: MCA2371 (IgG2a, IL-4), MCA2111EL (IgG1, IL-10), MCA1783F (IgG1, IFN-γ-FITC) y MCA928F (Anti-IgG1), todos provenientes de AbD SEROTEC (Kidlington, Oxford, UK). Todos los anticuerpos primarios y secundarios se titularon con el propósito de determinar la concentración a utilizar.

6.8 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas para cada prueba. Todos los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, evaluando la igualdad entre las medias de dos grupos con varianzas iguales. La comparación de los resultados de la PCR anidada se realizó mediante la prueba exacta de Fisher. En ambas pruebas estadísticas efectuadas, el valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

Para la selección de las becerras al comienzo del estudio mediante la prueba de ELISA, se realizó una curva receiver operator characteristic (ROC) para determinar el punto de corte de la prueba. Se obtuvo un punto de corte de $DO_{492\text{ nm}} = 0.370$. Por lo tanto, un suero se consideró negativo cuando la $DO_{492\text{ nm}} \leq 0.370$.

VII. RESULTADOS

7.1 Ensayo de IFN- γ

En las figuras 1 y 2, se observa un incremento de la producción de IFN- γ hacia el PPD aviar y el PPD bovino del día 7 al día 60 en animales vacunados. Sin embargo, debido a la alta variación de los niveles de IFN- γ entre individuos, se observa una diferencia estadística entre ambos grupos solamente al día 30 post-vacunación ($p = 0.0087$) para el PPD aviar y a los días 21 ($p = 0.0239$) y 30 ($p = 0.0229$) para el PPD bovino. Se encontró un valor promedio de 0.64 hacia el PPD bovino al día 21 en animales vacunados ($DO_{450\text{ nm}} = 0.13$ en animales controles), mientras que el nivel más alto de la citocina se observó al día 30, tanto en sangre estimulada con el PPD aviar con una $DO_{450\text{ nm}} = 0.96$, como con el PPD bovino con una $DO_{450\text{ nm}} = 0.99$ ($DO_{450\text{ nm}}$ de 0.11 y 0.18 en animales controles respectivamente). No se encontraron incrementos significativos en animales controles. No se observó un incremento de los niveles de IFN- γ después de la aplicación de las PCCT (días 90 y 210).

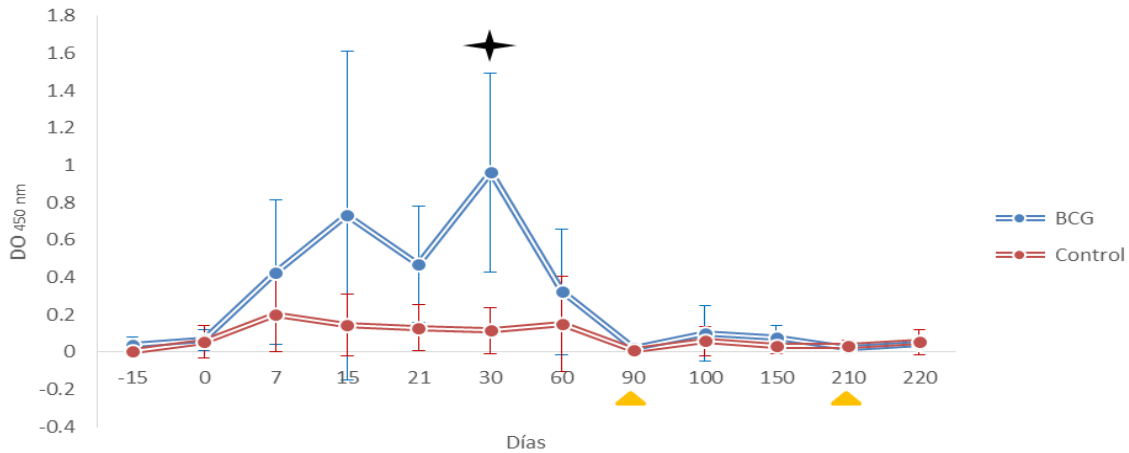


Figura 1. Producción de IFN- γ en sangre completa estimulada con PPD aviar de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Los valores representan la $DO_{450\text{ nm}}$ obtenida con el PPD aviar menos la $DO_{450\text{ nm}}$ sin estímulo. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. La estrella indica diferencia estadística significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

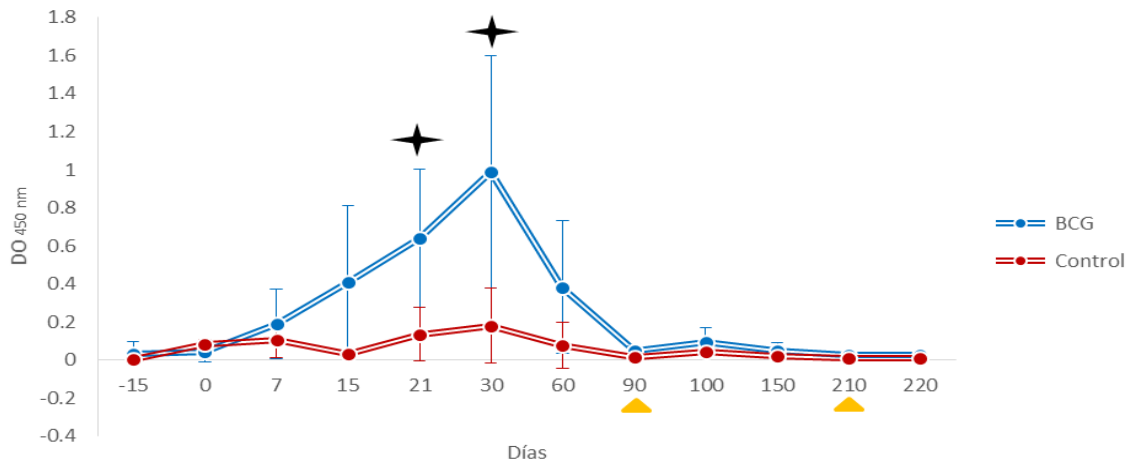


Figura 2. Producción de IFN- γ en sangre completa estimulada con PPD bovino de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Los valores representan la DO_{450nm} obtenida con el PPD bovino menos la DO_{450nm} sin estímulo. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las estrellas indican diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

No se observó diferencia significativa en los niveles de IFN- γ hacia ESAT-6 y CFP-10 entre animales vacunados y no vacunados durante todo el estudio (Fig. 3 y 4). Las curvas de producción de IFN- γ hacia ambas proteínas son muy similares, sin embargo, el antígeno ESAT-6 induce niveles más altos de la citocina que CFP-10. En general, los niveles de IFN- γ hacia ambos antígenos son muy bajos, inferiores o cerca a una DO_{450 nm} de 0.1. No obstante, se observó un incremento hacia ambos antígenos al día 30, debido a la producción de IFN- γ muy elevada de un animal vacunado (# 2970), con una DO_{450 nm} de 0.82 hacia ESAT-6 y de 0.15 hacia CFP-10. Un segundo animal vacunado mostró niveles de IFN- γ hacia ESAT-6 superiores a los demás en los días 7 y 15 (DO_{450 nm} de 0.2 y 0.17 respectivamente). Después de cada incremento, los niveles de IFN- γ regresaron a niveles basales hasta el fin del estudio. De la misma manera, en animales no vacunados, se observó una producción de IFN- γ media-alta y sostenida hacia ESAT-6 en 2 animales, el primero (# 2926) desde el comienzo del estudio hasta el día 30 (DO_{450 nm} de 0.42, 0.28, 0.25, 0.18 y 0.15 respectivamente) y el segundo (# 173) del día 7 al día 21 (DO_{450 nm} de 0.18, 0.13 y 0.29 respectivamente). Los niveles no volvieron a subir durante el resto del estudio. Por lo tanto, la producción de la citocina hacia ambos antígenos es intermitente tanto en animales vacunados como controles y la vacunación no sensibilizó el sistema inmune de los animales

a los antígenos. No se observó un incremento de la citocina después de la aplicación de las PCCT (días 90 y 210 post-vacunación).

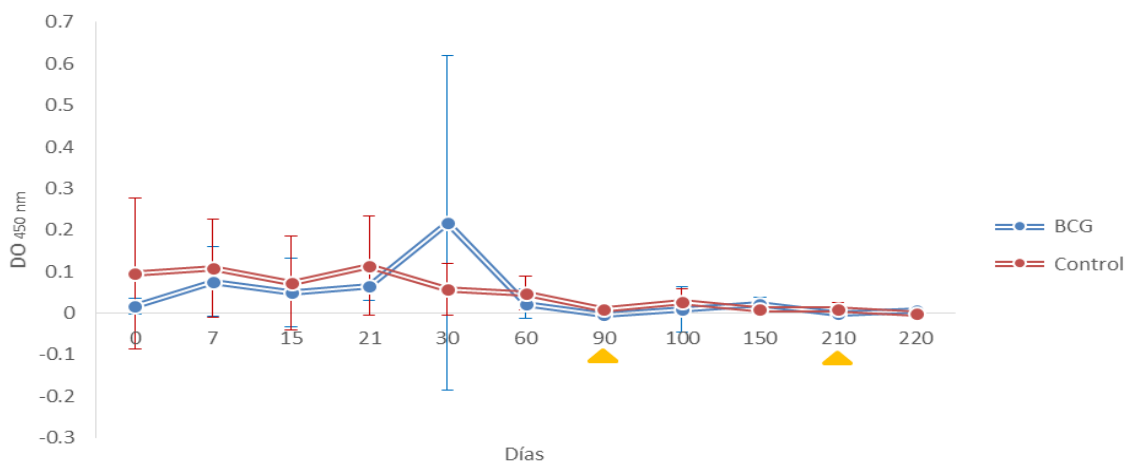


Figura 3. Producción de IFN- γ en sangre completa estimulada con ESAT-6 de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Los valores representan la DO_{450 nm} obtenida con ESAT-6 menos la DO_{450 nm} sin estímulo. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

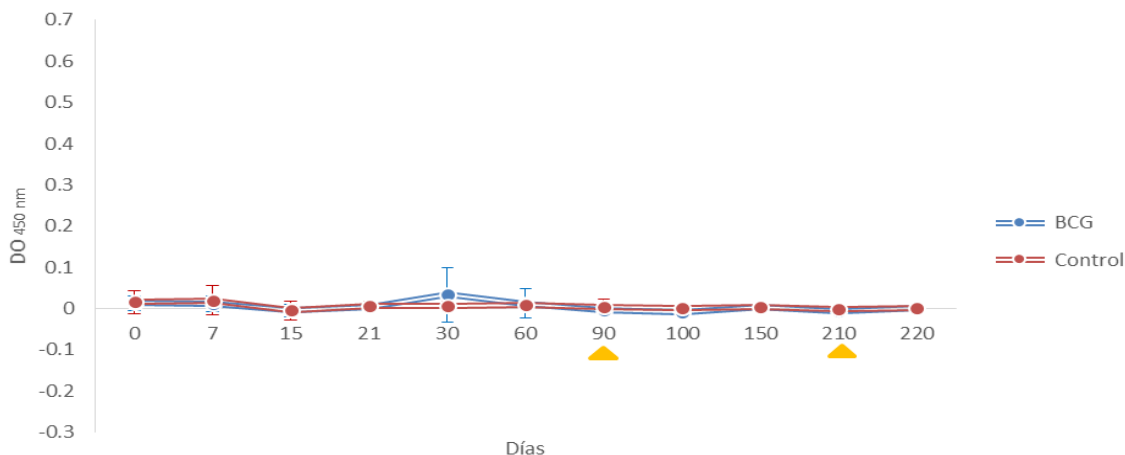


Figura 4. Producción de IFN- γ en sangre completa estimulada con CFP-10 de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Los valores representan la DO_{450 nm} obtenida con CFP-10 menos la DO_{450 nm} sin estímulo. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

No se observó diferencia significativa entre ambos grupos en los niveles de IFN- γ inducidos por el PWM o en sangre no estimulada, representando el control positivo y negativo de la prueba respectivamente (Fig. 5). Se observaron respuestas similares, muy

fuerres y heterogéneas hacia el mitógeno en ambos grupos de animales, con el nivel más alto al día 60 post-vacunación. La fuerte disminución de los niveles de IFN- γ al día 90 en un animal permitió detectar un problema general de salud, el cual falleció una semana después (datos no mostrados). En sangre no estimulada, los niveles de IFN- γ se mantuvieron bajos durante todo el estudio en ambos grupos. No se observó un incremento de la citocina después de la aplicación de las PCCT en ambos grupos de animales, tanto en sangre estimulada con PWM como en sangre no estimulada (días 90 y 210).

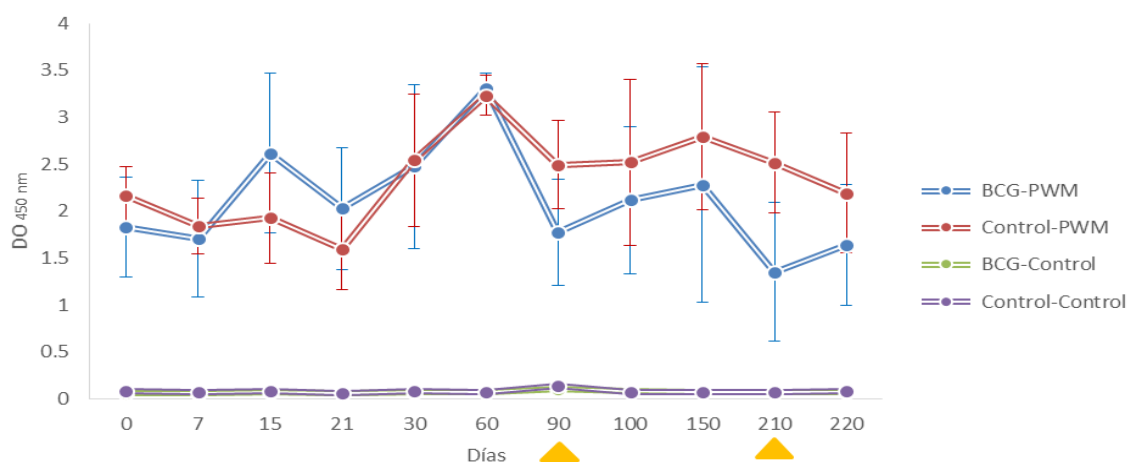


Figura 5. Producción de IFN- γ en sangre completa estimulada con PWM o no estimulada de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Los valores representan la DO_{450 nm} obtenida con PWM menos la DO_{450 nm} sin estímulo o la DO_{450 nm} sin estímulo. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

7.2 Prueba cervical comparativa de la tuberculina (PCCT)

Se realizó la PCCT a los 90 y 210 días post-vacunación (tablas 1 y 2 respectivamente). No se encontró diferencia significativa entre grupos en ambas pruebas aplicadas. Al día 90, todos los animales, tanto vacunados como no vacunados fueron negativos (tabla 1). En la PCCT realizada al día 210, dos animales vacunados fueron sospechosos (tabla 2), de los cuales uno fue fuertemente positivo a ESAT-6 y CFP-10 al día 30 del estudio.

Tabla 1. PCCT de becerras vacunadas con BCG y no vacunadas a los 90 días post-vacunación

Grupos	No. Animal	PPD aviar* (mm)	PPD bovino* (mm)	Interpretación**
BCG (n=5)	367	0	0	-
	764	0	1	-
	2545	1	1	-
	2700	0	0	-
	2970	0	0	-
Control (n=5)	105	0	0	-
	173	0	0	-
	979	1	1	-
	2926	0	0	-
	3172	0	0	-

* Incremento del grosor de la piel (grosor a 72 h menos grosor al día de la inoculación);

** Interpretación estándar (NOM, 1995).

Tabla 2. PCCT de becerras vacunadas con BCG y no vacunadas a los 210 días post-vacunación

Grupos	No. Animal	PPD aviar* (mm)	PPD bovino* (mm)	Interpretación**
BCG (n=5)	367	0	1	-
	764	1	3	S
	2545	†	†	†
	2700	3	2	-
	2970	2	3	S
Control (n=5)	105	0	2	-
	173	1	2	-
	979	1	2	-
	2926	0	0	-
	3172	1	2	-

* Incremento del grosor de la piel (grosor a 72 h menos grosor al día de la inoculación);

** Interpretación estándar (NOM, 1995). S: animal sospechoso; † El animal murió de diarrea.

7.3 ELISA-detección de IgG

En las figuras 6 y 7 se muestran las gráficas de las cinéticas de anticuerpos (IgG totales) de ambos grupos de animales hacia antígenos de *M. avium* y *M. bovis* respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre ambos grupos tanto con el EPFC de *M. avium* como el de *M. bovis*. El nivel de anticuerpos hacia *M. avium* o *M. bovis* fue bajo tanto en

animales vacunados como no vacunados hasta la aplicación de la PCCT (días 90 y 210 post-vacunación), después de la cual, se observaron incrementos en ambos grupos de animales (10 días post-PCCT). Las becerras tienen anticuerpos preferentemente hacia *M. bovis* que *M. avium* y en general, los niveles de anticuerpos hacia *M. bovis* son ligeramente más altos en el grupo de animales vacunados durante todo el estudio. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos.

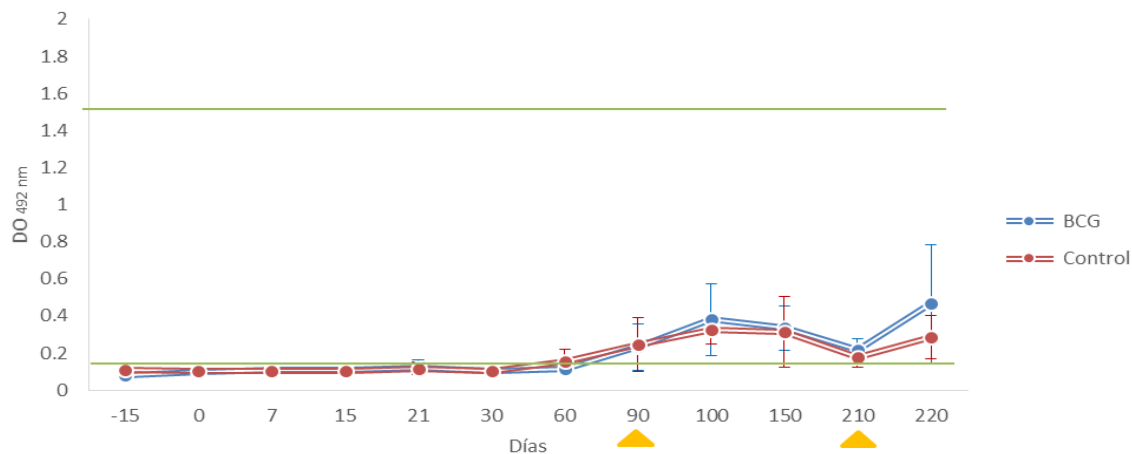


Figura 6. Niveles de anticuerpos hacia el EPFC de *M. avium* en sueros de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las líneas verdes inferior y superior representan los controles negativo y positivo de la prueba respectivamente.

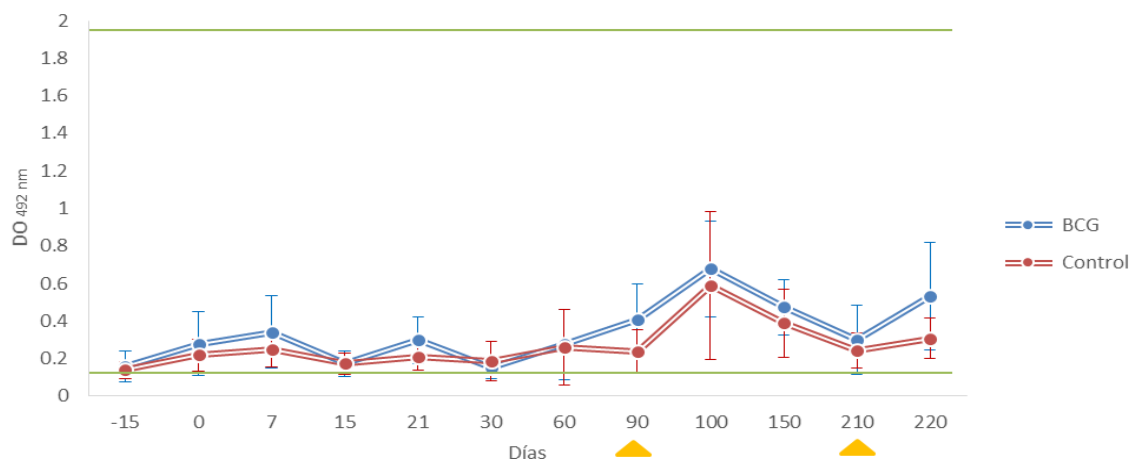


Figura 7. Niveles de anticuerpos hacia el EPFC de *M. bovis* en sueros de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las líneas verdes inferior y superior representan los controles negativo y positivo de la prueba respectivamente.

7.4 PCR simple y anidada

En el presente estudio, no se encontraron muestras positivas con la PCR simple del gen MPB70 (datos no mostrados). Sin embargo, al día 0 del experimento, tres becerras que se vacunaron obtuvieron resultados positivos mediante la PCR anidada. Al día 30 post-vacunación, un animal no vacunado fue positivo a la prueba, mientras que las becerras positivas al día 0 fueron negativas al día 30. Los días 60 y 90 representan los días con más muestras positivas, 7 y 5 respectivamente, probablemente debido a un cambio de corral de las becerras, al lado de animales adultos segregados. Un segundo cambio de corral se hizo antes del día 150 y coincide con una disminución de muestras positivas (3) a los días 150 y 210. Ninguna becerro fue positiva a todas las tomas de muestras y una sola becerro no vacunada (# 105) fue negativa durante todo el estudio. Se observó una frecuencia de muestras positivas superior en animales vacunados, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

Tabla 3. PCR anidada de exudado nasal de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos

Grupos	No. Animal	0[‡]	30	60	90	150	210
BCG (n=5)	367	+	-	+	-	-	+
	764	+	-	+	+	-	-
	2545	-	-	+	*	*	*
	2700	+	-	-	+	+	+
	2970	-	-	-	+	+	-
Control (n=5)	105	-	-	-	-	-	-
	173	-	-	+	+	-	-
	979	-	-	+	-	+	+
	2926	-	+	+	-	-	-
	3172	-	-	+	+	-	-

[‡] Día de la vacunación; * El animal murió de diarrea.

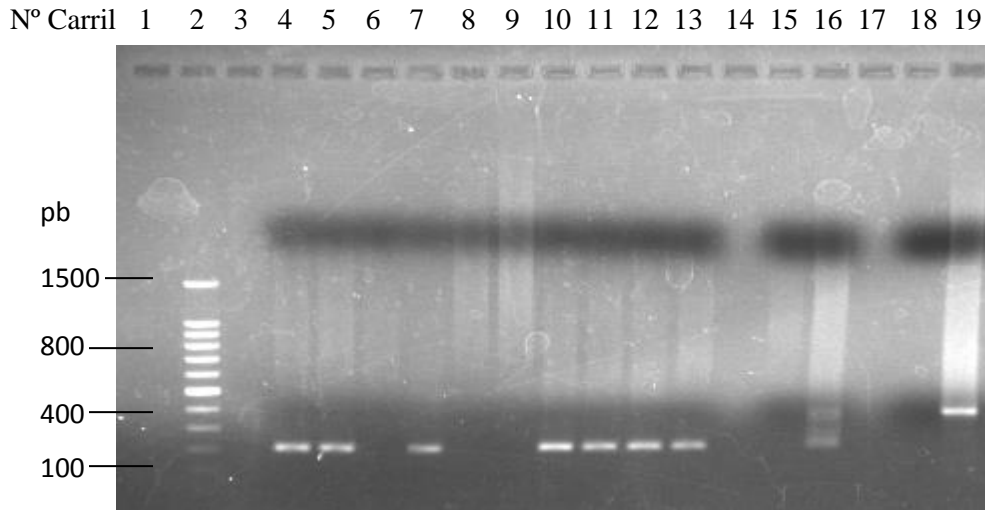


Figura 8. Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de exudados nasales de becerros vacunados con BCG y controles al día 60 post-vacunación. Carril 2: peso molecular; Carriles 4-13: muestras de exudado nasal de las becerros (carriles 4-8: becerros vacunados, carriles 9-13: becerros controles); Carriles 15 y 18: control negativo (agua inyectable) de la PCR anidada y simple respectivamente; Carriles 16 y 19 control positivo (*M. bovis*) de la PCR anidada y simple respectivamente.

7.5 Citometría de flujo

7.5.1 Subpoblaciones de células T WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los porcentaje de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ de ambos grupos (Fig. 9). Los porcentajes son similares entre los dos grupos y la variación entre cada individuo es muy grande. Por lo tanto, la vacunación no indujo variaciones en esas células. La aplicación de las PCCT no incrementó los porcentajes de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ en ambos grupos de animales.

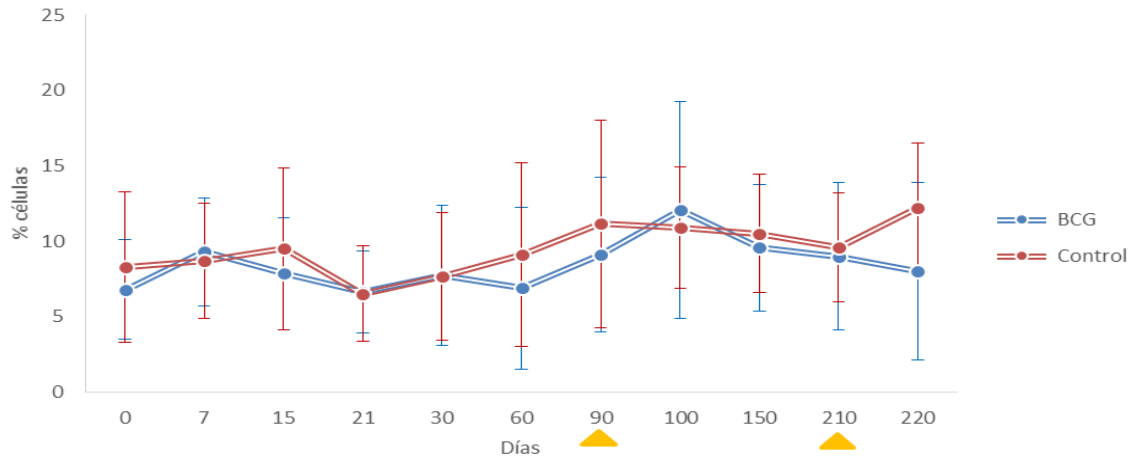


Figura 9. Porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

No se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de células T CD4⁺ de ambos grupos (Fig. 10). Al igual que lo observado en células T $\gamma\delta$ WC1⁺, los porcentajes de las células T CD4⁺ son muy similares entre ambos grupos y la variación entre cada individuo es muy grande. Por lo tanto, la vacunación no indujo variaciones en esas células. La aplicación de las PCCT no incrementó los porcentajes de células T CD4⁺.

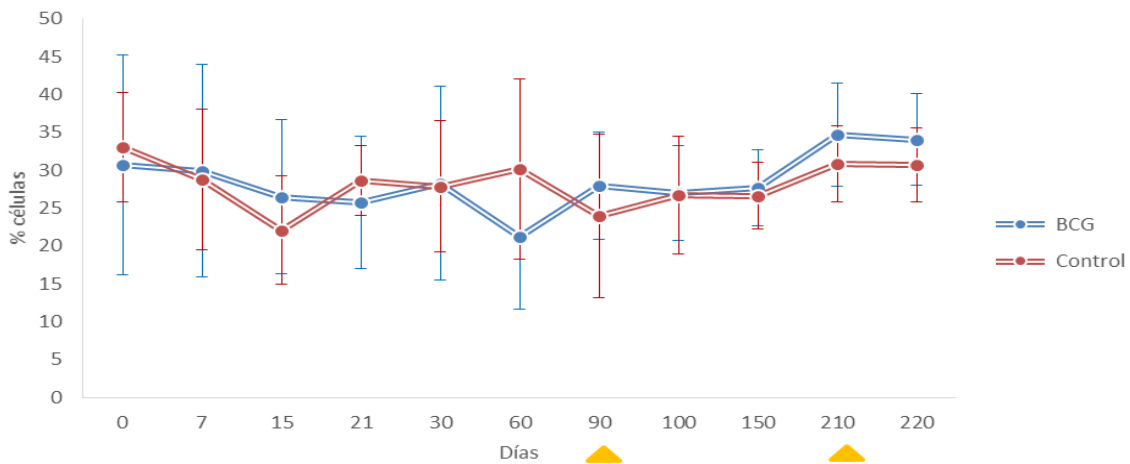


Figura 10. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

En la subpoblación de células T CD8⁺ (Fig. 11), se observaron incrementos significativos en animales vacunados a los días 15, 21, y 30 post-vacunación ($p = 0.0105$, 0.0047 y 0.0098

respectivamente). Al día 60, los porcentajes de células T CD8⁺ bajan en animales vacunados, sin embargo, la diferencia sigue siendo significativa en comparación con los animales controles ($p = 0.0091$). Se encontró 1.64, 1.53, 1.62 y 1.32 veces más células T CD8⁺ en animales vacunados en comparación con animales controles a los días 15, 21, 30 y 60 respectivamente. La aplicación de las PCCT no incrementó los porcentajes de células T CD8⁺ en ambos grupos de animales. Al fin del estudio (día 220), ambos grupos de animales muestran porcentajes muy similares.

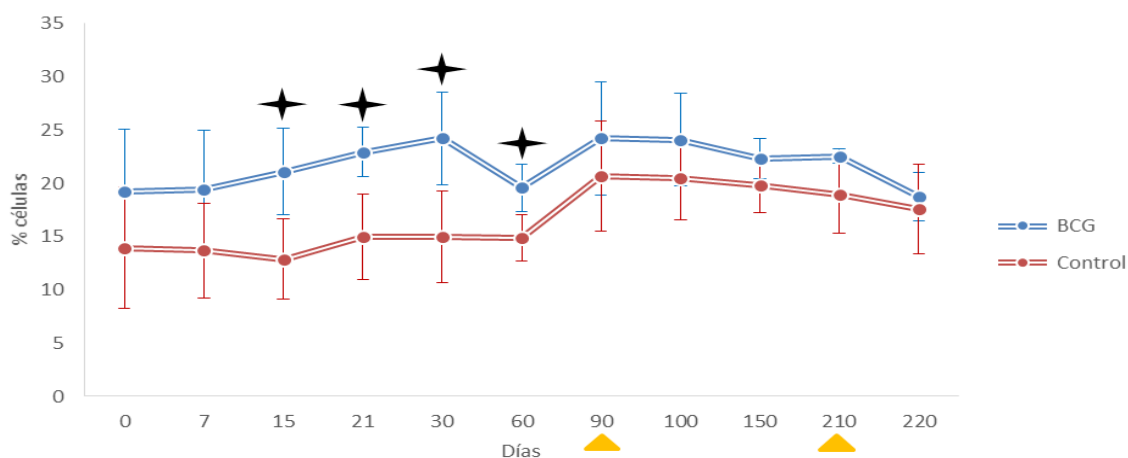


Figura 11. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las estrellas indican diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

7.5.2 Activación de las células T WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺

La figura 12 representa un ejemplo de las graficas de citometría de flujo evaluando la activación de diferentes subpoblaciones de células T (WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺) en sangre completa de un animal vacunado con BCG después de 24 h de cultivo con un CFPE *M. bovis*.

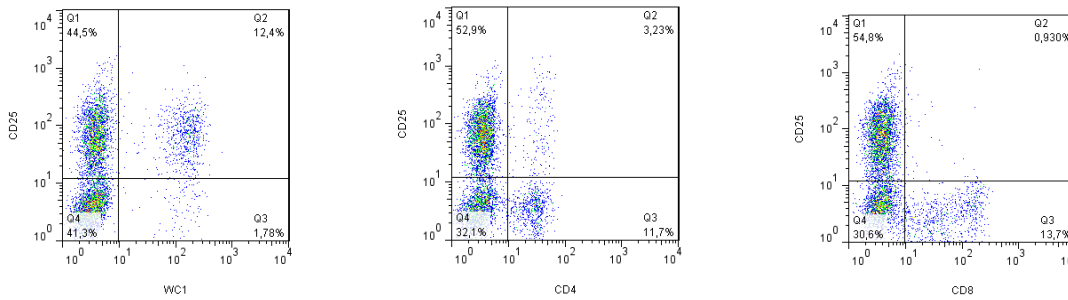


Figura 12. Graficas representativas de citometría de flujo evaluando la activación (CD25⁺) de diferentes subpoblaciones de células T (WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺) en sangre completa de un animal vacunado con BCG al día 21 del experimento después de 24 h de cultivo con un CFPE *M. bovis*.

No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ activadas circulantes entre ambos grupos (Fig. 13). Los porcentajes son muy similares durante todo el estudio. Se observa una disminución de la expresión de CD25 hasta el día 15 en animales vacunados y hasta el día 21 en animales controles. En ambos grupos, se observa un incremento de la activación celular al día 30 y una disminución al día 60. Cabe mencionar que el nivel de activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ circulantes es alto tanto en animales vacunados como no vacunados. Tres días después de la primera PCCT (día 90), se observa un fuerte incremento de la activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ en ambos grupos de animales, seguido de una disminución hasta el día 210. Diez días después de la segunda PCCT (día 220), la activación celular vuelve a subir en ambos grupos de animales.

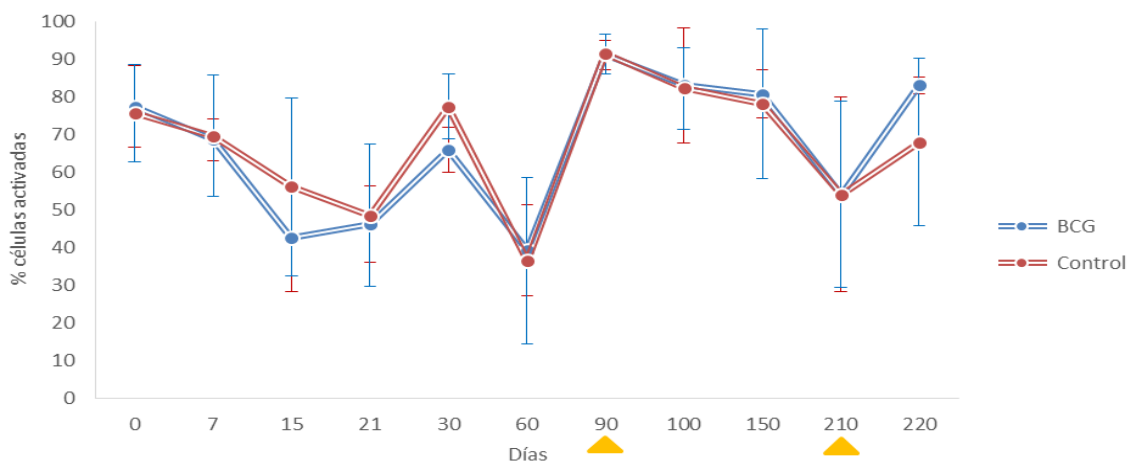


Figura 13. Porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa de becerros vacunados con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

La activación de las células T CD4⁺ en sangre periférica es muy similar tanto en animales vacunados como no vacunados y no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Fig. 14). Desde el principio del experimento hasta el día 60, la expresión de CD25 en células T CD4⁺ es constante, alrededor de 10 % en los dos grupos de animales. Se perciben ligeros incrementos en ambos grupos de animales (días 90, 150 y 220), probablemente debido a la aplicación de las PCCT.

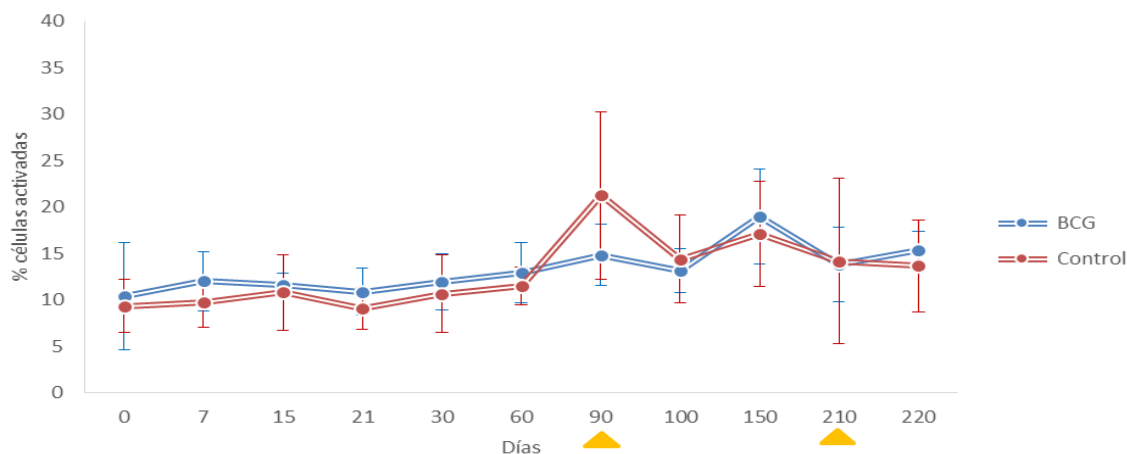


Figura 14. Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

En cuanto a la activación celular de las células T CD8⁺ circulantes, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos hasta el día 220 post-vacunación (Fig. 15). Al día 0, la activación de las células T CD8⁺ se encuentra alta en los 2 grupos y baja hasta el día 15 en animales vacunados y el día 21 en animales controles. Se observa un incremento al día 30 en ambos grupos, seguido de una disminución entre los días 60 y 100. Al día 150, se percibe un incremento en ambos grupos de animales que se podría atribuir a la aplicación de la primera PCCT (día 90). Los niveles de expresión de CD25 bajan al día 210 y vuelven a subir al día 220, diez días después de la aplicación de la segunda PCCT, con una expresión significativamente más alta (1.91 veces) en el grupo vacunado ($p = 0.0275$).

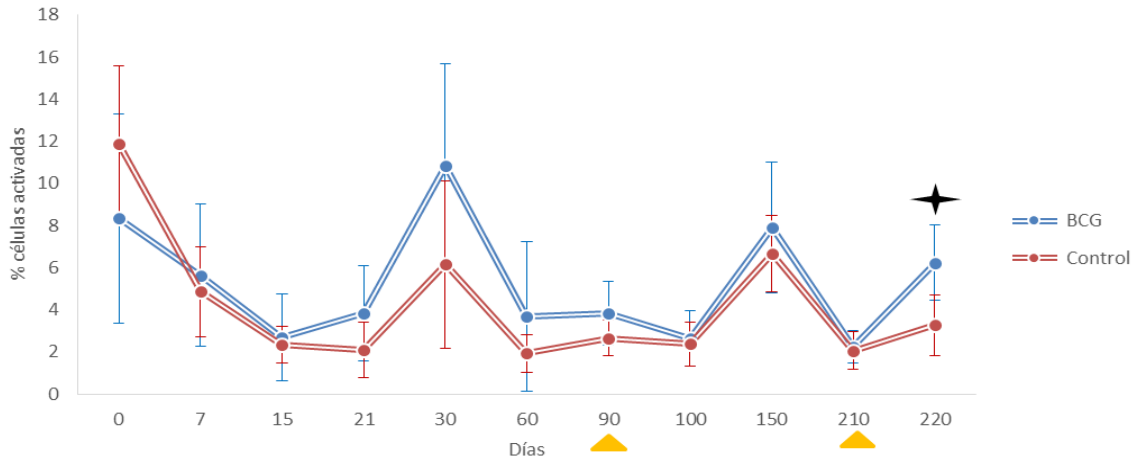


Figura 15. Porcentajes de linfocitos T CD8⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa de becerros vacunados con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. La estrella indica diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ activadas entre ambos grupos (Fig. 16). La activación celular fue alta tanto en animales vacunados como no vacunados. Se detectaron algunos incrementos (días 30, 90 y 220), que no se pueden atribuir a un efecto de la vacuna, ya que se observaron en ambos grupos de animales. No se observaron incrementos de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ activadas después de la aplicación de las PCCT, probablemente debido a que la simple estimulación antigénica activó a la mayoría de las células, impidiendo detectar algún otro tipo de efecto.

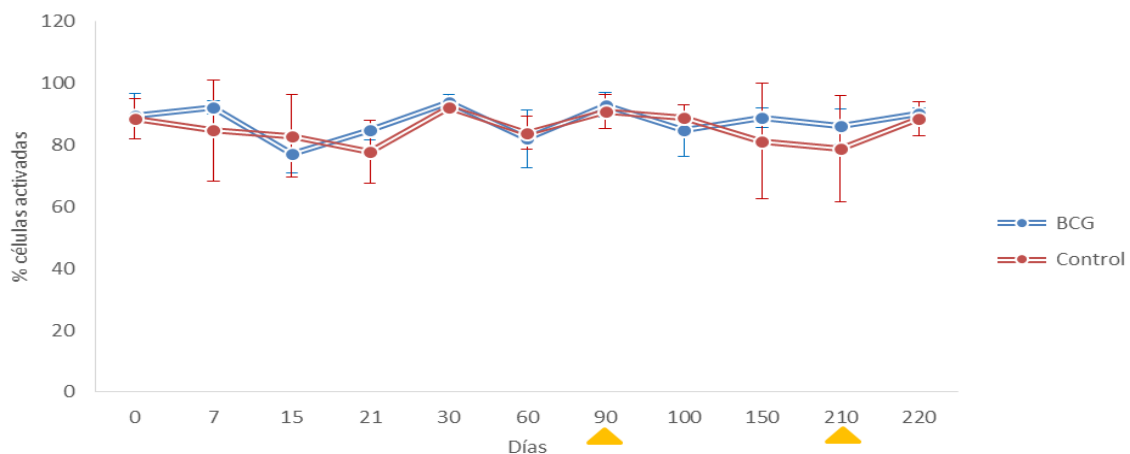


Figura 16. Porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerros vacunados con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

En animales vacunados, la activación de las células T CD4⁺ incrementó desde el día 7 hasta el día 30, con diferencias significativas al día 21 ($p = 0.0308$) y 30 ($p = 0.0113$) en comparación con el grupo control (Fig. 17). Hay 1.70 y 1.94 veces más células T CD4⁺ activadas en animales vacunados que controles al día 21 y 30 respectivamente. La aplicación de las PCCT no incrementó los porcentajes de células T CD4⁺ activadas.

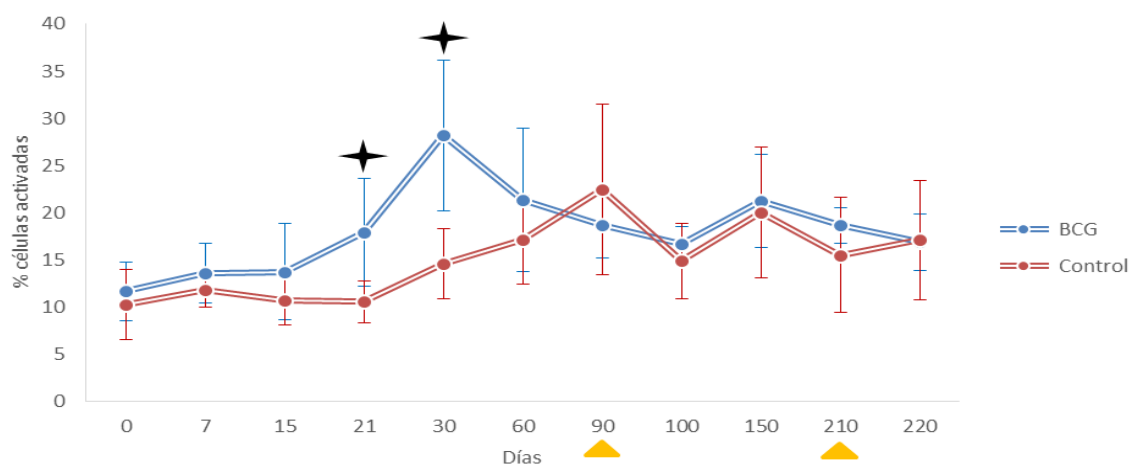


Figura 17. Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las estrellas indican diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

La expresión de CD25 en las células T CD8⁺ fue máximo al día 0 y bajó progresivamente hasta el día 15 en animales vacunados y hasta el día 21 en animales no vacunados (Fig 18). La activación celular vuelve a subir significativamente a los días 21 y 30 en animales vacunados ($p = 0.0019$ y $p = 0.0149$ respectivamente). Hay 2.3 y 1.78 veces más células T CD8⁺ activadas en animales vacunados a los días 21 y 30 respectivamente. Al día 100, los porcentajes de células T CD8⁺/CD25⁺ son iguales en ambos grupos. Se observó un incremento de la activación celular al día 150 en los dos grupos de estudio, probablemente debido a la primera PCCT (día 90). Después, los porcentajes bajan (día 210) y vuelven a subir (día 220), después de la segunda PCCT (día 210).

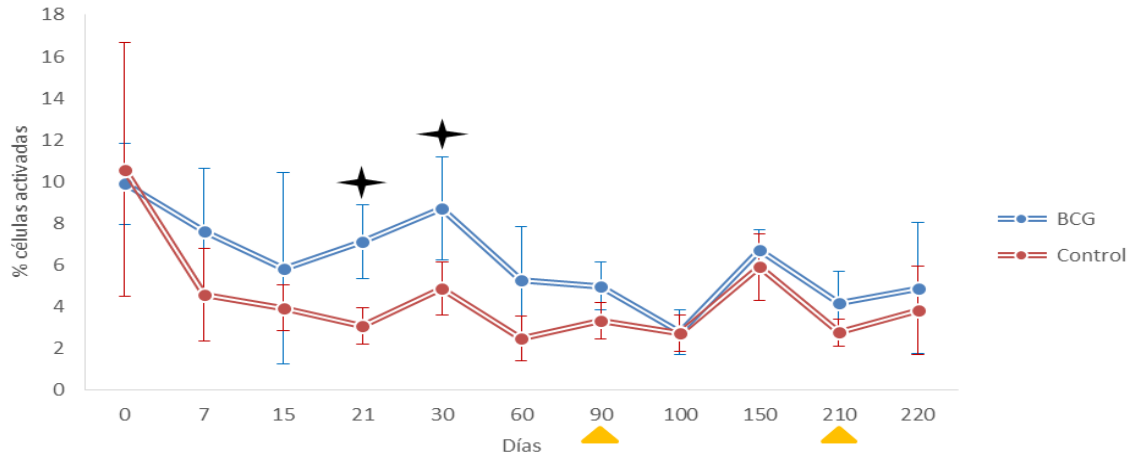


Figura 18. Porcentajes de linfocitos T CD8⁺ activados (CD25⁺) en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las estrellas indican diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

7.5.3 Producción de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-4) en linfocitos

La figura 19 representa un ejemplo de las graficas de citometría de flujo evaluando la expresión de diferentes citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-4) en linfocitos de sangre completa de un animal no vacunado después de 24 h de cultivo con un CFPE *M. bovis*.

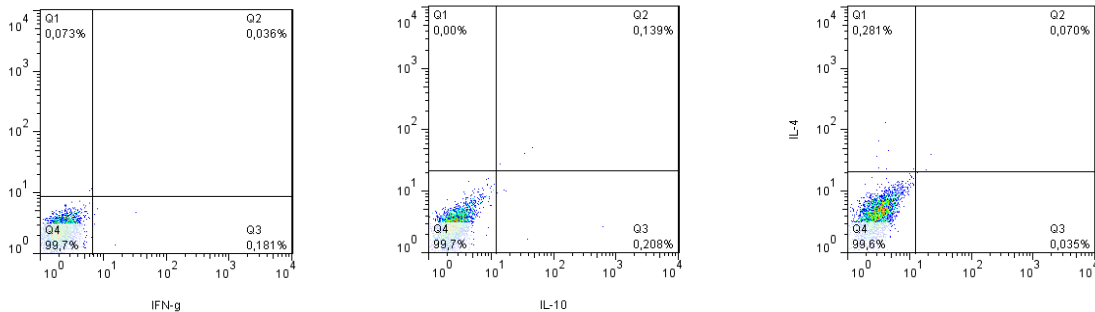


Figura 19. Graficas representativas de citometría de flujo evaluando la expresión de citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-4) en linfocitos de sangre completa de un animal no vacunado al día 90 del experimento después de 24 h de cultivo con un CFPE *M. bovis*.

No se encontró diferencia significativa en la expresión de IFN- γ en linfocitos de sangre periférica entre ambos grupos de animales durante el estudio (Fig. 20). La variación de la

expresión de esta citocina es muy grande entre cada individuo. Los valores promedios se mantienen entre 0.084 y 0.266 %. La aplicación de las PCCT no incrementó los porcentajes de linfocitos expresando IFN- γ .

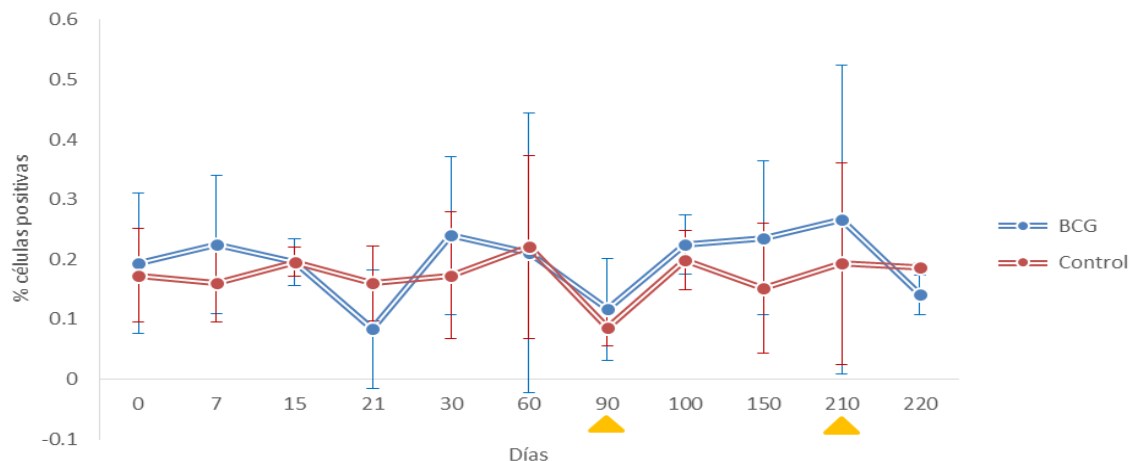


Figura 20. Porcentajes de linfocitos expresando IFN- γ en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

En la figura 21, se pueden observar valores de IL-10 muy bajos entre los días 0 y 21 en ambos grupos de animales. Sin embargo, a partir del día 30, los valores suben y se mantienen alrededor de 0.15 % hasta el día 150 en animales vacunados y hasta el fin del estudio en animales controles. La aplicación de la primera PCCT (día 90) no incrementó significativamente los niveles de IL-10, mientras que la segunda PCCT (día 210) incrementó la expresión de IL-10 en animales no vacunados al día 220 ($p = 0.0422$), con 2.13 veces más linfocitos expresando la citocina.

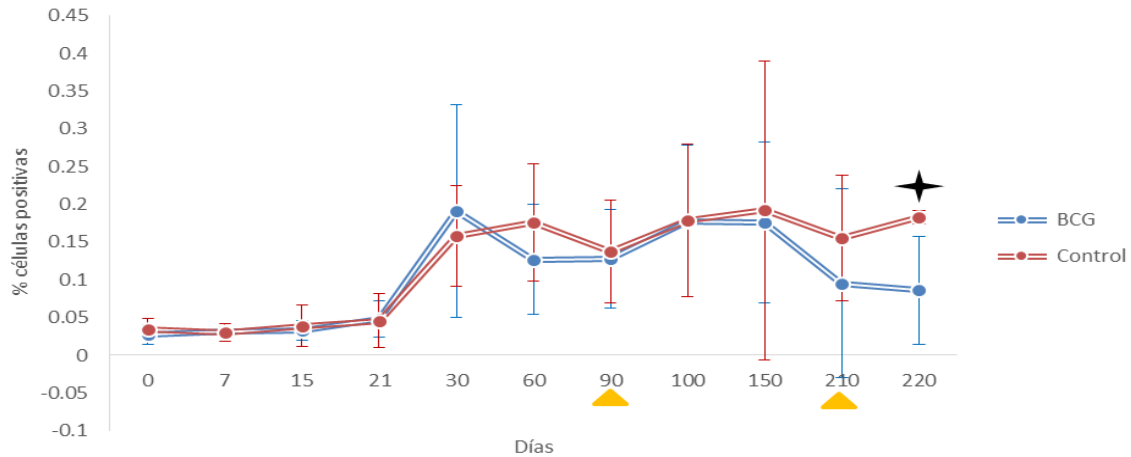


Figura 21. Porcentajes de linfocitos expresando IL-10 en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. La estrella indica diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

La expresión de IL-4 es nula o baja en ambos grupos de animales entre los días 0 y 15 (Fig. 22). Sin embargo, su expresión sube en los dos grupos al día 21 y vuelve a bajar entre los días 30 y 100 post-vacunación. Se observó una diferencia significativa al día 150 entre ambos grupos de animales ($p = 0.0439$), ya que la expresión de IL-4 subió solamente en animales controles, con 5.76 veces más de linfocitos expresando la citocina, probablemente debido a la aplicación de la primera PCCT al día 90. Después, la expresión de IL-4 vuelve a bajar hasta el día 220, regresando a valores similares a los de los animales vacunados.

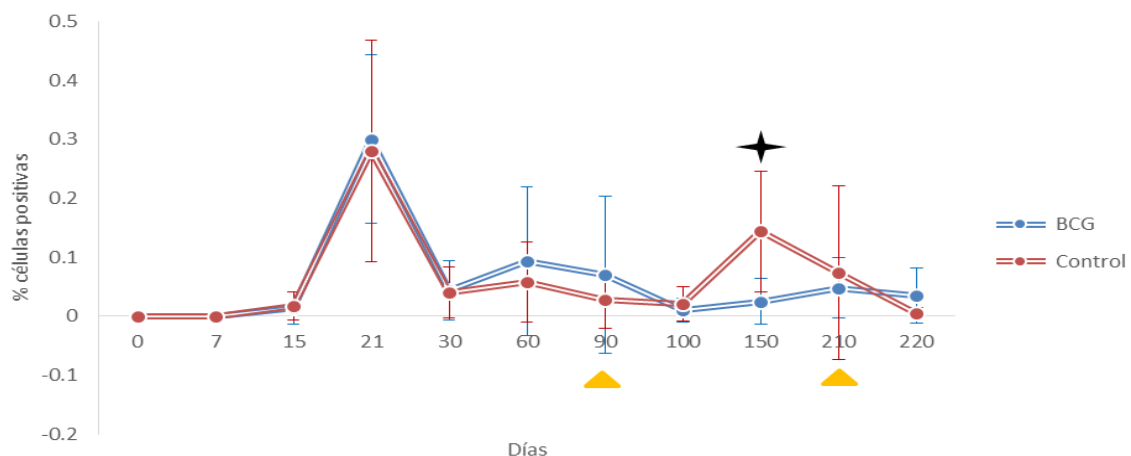


Figura 22. Porcentajes de linfocitos expresando IL-4 en sangre completa de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. La estrella indica diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

No se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión de IFN- γ entre ambos grupos de animales después de la estimulación de la sangre con antígenos de *M. bovis* (Fig. 23). Al igual que en sangre no estimulada, la variación de los porcentajes de la citocina es muy alta entre cada individuo y los promedios de los porcentajes se mantienen entre 0.055 y 0.318 %. En ambos grupos de becerras, los valores son constantes hasta el día 60. En animales vacunados, los porcentajes de IFN- γ suben y alcanzan su mayor expresión tres días después de la primera PCCT (día 90), mientras que en animales no vacunados, se observó un incremento del día 90 al día 150, para después disminuir hasta el día 210 en animales vacunados y hasta el día 220 en animales controles. Los porcentajes de la citocina vuelven a subir después de la segunda PCCT (día 220) solamente en animales vacunados.

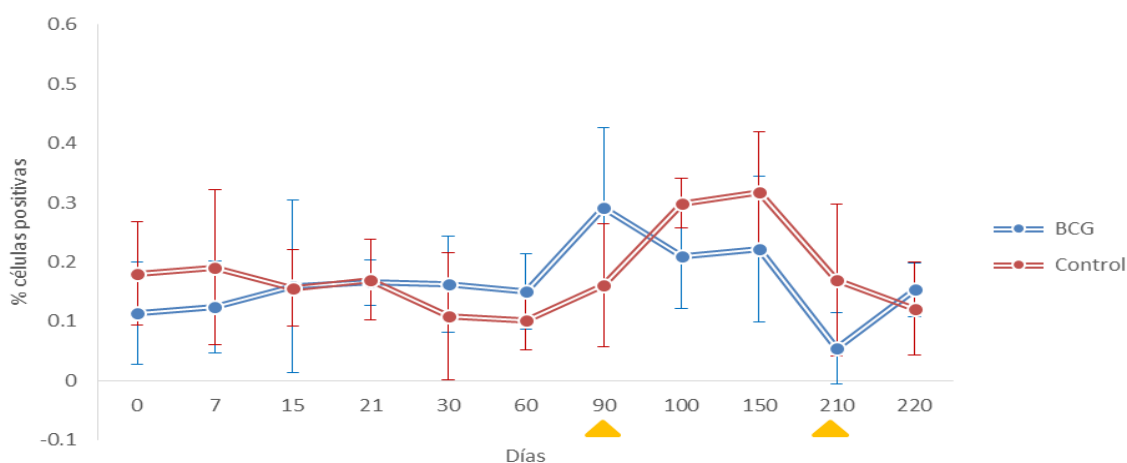


Figura 23. Porcentajes de linfocitos expresando IFN- γ en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT.

Al igual que en sangre no estimulada (Fig. 21), los valores de IL-10 en sangre estimulada son muy bajos entre los días 0 y 21 y se observa un incremento al día 30 en ambos grupos de animales (Fig. 24). Sin embargo, la expresión de IL-10 sigue subiendo en animales controles al día 60 ($p = 0.0011$), a diferencia de en animales vacunados, con 2.79 veces más células expresando la citocina. La primera PCCT (día 90) provocó un incremento de la expresión de la citocina, la cual bajó al día 100 y vuelve a subir al día 150 en los dos grupos. La inoculación de la segunda PCCT (día 210) provocó un incremento

significativo de los niveles de IL-10 al día 220 en animales controles ($p = 0.0415$), al igual que en sangre no estimulada, con 2.14 veces más linfocitos expresando la citocina.

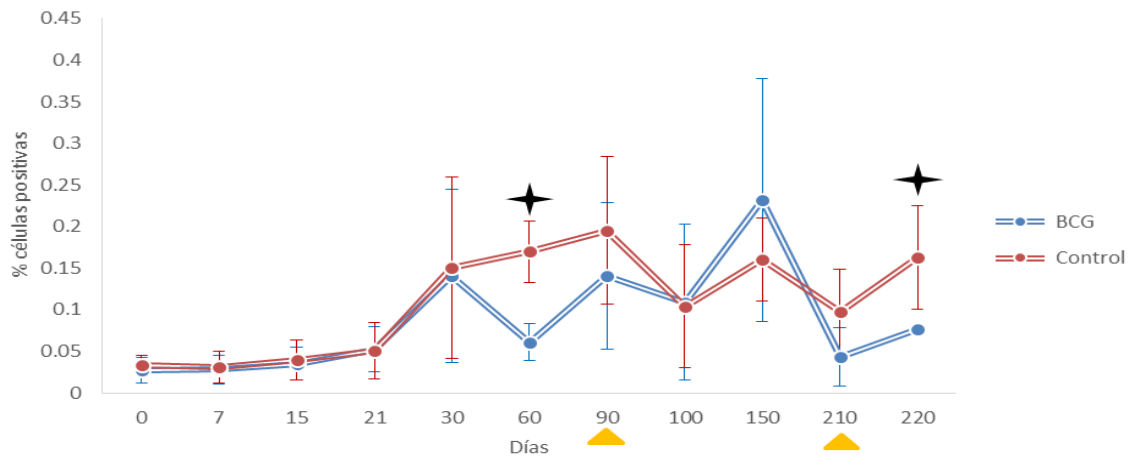


Figura 24. Porcentajes de linfocitos expresando IL-10 en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerras vacunadas con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. Las estrellas indican diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

La expresión de IL-4 es muy similar en sangre estimulada con antígenos micobacterianos (Fig. 25) y no estimulada (Fig. 22) del día 0 a 60, con niveles muy bajos de la citocina entre los días 0 a 15, un fuerte incremento al día 21 y porcentajes bajos en los días 30 y 60. Sin embargo, la aplicación de la primera PCCT provocó un incremento de IL-4 al día 90 en ambos grupos de animales. Los porcentajes vuelven a bajar al día 100 y se observó un incremento significativo al día 150 en animales controles ($p = 0.0149$), al igual que en sangre no estimulada, con 3.21 veces más linfocitos que expresan la citocina, en comparación con los animales vacunados. Los niveles regresan a valores muy similares a los de los animales vacunados en los días 210 y 220.

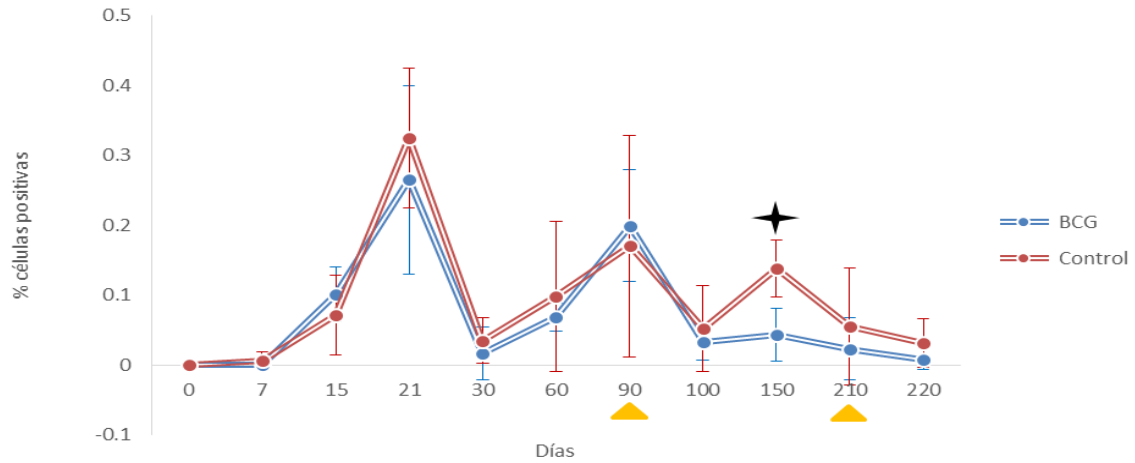


Figura 25. Porcentajes de linfocitos expresando IL-4 en sangre completa estimulada con un EPFC de *M. bovis* de becerros vacunados con BCG y controles en diferentes tiempos. Las barras representan las desviaciones estándares de los promedios. Los triángulos indican la aplicación de la PCCT. La estrella indica diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluó la respuesta inmune inducida por la vacuna BCG Phipps en becerras neonatas, en un hato de alta prevalencia de TBb y se analizó la utilidad de algunas pruebas diagnósticas de TBb en condiciones naturales de campo. Existen pocos reportes que determinan la actividad de la BCG y la utilidad de pruebas diagnósticas de TBb, usando animales infectados como fuente de transmisión de la enfermedad y bajo condiciones rutinarias de manejo del hato. En estos estudios, una alta tasa de transmisión es requerida, lo cual se logró por la alta prevalencia de la enfermedad en el hato (40 %).

La vacunación con BCG de bovinos neonatos es asociada a una respuesta inmune de tipo Th1, importante para la inducción de la protección (Hope et al., 2011). Los bovinos son inmunocompetentes al nacer y normalmente, muestran una respuesta hacia el PPD aviar a las 6 semanas de edad. Se ha reportado que la vacunación del ganado con respuestas pre-existentes hacia las micobacterias ambientales es menos efectiva que en animales no sensibilizados (Buddle et al., 2002b). Por lo tanto, en el presente trabajo, se vacunaron bovinos neonatos, evitando cualquier interferencia con las micobacterias ambientales en el desarrollo de la inmunidad inducida por la BCG, lo cual se demostró mediante las respuestas de IFN- γ bajas hacia el PPD aviar antes de la vacunación (día -15).

Recientemente, se ha demostrado que la BCG representa una vacuna potente contra la TBb en condiciones de campo (Ameni et al., 2010), confirmando los resultados de varios estudios de desafíos experimentales (Buddle et al., 2005c; Hope et al., 2005a; Vordermeier et al., 2006). Sin embargo, a diferencia de los estudios experimentales, en los cuales la vacunación con BCG disminuye la patología sin inducir una protección completa, se demostró en condiciones naturales, que la BCG disminuye el número de animales con lesiones y positivos al cultivo bacteriológico, a pesar de la exposición continua a *M. bovis* (Ameni et al., 2010). Explican que podría ser debido a la exposición a dosis infecciosas más altas en desafíos experimentales. Por lo tanto, estos resultados son alentadores y destacan la utilidad potencial de la vacuna BCG en programas de control de la TBb, particularmente en países en desarrollos, donde el sacrificio de los animales positivos es costoso.

En el presente trabajo, se evaluó la producción de IFN- γ inducida por los PPDs aviar y bovino en animales vacunados con BCG y controles durante un periodo de 7 meses, una evaluación que se hace frecuentemente en vacunas contra de la TBb. Se ha reportado que los

niveles de IFN- γ incrementan entre 2 a 4 semanas post-vacunación y disminuyen a partir de la semana 5 (Buddle et al., 1995a,b; Vordermeier et al., 2002; Hope et al., 2005a, 2011), similar a lo encontrado en el presente trabajo, en el cual se observó un incremento significativo en la semana 4 hacia el PPD aviar y en las semanas 3 y 4 hacia el PPD bovino, demostrando que la vacunación indujo la producción de una citocina de tipo Th1 y que la respuesta está dirigida hacia una IMC. La amplitud de la respuesta es muy similar hacia ambos antígenos y se ha demostrado que la mayoría de los animales vacunados con BCG producen respuestas de IFN- γ hacia ambos PPDs (Buddle et al., 1999; Hope et al., 2005a), debido a que poseen antígenos compartidos entre micobacterias ambientales y patógenas.

No se pudo evaluar el grado de protección inducido por la vacuna en el presente estudio, sin embargo, se ha reportado que las vacunas más efectivas contra la TBb inducen respuestas específicas de IFN- γ (Black et al., 2002). No todas las vacunas que inducen IFN- γ resultan protectoras contra la TBb, no obstante, las vacunas que no estimulan su producción invariablemente no protegen. Por ejemplo, la vacunación de animales con BCG Danesa indujo un nivel similar de protección que la BCG Pasteur, a pesar de tener una respuesta de IFN- γ significativamente inferior (Wedlock et al., 2007), demostrando que los niveles de IFN- γ inducidos no correlacionan necesariamente con la protección. Por otro lado, un estudio de vacunación con BCG realizado bajo condiciones de campo demostró que una respuesta de IFN- γ hacia el PPD bovino se detectó 2 semanas post-vacunación solamente en becerras sin lesiones. No detectaron incrementos de la citocina en animales vacunados con lesiones o no vacunados (Ameni et al., 2010), demostrando que solamente los animales protegidos produjeron IFN- γ . En el presente trabajo, las respuestas fueron muy variada entre cada individuo (día 30), con niveles altos de DO_{450nm} en 3 animales (1.22, 1.24 y 1.67), poco incremento en un animal (0.06) y una producción intermedia (0.74) en el animal restante (datos no mostrados), demostrando que el sistema inmune de cada animal reacciona de manera diferente frente a la vacunación. Consecuentemente, es importante evaluar los niveles IFN- γ inducidos por la vacunación en cada animal 2-4 semanas post-vacunación, ya que no todos desarrollan una IMC y resultan protegidos por la vacuna.

La prueba de la tuberculina representa una prueba *in vivo* que puede influir en el diagnóstico *in vitro* de la TBb. La PCCT se aplicó a los 90 y 210 días post-vacunación y las muestras de sangre se tomaron 3 y 10 días después de la aplicación de la prueba, con la

finalidad de determinar si el tiempo de toma de muestra influía sobre diversos parámetros. No se detectaron cambios en la producción de IFN- γ *in vitro* hacia los PPDs después de la PCCT en los 2 grupos. Varios estudios han investigado la influencia de las pruebas de la tuberculina sobre las respuestas de IFN- γ en sangre (Rothel et al., 1990b; De La Rúa-Domenech et al., 2006). En ganado infectado con *M. bovis*, un incremento en el nivel de IFN- γ hacia el PPD bovino se observó 3 días después de la prueba caudal, el cual regresó a un nivel basal 10 días post-tuberculina (Whipple et al., 2001; Palmer et al., 2006; Coad et al., 2010). En animales infectados naturalmente, la PCCT no afectó la producción de IFN- γ a los 3 y 10 días post-PCCT (Doherty et al., 1995; Gormley et al., 2004; Coad et al., 2007, 2010), correlacionando con el presente estudio. El incremento de la producción de IFN- γ *in vitro* después de la prueba caudal y la ausencia de respuesta ante la PCCT han conducido a varios debates y sería interesante investigar las bases de estas diferencias.

La vacunación con BCG puede comprometer el diagnóstico de la TBb basado en la prueba de la tuberculina (Buddle et al., 1995a, 1999; Vordermeier et al., 1999), razón por la cual su uso en ganado es prohibido actualmente en las campañas de control. El ensayo de IFN- γ se utiliza como prueba diagnóstica complementaria a la prueba de la tuberculina y puede fácilmente modificarse agregando antígenos específicos que pueden diferenciar animales vacunados de infectados (Pollock et al., 2001; Vordermeier et al., 2001b; Whelan et al., 2010). Durante la última década, han existido avances en la identificación de antígenos diferenciales (Mahairas et al., 1996; Behr et al., 1999; Gordon et al., 1999). Dos proteínas se han identificado, ESAT-6 y CFP-10 (Pollock y Andersen 1997a,b), ambas codificadas por genes de la región RD1 del genoma de las micobacterias patógenas y ausentes del genoma de todas las cepas de BCG y de la mayoría de las micobacterias ambientales (Mahairas et al., 1996; Behr et al., 1999; Gordon et al., 1999; Garnier et al., 2003). Cuando se utilizan como antígenos de diagnóstico, han demostrado discriminar el ganado vacunado de infectado (Buddle et al., 1999; Vordermeier et al., 1999, 2001b).

En el presente trabajo, se utilizaron los antígenos ESAT-6 y CFP-10 en la prueba de IFN- γ para diferenciar animales vacunados de infectados. En general, se observaron niveles de IFN- γ bajos hacia ambos antígenos, sin embargo, se detectaron incrementos intermitentes en ambos grupos. Los genes que codifican estas proteínas están presentes en algunas micobacterias no tuberculosas como *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. goodii*, *M.*

sulgai, *M. flavescens* y *M. gastri* (Pollock y Andersen, 1997a; Arend et al., 2005). Se ha aislado *M. kansasii* de individuos no enfermos y se ha reportado que un tercio de esos aislados representan una colonización y no una infección (Ahn et al., 1982), es decir la presencia del microorganismo en la piel o mucosas sin causar la enfermedad (Salzman y Lorry, 1996). El impacto de la colonización de esas micobacterias en las pruebas diagnósticas de TB no está bien elucidado. La colonización ocurre también en ganado (Pollock y Andersen, 1997a) y puede inducir respuestas inmunes detectables (tuberculina, IFN- γ y anticuerpos), fuentes de respuestas falsas positivas hacia ESAT-6 y CFP-10 (Waters et al., 2006; Vordermeier et al., 2007). Además, se han observado animales reactivos a la prueba de la tuberculina, sin lesión y aislamiento de *M. bovis*, aunque no se conoce si eran colonizados o infectados con micobacterias no tuberculosas. Otro estudio demostró que el uso de ESAT-6 y CFP-10 incrementó ligeramente la sensibilidad de la prueba de IFN- γ en animales previamente expuestos a *M. avium* y desafiados con *M. bovis*. Sin embargo, las respuestas fueron ausentes o intermitentes y más bajas que las observadas en animales desafiados solamente con *M. bovis*, muy parecido a lo observado en el presente estudio. Concluyeron que las respuestas de memoria inducidas por *M. avium* interfieren en el diagnóstico, incluso cuando antígenos específicos son utilizados (Hope et al., 2005b).

El porcentaje de micobacterias no tuberculosas es desconocido en el hato donde se realizó el presente estudio, así como el número de animales colonizados o infectados por esas micobacterias. Sin embargo, las respuestas bajas e intermitentes de IFN- γ hacia ESAT-6 y CFP-10 podrían ser debido a micobacterias no tuberculosas que secretan esas proteínas, las cuales sensibilizaron al ganado. La inducción intermitente de IFN- γ al principio del estudio, así como la desaparición de las respuestas, son indicativas de la eliminación efectiva del microorganismo. Consecuentemente, la exposición del ganado a tales micobacterias podría inducir respuestas específicas e interferir en el diagnóstico de la TBb, particularmente en la interpretación de las pruebas que usan ESAT-6 y CFP-10. Por lo tanto, su uso en la prueba de IFN- γ no representó una herramienta segura y confiable bajo condiciones naturales de campo, donde las micobacterias no tuberculosas son presentes y no permitió diferenciar los animales infectados de los vacunados.

La aplicación de las dos PCCT no incrementó la producción de IFN- γ hacia ESAT-6 y CFP-10 en animales vacunados o controles. En un estudio donde determinan el efecto de

dos diferentes pruebas de la tuberculina (caudal y PCCT) sobre la producción de IFN- γ , se observó un incremento de los niveles de la citocina hacia ESAT-6/CFP-10 solamente en animales infectados, 3 a 7 días después de la prueba caudal, mientras que no se observaron incrementos después de la PCCT tanto en animales vacunados como controles (Palmer et al., 2006), correlacionando con el presente estudio.

La producción de IFN- γ inducida por el mitógeno PWM permite verificar tanto la viabilidad y la funcionalidad celular como la inmunocompetencia del sistema inmune de las becerras y sirvió como control positivo de la prueba. El PWM, una lectina obtenida de extractos crudos de raíces de la planta *Phytolacca americana*, es ampliamente utilizado en ensayos *in vitro*, tanto en investigación básica como en estudios clínicos, para examinar la activación funcional y la proliferación de linfocitos. Este mitógeno induce la mitosis policlonal de linfocitos B y T mediante su unión a residuos de azúcar de las cadenas laterales de glicoproteínas de la superficie celular (Yang et al., 2006; Tizard, 2009). En el presente estudio, se observaron respuestas fuertes y heterogéneas hacia el mitógeno en ambos grupos de becerras, demostrando la competencia del sistema inmune de las becerras, así como la viabilidad y funcionalidad celular. La disminución drástica de la producción de IFN- γ se presentó en un animal al día 90, lo que permitió detectar una falla en el sistema inmune del animal, el cual falleció una semana después. Por otro lado, no se observó producción de IFN- γ en sangre completa sin estímulo (control negativo de la prueba) durante todo el estudio en ambos grupos de animales, como lo esperado.

La prueba de la tuberculina es caracterizada por generar una respuesta de HR, proporcionando una medida de la IMC. Actualmente, sigue siendo la herramienta de inmunodiagnóstico más aplicada para la detección de la TBb, después de la cual, los animales reactivos deben ser sacrificados (Whelan et al., 2011). En países en desarrollo como México, donde el sacrificio de los animales reactivos es costoso, la aplicación de una vacuna como estrategia de control de la TBb representa una solución atractiva. La BCG representa la única vacuna comercial disponible en humano y ha sido ampliamente probada en ganado contra la TB. No obstante, un impedimento significativo de la introducción de la BCG como vacuna en bovinos es que puede sensibilizar a los animales a la prueba de la tuberculina, lo que invalida el diagnóstico (Berggren, 1981; Buddle et al., 1995a).

No existen muchos reportes sobre la duración de la HR en animales vacunados con BCG. Moodie (1977) observó una reacción positiva a la prueba de la tuberculina en la mayoría de los animales vacunados con BCG, con una disminución de respuesta a las 6 semanas y ningún animal positivo a los 18 meses. En otro estudio, se ha demostrado que la vacunación de bovinos neonatos con BCG induce una fuerte reacción a la prueba de la tuberculina durante los primeros 6 meses, la cual disminuye rápidamente a los 9 meses (de 80 % a 8 %). A los 24 meses post-vacunación, una pequeña proporción de los animales tenían todavía una respuesta positiva (Whelan et al., 2011). Otro resultado importante de este último estudio y otros es que la pérdida de la reactividad a la prueba de la tuberculina en animales vacunados con BCG no correlaciona con la pérdida de la protección (Comstock, 1988; Floyd et al., 2002; Whelan et al., 2011).

En el presente trabajo, se realizó la PCCT a los 90 y 210 días post-vacunación. Ningún animal, tanto del grupo vacunado como control fue positivo a la primera PCCT, mientras que 2 animales vacunados fueron sospechosos en la segunda PCCT, demostrando que la vacunación con BCG no siempre interfiere con la prueba de la tuberculina. La ausencia de respuesta podría ser debida a la cepa utilizada (Phipps), ya que en la mayoría de los estudios realizados en ganado, donde hay reactividad a la prueba de la tuberculina, se utilizó la cepa Pasteur o Danesa (Buddle et al., 1995a,b, 2003b; Ameni et al., 2010; Whelan et al., 2011). Se ha demostrado que la diversidad genética de las diferentes cepas de BCG influye en la expresión de genes (Brosh et al, 2007), la inmunogenicidad (Davids et al., 2006; Aguirre-Blanco et al., 2007), la virulencia (Hengster et al., 1992; Kroger et al., 1995) y la viabilidad (Gheorghiu y Lagrange, 1983), lo cual afecta probablemente la respuesta inmune de los animales hacia la prueba de la tuberculina y la protección inducida.

En un estudio realizado durante 50 años con nativos de Alaska, en el cual 3025 niños y adultos recibieron BCG Phipps, BCG Pasteur o un placebo, se observó una eficacia vacunal menor de la cepa Phipps (44 %), en comparación con la cepa Pasteur (59 %), demostrando diferencias de protección entre cepas (Aronson et al., 2004). Por otro lado, un estudio realizado en ratones con 10 diferentes cepas de BCG ha demostrado diferencia en la protección entre cepas y propone la BCG Phipps como cepa de referencia en la evaluación de nuevas vacunas en el modelo murino de TB. Cada cepa demostró un perfil de respuesta Th1 y Th2 particular, demostrando diferencias en la inmunogenicidad. La BCG Phipps

indujo una mejor protección, con una reducción persistente y superior de las UFC, así como menos superficie pulmonar afectada por neumonía y respuestas de HR moderadas post-desafío. Las cepas de menor protección eran asociadas a una inflamación pulmonar y respuestas de HR más fuertes, mientras que las cepas que procuraron un nivel alto de protección indujeron respuestas de HR bajas (Castillo-Rodal et al., 2006), indicando que las respuestas de HR no correlacionaron con la protección. En el presente estudio, la ausencia de reacción a la PCCT demuestra que la cepa Phipps induce un perfil inmunológico diferente de las cepas Pasteur y Danesa, por lo cual es necesario realizar más estudios sobre su protección en bovinos, ya que se podría utilizar en los programas de control de la TBb.

La razón por la cual la vacuna no indujo una reacción de HR no está clara, ya que indujo respuestas específicas de IFN- γ *in vitro*, demostrando 2 respuestas separadas. La disociación de estas respuestas post-vacunación se ha descrito en recién nacidos (Ota et al., 2006). Además, en bovinos neonatos vacunados con BCG, se ha demostrado que la respuesta de IFN- γ se mantiene tanto en animales positivos a la prueba de la tuberculina como en los negativos (Whelan et al., 2011). No se sabe si la independencia de las respuestas es debida a una sensibilidad más alta del ensayo de IFN- γ o a una subpoblación de células T específicas presente solamente en sangre. Esta última explicación sería interesante, ya que se ha demostrado en un modelo murino de TB que las subpoblaciones de células T implicadas en la HR difieren macadamamente de las implicadas en la protección (Orme y Collins, 1984; Pais et al., 1998). Por lo tanto, los mecanismos implicados en las 2 respuestas siguen siendo un campo interesante para futuras investigaciones.

Las respuestas IMC son consideradas necesarias para la protección contra la TBb, particularmente la producción de IFN- γ post-vacunación, a diferencia de los anticuerpos (Ritacco et al., 1991; Dlugovitzky et al., 2000; Boussiotis et al., 2000; Buddle et al., 2005c). Se ha reportado que la inducción de anticuerpos, al vacunar becerras, conduce a la diseminación extra-torácica de la TB. Los anticuerpos contribuirían a la opsonización de *M. bovis*, promoviendo la fagocitosis y el subsecuente desplazamiento de las células infectadas por los vasos linfáticos, conduciendo al desarrollo de granulomas en ganglios linfáticos fuera de la cavidad torácica (Wedlock et al., 2000). En bovinos, se ha demostrado que la vacunación con BCG no induce la síntesis de anticuerpos (Buddle et al., 1995b, 2003b, Wedlock et al., 2000, 2002, 2005a,b). Un estudio en el cual evaluaron la protección

inducida en becerras vacunadas con BCG y/o un EPFC de *M. bovis* demostró que la BCG sola no inducía la síntesis de anticuerpos, mientras que el EPFC solo o en combinación con la BCG indujo respuestas similares y fuertes de anticuerpos (Wedlock et al., 2005b). En el presente trabajo, la vacunación de las becerras con BCG no indujo una respuesta de anticuerpos hacia antígenos micobacterianos, al igual que lo reportado.

Se ha demostrado que la prueba de la tuberculina induce una respuesta humoral en ganado infectado con *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2004; Thom et al., 2004; Waters et al., 2006). Los mecanismos precisos por los cuales ocurre esta respuesta no se han determinado (Villarreal-Ramos et al., 2006), sin embargo, es probable que las células B periféricas son estimuladas por las células T y producen anticuerpos hacia las proteínas de la tuberculina (Rennie et al., 2010). La primera demostración del incremento de los niveles de anticuerpos (anti-MPB70) post-tuberculina en animales infectados con *M. bovis* se reportó por Harboe et al. (1990), seguido de Lightbody et al. (1998, 2000). Lyashchenko et al. (2004) reportaron que en animales infectados, la prueba de la tuberculina incrementaba fuertemente los niveles de IgG, IgG1 e IgG2, particularmente hacia MPB83 y MPB70, a diferencia de en ganado vacunado con BCG y desafiados con *M. bovis*, los cuales eran parcialmente protegidos por la vacuna. Palmer et al. (2006) observaron que la prueba de la tuberculina incrementaba los niveles de anticuerpos solamente en animales infectados y no en animales controles. Rennie et al. (2010) compararon la respuesta post-tuberculina en animales infectados con *M. bovis* y sensibilizados con *M. bovis* muertas y observaron un incremento drástico de los niveles de anticuerpos en ambos grupos. En el presente trabajo, los niveles de anticuerpos hacia *M. avium* y particularmente hacia *M. bovis* se incrementaron en ambos grupos, demostrando la sensibilización de los 2 grupos hacia ambos antígenos. Además, la vacunación no afectó la amplitud de la respuesta de anticuerpos, ya que no se encontró diferencia significativa entre los grupos post-PCCT.

La PCR representa una técnica molecular importante para el diagnóstico de la TBb por su sensibilidad, rapidez y su bajo precio y riesgo (De la Rúa-Domenech et al., 2006; Bermúdez et al., 2010). Esta prueba permite identificar *M. bovis* en cualquier muestra biológica bovina, sin necesidad de un cultivo previo (Cousins et al., 1992; Liébana et al., 1995). En los últimos años, las pruebas de PCR han mejorado y permiten obtener resultados en un día, a diferencia del cultivo bacteriológico que requiere de 2-8 semanas

para la obtención de un crecimiento y de 2-3 semanas para la identificación de las bacterias. Sin embargo, las pruebas de PCR carecen todavía de la sensibilidad proporcionada por los métodos de cultivos y en algunas situaciones, son susceptibles de dar resultados falsos positivos o negativos (Collins, 2011). Por lo tanto, la PCR no suele sustituir el cultivo, sino que tiene la ventaja de proporcionar resultados preliminares rápidamente y sería útil en los programas de control de la TBb para la detección del patógeno en los hatos.

La detección por PCR de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas se ha logrado mediante varios genes, entre otros MPB70 y MPB64 (Gormley et al., 1999) y la secuencia de inserción IS6110 (Broccolo et al., 2003). En el presente estudio, se utilizaron cebadores que amplifican una región del gen MPB70, ya que es altamente específico de los miembros del complejo *M. tuberculosis* y está presente como copia simple en sus genomas (Cousins et al., 1992; Young et al., 2005). No se observaron muestras positivas en la reacción de PCR simple, sin embargo, la PCR anidada generó resultados positivos. De manera sorprendente, 9/10 animales obtuvieron resultados positivos al menos una vez durante el estudio y muchos fueron positivos de manera intermitente. Además, se observó una frecuencia de muestras positivas superior cuando las becerras se trasladaron cerca de animales adultos tuberculosos segregados (días 60 y 90), sugiriendo diferentes grados de contaminación del medio ambiente por *M. bovis*, es decir la presencia inadecuada de las bacterias en el ambiente inanimado (Hota, 2004).

Durante todo el estudio, no se detectaron respuestas inmunes específicas hacia *M. bovis*, ya que ningún animal fue positivo en las pruebas de tuberculina, IFN- γ o ELISA. Asimismo, es poco probable que las becerras estén en etapas avanzadas de la enfermedad, excretando la micobacteria, ya que tenían alrededor de 1 mes de edad al comienzo del experimento. Consecuentemente, los resultados de PCR reflejarían el estado de contaminación del hato, con una alta circulación de la bacteria y/o la proximidad de las becerras con animales infectados. No se sabe si las micobacterias encontradas en las secreciones nasales eran vivas o muertas, sin embargo, es conocido que las micobacterias patógenas pueden sobrevivir durante meses fuera del hospedero y que son altamente resistentes al medio ambiente (Briscoe, 1912; Maddock, 1933; Miterlich y Marth, 1984; Lind et al., 1986), por lo tanto, existen grandes posibilidades de su viabilidad.

En un estudio en el cual desarrollaron una PCR anidada para la detección directa de micobacterias patógenas en muestras bovinas, no se encontró correlación entre la prueba de la tuberculina y los resultados de cultivo y PCR. Los autores destacaron que los resultados de la PCR anidada permitieron estimar la prevalencia e incidencia del patógeno y evaluar las implicaciones potenciales de infección humana (Mishra et al., 2005). Otro estudio comparó los resultados de la prueba de la tuberculina con los de PCR, en muestras de exudados nasales de zonas de altas y bajas prevalencias. Se observó un mayor número de muestras positivas en la zona de alta prevalencia (57 %), comparándola con la zona de baja prevalencia (20 %). Sin embargo, en la zona de alta prevalencia, 19 % de los animales fueron reactivos a la prueba de la tuberculina y 57 % fueron positivos a la prueba de PCR, mientras que en la zona de baja prevalencia, ningún animal resultó positivo a la prueba de la tuberculina y 20 % de los animales fueron positivos a la PCR (Morales et al., 2008), similar a lo encontrado en el presente estudio. Por lo tanto, existe una potencial infección o “contaminación” de los animales por *M. bovis*, sin inducción de la enfermedad y la posibilidad de desarrollar una respuesta positiva en las pruebas diagnósticas futuras.

La TBb se transmite principalmente vía respiratoria, sin embargo, no se sabe si la eliminación de *M. bovis* por secreción nasal o heces podría contaminar el ambiente y facilitar la transmisión tanto entre bovinos como entre bovinos y humanos u otras especies. Pocos estudios han considerado la diseminación y persistencia de *M. bovis* en el ambiente. Tanner y Michel (1999), utilizando métodos de cultivo tradicionales, reportaron la sobrevivencia de *M. bovis* inoculados en suelo y heces hasta 6 semanas. No obstante, la necesidad de incubaciones prolongadas y la descontaminación previa podrían afectar a las micobacterias que sobrevivieron durante largos periodos en el suelo. Otro estudio realizado por Young et al. (2005) demostró la sobrevivencia de *M. bovis* tanto en condiciones de campo como en suelos microsomos controlados por más de 15 meses, usando la prueba de PCR, evitando las desventajas de los métodos de cultivos mencionadas anteriormente.

Más estudios sobre la evaluación del ambiente como reservorio potencial de *M. bovis* son necesarios para la comprensión de su transmisión. La significancia epidemiológica de la presencia de *M. bovis* en el ambiente de los hatos es especulativa en la actualidad. Sin embargo, aparte de ser potencialmente infeccioso para el ganado por ingestión o más probablemente por la creación de aerosoles durante la olfacción de los animales, existe la

posibilidad de que la presencia de *M. bovis* en el ambiente comprometa los programas de control de la TBb y provoque la persistencia de la TBb. La PCR realizada en exudado nasal tiene como ventajas de ser simple y rápida, además, la recolección de las muestras es sencilla y utilizarla en paralelo con la prueba oficial de la tuberculina en los programas de control de la TBb permitiría determinar el estado de contaminación del hato.

En ganado infectado experimentalmente con *M. bovis*, se han observado cambios en las 3 subpoblaciones de células T ($\gamma\delta$ WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺) en circulación, demostrando su implicación en la respuesta inmune anti-micobacteriana bovina. La respuesta incluye tres fases. La primera fase implica una disminución a los 4 días post-infección, seguido de un incremento de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ hasta la segunda semana, sugiriendo la migración de las células de la circulación periférica al sitio inicial de infección y posteriormente una expansión clonal. En la segunda fase, la proporción CD4/CD8 incrementa alrededor de la tercera semana. En la última fase (semana 13), la proporción CD4/CD8 disminuye, con porcentajes inferiores a los de pre-infección. Estos últimos cambios sugieren la implicación de las células T CD4⁺ y subsecuentemente de las células T CD8⁺ (Pollock et al., 1996).

Existen pocos datos sobre los cambios de las células T circulantes después de la vacunación de bovinos con BCG. Buza et al. (2009) observaron 3 fases, similar a lo observado en animales infectados, después de vacunar animales de 6-18 meses de edad con BCG Danesa (8×10^6 UFC). La fase inicial ocurrió en las 2 primeras semanas post-vacunación, implicando un incremento de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺. La segunda fase mostró un incremento de las células T CD4⁺ entre las semanas 4 y 6, mientras que en la tercera fase, se observó un incremento de las células T CD8⁺ entre las semanas 8 y 10. En otro estudio, en el cual evaluaron diversos parámetros inmunológicos de bovinos neonatos después de la vacunación con BCG Pasteur (1×10^7 UFC), se demostró que los bovinos desarrollaron una respuesta inmune de tipo Th1 (proliferación celular, HR, producción de IFN- γ , TNF- α y óxido nítrico). Sin embargo, no se encontró diferencia entre las subpoblaciones de células T periférica de animales vacunados y controles, (Nonnecke et al., 2005), similar a lo encontrado en el estudio de Rizzi et al. (2012), en el cual vacunaron animales de 3-4 meses de edad con BCG Pasteur (1×10^6 UFC). En el presente estudio, no se observaron cambios en las subpoblaciones de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y CD4⁺, mientras que se encontró un incremento significativo entre las semanas 2 y 8 en células T CD8⁺.

Las variaciones entre estudios podrían ser debidas a las diferentes cepas y dosis utilizadas. La BCG se ha mantenido por un proceso de pase serial durante 40 años antes de tener métodos de almacenamiento estables y esto culminó en una familia de aproximadamente 13 cepas hijas, conocidas hoy como BCG (Aguirre-Blanco et al., 2007). Se ha demostrado que estas cepas difieren genéticamente (Behr y Small, 1999; Behr et al., 1999; Bedwell et al., 2001; Mostowy et al., 2003) y fenotípicamente (Miura et al., 1983; Abou-Zeid et al., 1986; Li et al., 1993; Gobin et al., 1999), incluyendo en la inducción de respuestas inmunes y protección (Grange y Gibson, 1986; Lagranderie et al., 1996). Se han observado diferencias en las respuestas de las células T (producción de IFN- γ y activación celular) en humanos vacunados con diferentes cepas y/o dosis de BCG (Aguirre-Blanco et al., 2007). Curiosamente, se ha sugerido que existe una relación inversa entre el número de pases antes de la criopreservación del lote semilla (atenuación de la virulencia) y la fuerza de la respuesta inmune inducida por la cepa (Gobin et al., 1999; Aguirre-Blanco et al., 2007). Por lo tanto, el número de pases realizados en cada cepa de BCG y las diferentes dosis utilizadas podrían explicar parcialmente las diferencias encontradas entre cada estudio, afectando tanto las respuestas inmunes inducidas *in vitro* como *in vivo*.

Se ha demostrado que en individuos vacunados con BCG, la bacteria intacta (viva y muerta) o proteínas secretadas (PPD y EPFC) inducen niveles muy bajos de proliferación de las células T $\gamma\delta$ *in vitro*, a diferencia de los extractos sonicados (Esin et al., 1996), indicando que los antígenos responsables de la proliferación son principalmente asociados al cuerpo bacteriano. Batoni et al. (2000) investigaron la proliferación de las subpoblaciones de células T de individuos vacunados con BCG en respuesta a diferentes fracciones de BCG y observaron diferencias dependiendo de las preparaciones utilizadas. El PPD y los EPFC indujeron una proliferación predominante de las células T CD4⁺, mientras que las preparaciones de antígenos citosólicos, liberados después de la destrucción de la bacteria, provocaron una fuerte proliferación de las células T $\gamma\delta$. En bovinos infectados con *M. bovis*, se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ estimuladas con PPD no proliferan (Maue et al., 2005). Asimismo, un estudio realizado en bovinos vacunados con BCG demostró que más células T CD4⁺ proliferaban en respuesta al PPD, comparándolas con las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y CD8⁺, mientras que un número mayor de células T $\gamma\delta$ WC1⁺ proliferaron en respuesta al sonicado de la bacteria en comparación con

las células T CD8⁺, reflejando diferencias en el reconocimiento antigénico de las distintas subpoblaciones de células T (Waters et al., 2003a). Por lo tanto, el tipo de vacuna utilizada en el presente estudio (bacterias vivas) podría tener un papel en la ausencia de proliferación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y CD4⁺ y la proliferación de las células T CD8⁺.

La presentación antigénica de bacterias intracelulares se realiza a través del CMH-I, conduciendo a la activación de las células T CD8⁺ (Liébana et al., 1999). Por lo tanto, el incremento de las células T CD8⁺ observado podría indicar que la BCG se multiplicó dentro de los fagocitos, procurando una fuente continua de antígenos secretados e induciendo la vía del CMH-I, además de la activación y proliferación de esas células. Esin et al. (1996) observaron una proliferación de las células T CD8⁺ humanas preferencialmente hacia micobacterias vivas *in vitro*, en comparación con micobacterias muertas, apoyando la activación celular vía el CMH-I. En animales infectados con *M. bovis*, la proliferación de las células T CD8⁺ y su producción de IFN- γ eran superiores con *M. bovis* viva, en comparación con antígenos solubles, posiblemente debido a la participación preferencial del CMH-I, mientras que un incremento de la proliferación de las células T CD4⁺ era mayor con antígenos solubles, destacando la intervención del CHM-II. Asimismo, experimentos de inhibición metabólica con Brefeldina A y Citocalasina D sugirieron que la vía del CMH-I era requerida para la activación de las células T CD8⁺ bovinas (Liébana et al., 1999). En el presente estudio, la vacuna BCG indujo la expansión clonal de las células T CD8⁺ solamente, probablemente debido al uso de bacterias vivas.

El incremento de las células T CD8⁺ post-vacunación demuestra una respuesta inmune dirigida hacia el tipo Th1. En TB, la función principal de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y CD4⁺ es la secreción de citocinas (IFN- γ e IL-2), que contribuyen a la estimulación de la respuesta Th1 y la inhibición de la respuesta Th2 (Orme et al., 1993; Smyth et al., 2001), mientras que la lisis celular representa el papel predominante de las células T CD8⁺. Se ha demostrado que las células T CD8⁺ pueden destruir macrófagos humanos (Lalvani et al., 1998) y murinos (Skinner et al., 1997) infectados con *M. tuberculosis*. En bovinos, la vacunación con BCG o la infección con *M. bovis* induce respuestas en células T CD8⁺, tales como la producción de IFN- γ (Liébana et al., 1999; Hope et al., 2000), la liberación de *M. bovis* metabólicamente activa de macrófagos (Liébana et al., 2000) y la reducción de micobacterias presentes en tejidos infectados (Skinner et al., 2003). Por lo tanto, existen

respuestas citotóxicas durante la TBb y se ha sugerido que la re-fagocitosis y la destrucción de la bacteria por macrófagos recién activados, con mejor potencial bactericida, podrían tener un papel en la eliminación de las bacterias liberadas *in vivo* (Liébana et al., 2000).

La evaluación de la cinética de las células T post-vacunación permite mejorar el conocimiento de las relaciones que existen entre la micobacteria y el sistema inmune del hospedero, crucial para el desarrollo de nuevas vacunas y herramientas de diagnóstico. Dado que no existen dudas sobre el papel protector de la respuesta Th1 en el control de la TBb, es importante que cualquier vacuna sea capaz de estimularla (citocinas apropiadas y citotoxicidad). La expansión clonal de las células T CD8⁺ representa un buen indicador del desarrollo de una respuesta Th1 y el tipo de vacuna utilizada (bacterias intracelulares obligadas vivas) podría ser la razón por la cual solamente las células T CD8⁺ proliferaron, demostrando su papel en la inmunidad inducida por la BCG.

La molécula CD25 es implicada en la activación de las células T y asociada a funciones de regulación (Cantrell y Smith, 1983). En células T $\alpha\beta$, el encuentro con el antígeno y señales de co-estimulación apropiadas induce la síntesis de IL-2 y un incremento de la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (CD25). La unión subsecuente de IL-2 a su receptor desencadena la progresión del ciclo celular, resultando en la proliferación y diferenciación de las células T (Janeway, 2005). De manera diferente, las células T $\gamma\delta$ tanto humanas como bovinas producen cantidades pequeñas de IL-2 tras la activación; además de la estimulación antigénica, su respuesta proliferativa es dependiente de la secreción de IL-2 por las células T CD4⁺ (Elloso et al., 1996; Smyth et al., 2001; Welsh et al., 2002). Por eso, se ha sugerido que IL-2 representa una señal secundaria para la proliferación de las células T $\gamma\delta$, después del reconocimiento antigénico (Plattner y Hostetter, 2011).

En el presente estudio, se evaluó la expresión CD25 *in vitro* tanto de las células T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$ de animales vacunados con BCG y controles. Distintos niveles de activación celular se observaron. En sangre no estimulada, no se encontró diferencia en la expresión de CD25 de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y CD4⁺ entre ambos grupos. Los porcentajes, relativamente altos en células T $\gamma\delta$ WC1⁺ giran alrededor de 40-90 % y de 10-15 % en células T CD4⁺. Se ha reportado la expresión de CD25 en células no estimuladas, tanto de animales infectados con *M. bovis* como controles, con un porcentaje alrededor de 20 % en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), de 26-28 % en células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y

de 10-13 % en células T CD4⁺ (Liébana et al., 1999; Smyth et al. 2001). Además, se ha reportado que las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ expresan CD25 constitutivamente (Collins et al., 1996), consecuentemente, la disponibilidad de CD25 implica una sensibilidad particular a IL-2, además, se ha sugerido que estas células poseen un umbral bajo en cuanto a la inducción de la proliferación (Kirkham et al., 1997). Por lo tanto, la alta activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ en sangre no estimulada podría ser debido a una estimulación no específica de IL-2 secretada por células T CD4⁺ respondiendo a un antígeno, ya que el trabajo se realizó en condiciones de campo, con una estimulación continua del sistema inmune, a diferencia de los otros estudios efectuados en condiciones controladas. En cuanto a las células T CD8⁺, se observaron porcentajes de activación celular de 2-12 %, similar a lo reportado (0-10 %) por Smyth et al. (2001), con un incremento significativo en el grupo vacunado al día 220, probablemente debido a la segunda PCCT. De manera diferente, en animales infectados con *M. bovis*, la expresión de CD25 incrementó alrededor del día 30 post-infección en PBMC (Pollock et al., 1996), al día 14 en células T CD8⁺, al día 21 en células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y al día 30 en células T CD4⁺ (Kennedy et al., 2002). Por lo tanto, en el presente estudio, la vacuna no incrementó los niveles de activación de las células T en circulación, al igual de lo observado por Nonnecke et al. (2005).

En sangre estimulada con antígenos micobacterianos, se han reportado incrementos en la activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺, CD4⁺ y CD8⁺, tanto en animales infectados como vacunados con BCG (Smyth et al., 2001; Waters et al., 2003a,b; Buddle et al., 2003b; Maue et al., 2005). En el presente estudio, la estimulación de la sangre con antígenos de *M. bovis* provocó una activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ alrededor del 90 % durante todo el estudio en ambos grupos de animales. Se ha observado ese tipo de activación celular en ganado tuberculoso (Welsh et al., 2002), sin embargo, con un nivel más bajo en animales controles (Smyth et al., 2001). Esta potente activación en animales controles podría ser debida a una estimulación inespecífica vía IL-2 secretada por células T CD4⁺ en el cultivo y/o por la estimulación antigénica. Una investigación del papel de IL-2 en la activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinas reveló que IL-2 sola no induce la proliferación celular, sin embargo, induce la expresión de CD25, similar a lo observado con un extracto sonicado de *M. bovis* o ESAT-6. Además, se observó que la expresión de CD25 incrementó con el extracto sonicado e IL-2 en comparación a los componentes solos (Welsh et al., 2002). Por

lo tanto, IL-2 induce de manera inespecífica la expresión de CD25 en células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y su evaluación en los cultivos representa un análisis importante a realizar en el futuro. Por otro lado, el EPFC, al igual que el PPD, está constituido por una mezcla compleja de antígenos y podría ser responsable de una activación inespecífica de las células en ambos grupos. De la misma manera, la alta proporción de células T $\gamma\delta$ WC1⁺/CD25⁺ observada en sangre no estimulada de los animales controles sugiere una alta frecuencia de precursores capaces de responder a antígenos de *M. bovis*. Finalmente, los antígenos compartidos entre *M. bovis* y las micobacterias ambientales podrían provocar reacciones cruzadas, resultando en una alta activación de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ después del estímulo. La vacunación incrementó significativamente la expresión de CD25 en células T CD4⁺ y CD8⁺ en los días 21 y 30, indicando que ambas subpoblaciones se activan al mismo tiempo *in vitro*, con un nivel más alto en células T CD4⁺. Se ha reportado que las células T CD4⁺ y CD8⁺ se activan al mismo tiempo, antes de las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ y que las células T CD8⁺ representan un porcentaje pequeño de células activadas (Smyth et al., 2001). Un porcentaje bajo de células T CD8⁺/CD25⁺ se observó, similar a lo encontrado en sangre no estimulada. Sin embargo, existe una diferencia entre animales vacunados y no vacunados, probablemente reflejando el incremento en número de esas células en estos días.

La evaluación intracelular de citocinas por citometría de flujo (CFI) en PBMC separadas o sangre completa representa un método extramadamente sensible (Sun et al., 1998; Weynants et al., 1998; Hughes et al., 2005). Estos ensayos *in vitro*, en los cuales se inducen citocinas en respuesta a antígenos, son indicadores útiles de las respuestas inmunes. Varios estudios han comparado la CFI con otros métodos de detección de las respuestas de las células T, incluyendo ensayos de proliferación, de citotoxicidad, de CMH y ELISPOT (Karlsson et al., 2003; Pahar et al., 2003; Maino y Maecker, 2004; Desombere et al., 2004) y se concluyó que existe una buena correlación entre las técnicas. Una gran ventaja de la CFI es que además de permitir la enumeración de células respondientes, confiere información sobre el fenotipo celular. Asimismo, la CFI ofrece la posibilidad de medir varias citocinas simultáneamente, incrementando el potencial diagnóstico. Mientras que la mayoría de los ensayos de CFI utilizan PBMC separadas, Sun et al. (1998) desarrollaron un ensayo en sangre completa con resultados comparables, aunque con un incremento de la frecuencia de respuesta de las células T en sangre completa. Otras ventajas del uso de

sangre completa son que reduce los costos, el tiempo de preparación de las células, elimina la posibilidad de activación celular por las técnicas de separación y confiere un ambiente más fisiológico, parecido al ambiente *in vivo* (Sun et al., 1998; Sopp et al., 2006).

En el presente estudio, se evaluó la expresión de IFN- γ , IL-10 e IL-4 en linfocitos por CFI en sangre completa no estimulada y estimulada con un EPFC de *M. bovis* de animales vacunados con BCG y no vacunados. No se encontró diferencia entre los porcentajes de IFN- γ en sangre no estimulada o estimulada de ambos grupos, indicando que la vacuna no indujo la expresión de IFN- γ en linfocitos mediante la CFI. En un estudio, se detectaron células T CD4⁺/IFN- γ ⁺ por CFI en sangre completa estimulada con PPD de animales infectados con *M. bovis*, a diferencia de en animales vacunados con BCG, los cuales mostraron respuestas muy bajas o indetectables (0.19-0.3 %), similar a lo encontrado. Los animales vacunados mostraban una fuerte producción de IFN- γ secretada y pruebas de tuberculina positivas (Sopp et al., 2006), indicando que la CFI no correlacionó con las otras pruebas de IMC. En otros estudios realizados en animales vacunados con BCG y desafiados con *M. bovis*, el número de células T CD4⁺/IFN- γ ⁺ correlacionó positivamente con la gravedad de la enfermedad (Hope et al., 2005a, 2011), sugiriendo que ese parámetro se podría utilizar como marcador de protección o de enfermedad.

El paradigma en el cual las células Th1 son pro-inflamatorias y las células Th2 anti-inflamatorias sufrió un realineamiento en los últimos años; ya se conoce que dependiendo del agente infeccioso, ambos tipos celulares (Th1 y Th2) pueden mediar tanto la inflamación y el daño tisular como la destrucción de los patógenos. En contraste, las funciones anti-inflamatorias pertenecen a poblaciones celulares regulatorias e IL-10 es particularmente esencial en la regulación de la mayoría de las respuestas inmunes. La fuerza de su respuesta reflejaría la robustez de la respuesta inflamatoria precedente. Su producción representa un beneficio tanto para el hospedero (limitando la patología) como para el patógeno (persistencia y transmisión). Sin embargo, si su fuente y periodo de secreción son inapropiados, es decir producida demasiado temprano durante una infección virulenta o demasiado tarde durante una infección avirulenta, una infección incontenible o un daño tisular severo puede ocurrir (Couper et al., 2008). Se ha reportado que IL-10 (secretada) es producida en respuesta a antígenos micobacterianos de animales infectados (Denis et al., 2007), a diferencia de en animales vacunados con BCG (Hope et al., 2005a).

La citocina IL-4 no es fácilmente detectada en infecciones micobacterianas (Lin et al., 1996) y la mayoría de los investigadores no logran detectarla, ya que su secreción es muy sutil en comparación con la del IFN- γ (Rook et al., 2004). Se ha reportado que en animales infectados con *M. bovis*, su expresión es transitoria, ocurre después de la del IFN- γ y que se pueden percibir incrementos individuales en diferentes tiempos en algunos animales (Dean et al., 2005; Welsh et al., 2005). Rhodes et al. (2000a) pudieron detectarla (secretada) en un gran número de bovinos infectados con *M. bovis*, con una cinética diferente a la del IFN- γ ; una reducción en la actividad de IFN- γ era precedida por un incremento de actividad de IL-4 y su respuesta no era sostenida como la del IFN- γ , sugiriendo una respuesta anti-inflamatoria hacia el IFN- γ . En animales vacunados con BCG, se ha reportado que además de una respuesta Th1, IL-4 (ARNm) es inducida (Buddle et al., 2003b).

En el presente estudio, se observaron incrementos de IL-10 e IL-4 en sangre estimulada y no estimulada de animales controles, probablemente debido a un estímulo en el hato y/o a las PCCT. Por lo tanto, la vacunación no incrementó la expresión de IFN- γ , IL-10 e IL-4 tanto en células circulantes como en células estimuladas, similar al estudio de Rizzi et al. (2012), en el cual la vacunación de bovinos con BCG no incrementó la expresión de las 3 citocinas (ARNm). En otras investigaciones, la vacunación con BCG provocó incrementos en la expresión de IFN- γ e IL-4 (ARNm) después del estímulo y ningún cambio para IL-10 (Wedlock et al., 2002, 2005a,b; Buddle et al., 2003b; Endsley et al., 2007). Las diferencias en el diseño experimental de cada estudio son probablemente responsables de los distintos resultados obtenidos. Además, existen pocos estudios que evalúan citocinas por CFI en bovinos vacunados con BCG, lo que hace difícil la comparación. Consecuentemente, en el presente trabajo, la vacunación no indujo la expresión de las 3 citocinas bajo las condiciones establecidas y una evaluación más profunda por CFI de la expresión de citocinas post-PCCT es necesaria para aclarar los resultados obtenidos.

Se ha descrito que en ganado infectado, la PCCT incrementa la producción de IL-10 (secretada) en sangre estimulada con PPD bovino (Denis et al., 2007). En otro estudio realizado en animales infectados, no se observaron cambios post-PCCT en la producción de IFN- γ e IL-4 (secretadas) de cultivos estimulados con PPD bovino, mientras que IL-10 (secretada) incrementó a los 3-10 días, a diferencia de en animales controles. En el mismo estudio, la evaluación por CFI de la expresión de IFN- γ en células T CD4⁺ estimuladas

demonstró un incremento a los 3 días post-PCCT, pero no se detectó IL-10 ni en células T, ni en células CD14⁺. Comentaron que las células adherentes podrían ser la fuente de IL-10 (secretada), ya que no se evaluaron por CFI (Coad et al., 2010). Thom et al. (2006) observaron que los niveles de IL-10 (secretada) e IL-4 (ARNm) incrementaron post-PCCT en cultivos estimulados de animales infectados, mientras que no se detectó IL-4 por ELISA y no se evaluó el ARNm de IL-10. Ng et al. (1995) encontraron en animales vacunados con BCG, un incremento de la expresión de IFN- γ , IL-10 e IL-4 (ARNm) en el lugar de inoculación de la tuberculina (biopsia), a pesar de resultados negativos a la prueba. Explican que las células expresando el ARNm podrían no estar implicadas directamente en la HR o que el reclutamiento de muchas células podría ser necesario para la inducción de una HR fuerte, mientras que pocas células podrían ser requeridas para la detección de ARNm. En animales controles, se observó una expresión baja de las citocinas post-tuberculina. Además, aunque los animales vacunados se distinguieron de los infectados mediante la tuberculina, la expresión de las citocinas fue similar en ambos grupos. Por lo tanto, existen variaciones entre estudios y pocos trabajos de CFI en animales vacunados con BCG. La estandarización de un método de evaluación ayudaría a comparar los resultados y determinar con más precisión cuales citocinas se expresan post-tuberculina.

La expresión de IFN- γ no incrementó durante todo el estudio en ambos grupos, tanto en sangre no estimulada como estimulada. En animales controles, la expresión de IL-10 incrementó al día 220 en sangre no estimulada y en los días 60 y 220 en sangre estimulada. El incremento al día 60 sugiere la sensibilización de los animales a micobacterias ambientales, ya que se ha demostrado que micobacterias como *M. avium*, *M. abscessus* y *M. goodnae* inducen la secreción de IL-10 en PBMC de individuos sanos (Jönsson et al., 2012). Por lo tanto, la estimulación de las células con el EPFC de *M. bovis* sería la causa del incremento de IL-10, ya que las micobacterias ambientales comparten antígenos con *M. bovis*. La segunda PCCT podría ser responsable del incremento del día 220. En cuanto a IL-4, se detectó una expresión intermitente tanto en sangre no estimulada como estimulada de ambos grupos. Se observó un incremento al día 21 que no se puede atribuir a la vacuna, ya que ocurre en ambos grupos. Al día 90, se observa un incremento en sangre estimulada de ambos grupos, probablemente debido a la PCCT, sugiriendo la sensibilización de ambos grupos a antígenos micobacterianos. Al día 150, IL-4 sube significativamente en animales

controles, tanto en sangre estimulada como no estimulada, probablemente debido a la primera PCCT. En general, IL-4 incrementa más en animales controles y todos los incrementos significativos de IL-10 y IL-4 se encuentran en animales controles, sugiriendo una respuesta dirigida más hacia Th2 que Th1, a diferencia de en animales vacunados. Un estudio de infección de células dendríticas humanas con la micobacteria ambiental *M. smegmatis* demostró que la re-estimulación de las células con productos de la micobacteria incrementó los niveles de IL-10, aunque tenían la capacidad de producir IL-12. Se observó que esas células polarizaban las células T vírgenes hacia una respuesta mixta Th1/Th2, induciendo la producción de IFN- γ e IL-4. La exposición a micobacterias ambientales modularía la diferenciación de las células dendríticas y afectaría la respuesta adaptativa y la respuesta inmune hacia especies patogénicas (Martino et al., 2005). Por lo tanto, la sensibilización a micobacterias ambientales podría orientar la respuesta inmune hacia el tipo Th2, sin embargo, más estudios son necesarios para poder confirmar esa hipótesis.

Se ha reportado que IL-10 puede inhibir las respuestas de HR en ratones (Li et al., 1994; Schwarz et al., 1994), mientras que en ganado, su neutralización *in vitro* incrementa los niveles de IFN- γ (Denis et al., 2007). En el presente estudio, la relación entre IFN- γ e IL-10 no es tan clara, ya que las curvas se comportan de manera similar. Sin embargo, la presencia de IL-10 podría explicar parcialmente la falta de reacción de HR en animales vacunados. Por otro lado, no se ha demostrado que IL-4 se expresa con exclusión de IFN- γ en ganado (Brown et al., 1998; Estes y Brown, 2002) y se conoce que está implicada en la producción de anticuerpos. Por lo tanto, los incrementos de IL-4 post-PCCT (días 90 y 150) podrían relacionarse con los incrementos de anticuerpos observados (días 100 y 220).

En resumen, en condiciones naturales de campo, los animales neonatos son expuestos a una variedad de nuevos antígenos, resultando en un alto grado de estimulación del sistema inmune. Además, la influencia de las micobacterias ambientales sobre las respuestas inmunes, las pruebas diagnósticas y la protección inmunitaria es muy compleja, por lo cual es importante realizar más estudios en condiciones reales de campo.

IX. CONCLUSIONES

- 1- La vacunación de becerros neonatos con BCG cepa Phipps a una dosis de 1×10^6 UFC, en un hato de alta prevalencia de TBb, induce una respuesta de tipo Th1, 21-30 días post-vacunación, estimulando específicamente la actividad de los linfocitos T en sangre periférica (IFN- γ , CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD25⁺).
- 2- La vacunación de becerros neonatos con BCG cepa Phipps a una dosis de 1×10^6 UFC, en un hato de alta prevalencia de TBb, no induce una respuesta de tipo Th2 (anticuerpos, IL-4 e IL-10).
- 3- La PCCT no incrementa los niveles de IFN- γ *in vitro* hacia el PPD aviar, el PPD bovino, ESAT-6 y CFP-10, tanto en animales vacunados como no vacunados.
- 4- La vacuna BCG cepa Phipps (1×10^6 UFC) no interfiere en la PCCT de becerros neonatos y se podría utilizar en programas de control de la TBb.
- 5- Las respuestas IMC y HR son reguladas por 2 mecanismos diferentes.
- 6- La expresión de IFN- γ e IL-10 en linfocitos es constante, mientras que IL-4 se expresa de manera intermitente.
- 7- El uso de ESAT-6 y CFP-10 como antígenos diferenciales *in vitro* no es útil en condiciones de campo.
- 8- La PCR simple no detecta el gen MPB70 en muestras de exudado nasal de becerros.
- 9- Es necesario realizar la PCR anidada del gen MPB70 para incrementar la sensibilidad de la prueba.
- 10- Las muestras positivas de PCR anidada indicarían más el estado de contaminación del hato con *M. bovis* que animales infectados.
- 11- Las pruebas de PCR del gen MPB70 no son confiables para el diagnóstico de la TBb bajo condiciones de campo.
- 12- La presencia de micobacterias ambientales podría interferir tanto en la respuesta inmune post-vacunación como en las pruebas diagnósticas de la TBb.

X. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Cúmulo de diferenciación
CFI	Citometría de flujo intracelular
CFP-10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CR	Receptor del complemento
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil amonio
CTLA-4	Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico
DC-SIGN	Molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas
DO	Densidad óptica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPFC	Extracto proteínico de filtrado de cultivo
ESAT-6	Proteína antigénica secretada tempranamente-6
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HR	Hipersensibilidad retardada
IFN- γ	Interferón-gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Inmunidad mediada por células
IP-10	Proteína-10 inducida por el IFN- γ
IS6110	Secuencias de inserción 6110
LAM	Lipoarabinomanano
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MIP-1 α/β	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa/beta

MPB70	Proteína de membrana de <i>M. bovis</i> 70
MR	Receptor de manosa
NK	Asesinas naturales
NOD2	Dominio de oligomerización unido a nucleótidos - 2
Nramp-1	Proteína-1 del macrófago asociada a la resistencia natural
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBA	PBS-albumina fetal bovina-ázida de sodio
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Solución salina de fosfatos
PCCT	Prueba cervical comparativa de la tuberculina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PPD	Derivado proteico purificado
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PWM	Mitógeno Pokeweed
RD1	Región de diferencia 1
ROC	Característica operativa del receptor
TB	Tuberculosis
TBb	Tuberculosis bovina
TCR	Receptor de los linfocitos T
TE	Tris-ácido etilendiaminotetraacético
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta
Th	T cooperadora
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WC1	Workshop Cluster 1

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meng, O.L., Andersen, P., Pollock, J.M., 2003. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3719–3728.
- Abalos, P., Retamal, P., 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2004, 23, 583-594.
- Abou-Zeid, C., Smith, I., Grange, J., Steele, J., Rook, G., 1986. Subdivision of daughter strains of bacille Calmette-Guerin (BCG) according to secreted protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 132, 3047–3053.
- Acuto, O., Michel, F., 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 939-951.
- Aguirre-Blanco, A.M., Lukey, P.T., Cliff, J.M. Dockrell, H.M., 2007. Strain-dependent variation in *Mycobacterium bovis* BCG-induced human T-cell activation and gamma-interferon production *in vitro*. *Infect. Immun.* 75, 3197–3201.
- Ahn, C.H., McLarty, J.W., Ahn, S.S., Ahn, S.I., Hurst, G.A., 1982. Diagnostic criteria for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125, 388–391.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* 2, 675–680.
- Akira, S., 2003. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 38105–38108.
- Aleman, M., Beigier-Bompadre, M., Borghetti, C., de la Barrera, S., Abbate, E., Isturiz, M., Sasiain, M.C., 2001. Activation of peripheral blood neutrophils from patients with active advanced tuberculosis, *Clin. Immunol.* 100, 87-95.
- Ameni, G., Vordermeier, H.M., Aseffa, A., Young, D.B., Hewinson, R.G., 2010. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 1533–1538.
- Anon, 2004a. (Bovine Tuberculosis). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, fifth ed. Office International des Epizooties, Paris, Chapter 2.3.3.
- Anon, 2004b. Consolidated (English) version of Council Directive 64/432/ EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra-Community trade in bovine animals and swine. *Official Journal of the European Communities* P121, 29.07.1964, pp. 1977.
- Anon, 2004c. *Bovine Tuberculosis Eradication: Uniform Methods and Rules*, effective January 1, 2005. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Washington.
- Anon, 2005b. *National Bovine Tuberculosis Pest Management Strategy – National Operational Plan: 1 July 2005 to 30 June 2013 (version 1.0)*. Animal Health Board, Wellington.

- Appelberg, R., 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* 15, 87-92.
- Apt, A., Kondratieva, T.K., 2008. Tuberculosis: Pathogenesis, immune response, and host genetics. *Mol. Biol. (Mosk).* 42, 784–793.
- Aranday-Cortes, E., Hogarth, P., Kaveh, D., Whelan, A., Villareal-Ramos, B., Lalvani, A., Vordermeier, H.M., 2012. Transcriptional profiling of disease-induced host responses in bovine tuberculosis and the identification of potential diagnostic biomarkers. *PLoS One* 7, e30626.
- Arend, S.M., de Haas, P., Leyten, E., Rosenkrands, I., Rigouts, L., Andersen, P., Mijs, W., van Dissel, J.T., van Soolingen, D., 2005. ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J. Infect. Dis.* 191, 1301–1310.
- Aronson, N.E., Santosham, M., Comstock, G.W., Howard, R.S., Moulton, L.H., Rhoades, E.R., Harrison, L.H., 2004. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: a 60-year follow-up study. *JAMA* 291, 2086–2091.
- Ashford, D.A., Whitney, E., Raghunathan, P., Cosivi, O., 2001. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 325–337.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 924–937.
- Bafica, A., Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A., Sher, A., 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 202, 1715–1724.
- Baldwin, C.L., Sathiyaseelan, T., Naiman, B.M., White, A.M., Brown, R., Blumerman, S., Rogers, A., Black, S.J., 2002. Activation of bovine peripheral blood gd T cells for cell division and IFN- γ production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 251–259.
- Batoni G., Esin, S., Pardini, M., Bottai, D., Senesi, S., Wigzell, H., Campa, M., 2000. Identification of distinct lymphocyte subsets responding to subcellular fractions of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG). *Clin. Exp. Immunol.* 119, 270-279.
- Bedwell, J., Kairo, S.K., Behr, M.A., Bygraves, J.A., 2001. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 19, 2146–2151.
- Behr, M. A., Small, P.M., 1999. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 17, 915–922.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284, 1520-1523.
- Behr, M.A., Schroeder, B.G., Brinkman, J.N., Slayden, R.A., Barry, 3rd, C.E., 2000. A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J. Bacteriol.* 182, 3394–3399.
- Behr, M.A., 2002. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet. Infect. Dis.* 2, 86–92.

Berggren, S.A., 1977. Incidence of tuberculosis in BCG vaccinated and control cattle in relation to age distribution in Malawi. *Br. Vet. J.* 133:490–494.

Berggren, S.A., 1981. Field experiment with BCG vaccine in Malawi. *Br. Vet. J.* 137, 88-96.

Bermúdez, H.R., Renteria, E.T., Medina, B.G., Hori-Oshima, S., De La Mora, V.A.V., López, V.G., Yu, W.L., Pio, G.R., Herrera, J.C., Pujol, C., Nielsen, K., 2010. Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Anim. Vet. Adv.* 9, 2082-2084.

Berrington, W.R., Hawn, TR., 2007. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol. Rev.* 219, 167-186.

Besra, G.S., Chatterjee, D., 1994. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom, B., (ed.). *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington, DC: ASM Press, pp. 285–306.

Black, G.F., Weir, R.E., Floyd, S., Bliss, L., Warndorff, D.K., Crampin, A.C., Ngwira, B., Sichali, L., Nazareth, B., Blackwell, J.M., Branson, K., Chaguluka, S.D., Donovan, L., Jarman, E., King, E., Fine, P.E., Dockrell, H.M., 2002. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. *Lancet.* 359, 1393–1401.

Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T., Miller, E.N., 2000. Understanding the multiple functions of Nrap1. *Microbes Infect.* 2, 317–321.

Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., Bottger, E. C., 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1751–1759.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., Paik, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1994. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55, 227–233.

Bono, M.R., Simon, V., 1998. Citometría de flujo: Principios básicos y aplicaciones. En fundamentos de inmunología. Palomo, I., Feirreria, A., Sepúlveda, C., Roseblatt, M., Vergara, U. Editorial Universidad de Talca, pp. 647-665.

Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J.M., Goldfeld, A.E., 2000. IL-10 producing T-cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.* 105, 1317–1325.

Brennan, P.J., 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* 11, 420-430.

Brennan, P.J., Nikaido, H., 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29–63.

Brennan, P.J., 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83, 91–97.

Brennan, P.J., Crick, D.C., 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 475-88.

Brill, K.J., Li, Q., Larkin, R., Canaday, D.H., Kaplan, D.R., Boom, W.H., Silver, R.F., 2001. Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanisms. *Infect. Immun.* 69, 1755-1765.

Briscoe, C.F., 1912. Fate of tubercule bacilli outside de animal body. Report Number 161, Illinois Agricultural Experimental Station Bulletin, Illinois, USA.

Broccolo, F., Scarpellini, P., Locatelli, G., Zingale, A., Brambilla, A.M., Cichero, P., Sechi, L.A., Lazzarin, A., Lusso, P., Malnati, M.S., 2003. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4565–4572.

Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99, 3684–3689.

Brown, A.E., Holzer, T.J., Andersen, B.R., 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 156, 985-989.

Brown, W.C., Rice-Ficht, A.C., Estes, D.M., 1998. Bovine type 1 and 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63, 45-55.

Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Pfeffer, A., de Lisle, G.W., Corner, L.A., 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *Vet. J.* 42, 167–172.

Buddle, B.M., Keen, D., Thomson, A., Jowett, G., McCarthy, A.R., Heslop, J., de Lisle, G.W., Stanford, J.L., Aldwell, F.E., 1995a. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium uaccae*. *Res. Vet. Sci.*, 59, 10-16.

Buddle, B.M., de Lisle, G.W., Pfeffer, A., Aldwell, F.E., 1995b. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*, 13, 1123-1130.

Buddle, B.M., Parlane, N.A., Keen, D.L., Aldwell, F.E., Pollock, J.M., Lightbody, K., Andersen, P., 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated and *M. bovis* infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 1-5.

Buddle, B.M., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Andersen, P., de Lisle, G.W., 2001. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet. Microbiol.* 80, 37–46.

Buddle, B.M., Skinner, M.A., Wedlock, D.N., Collins, D.M., de Lisle, G.W., 2002a. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 177–185.

Buddle, B.M., Wards, B.J., Aldwell, F.E., Collins, D.M., de Lisle, G.W., 2002b. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20, 1126–1133.

Buddle, B.M., Pollock, J.M., Skinner, M.A., Wedlock, D.N., 2003a. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int.J. Parasitol.* 33, 555–566.

Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Parlane, N.A., Corner, L.A., De Lisle, G.W., Skinner, M.A., 2003b. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect. Immun.* 71, 6411–6419.

Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Wedlock, D.N., 2005a. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* 23, 3581–3589.

Buddle, B.M., Skinner, M.A., Wedlock, D.N., de Lisle, G.W., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2005b. Cattle as a model for development of vaccines against human tuberculosis. *Tuberculosis* 85, 19–24.

Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., Skinner, M.A., 2005c. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 45–51.

Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., 2006. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. *Vet. Microbiol.* 112, 191–200.

Buddle, B.M., Denis, M., Aldwell, F.E., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Wedlock, D.N., 2008. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes. *Tuberculosis (Edinb)* 88, 595–600.

Buddle, B.M., 2010. Tuberculosis vaccines for cattle: the way forward. *Expert. Rev. Vaccines* 9, 1121–1124.

Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 151, 14–22.

Bulut, Y., Michelsen, K.S., Hayrapetian, L., Naiki, Y., Spallek, R., Singh, M., Arditi, M., 2005. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J. Biol. Chem.* 280, 20961–20967.

Buza, J., Kiros, T., Zerihun, A., Abraham, I., Ameni, G., 2009. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood gamma-delta T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 251–255.

Cantrell, D.A., Smith, K.A., 1983. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J. Exp. Med.* 158, 1895–1911.

Cassataro, J., Velikovskiy, C., De la Barrera, S., Estein, S., Bruno, L., Bowden, R., Pasquevich, K., Fossati, C., Giambartolomei, G., 2005. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect. Immun.* 2005; 73, 6537–6546.

Cassidy, J.P., 1998. Studies on the pathogenesis of bovine tuberculosis. PhD Thesis. Faculty of Agriculture and Food Science, the Queen's University of Belfast.

Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Pollock, J.M., Evans, R.T., Forster, F., Neill, S.D., 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Pathol. 119, 27–44.

Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Pollock, J.M., Evans, R.T., Forster, F., Neill, S. D., 1999a. Lesion formation in cattle infected by exposure to calves inoculated with *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Pathol. 121, 321-327.

Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Neill, S.D., 1999b. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Vet. Rec. 144, 139-142.

Cassidy, J.P., 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet. Microbiol. 112, 151–161.

Castillo, J.L., Kawaguchi, F., Madariaga, B., Venegas, O., Lecannelier, E., Ocampo, S., Castillo, M., 1999. Aspectos que afectan el análisis de contenido de ADN por citometría de flujo. Rev. Med. Chile 127, 1385-1397.

Castillo, J.L., 2005. Citometría de flujo: Estudio de laboratorio de enfermedades oncohematológicas. En hematología: Fisiopatología y diagnóstico. Palomo, I., Pereira, J., Palma, J. Editorial Universidad de Talca, pp. 732-737.

Castillo-Rodal, A.I., Castañón, A.M., Hernández, P.R., Calva, J.J., Sada, D.E., López, V.Y., 2006. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. Infect. Immun. 74, 1718-1724.

CENAVECE. Secretaría de Salud. Dirección General Adjunta de Epidemiología. Plataforma Única de Información, módulo tuberculosis. México, 2007.

CENAVECE. Situación actual de la Tuberculosis en México-Avances y desafíos. México, 2011.

Chackerian A, Chen S, Brodie S, Mattson J, McClanahan T, Kastelein R, Bowman, E.P., 2006. Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. Infect. Immun. 74, 6092–6099.

Christensen, P., Stenvang, J. Godfrey, W., 2004. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. J Androl. 25, 255–264.

Clevers, H., MacHugh, N.D., Bensaïd, A., Dunlap, S., Baldwin, C.L., Kaushal, A., Iams, K., Howard, C.J., Morrison, W.I., 1990. Identification of a bovine surface antigen uniquely expressed on CD4-CD8- T-cell receptor $\gamma\delta$ T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 20, 809–817.

Coad, M., Hewinson, R.G., Clifford, D., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2007. Influence of skin testing and blood storage on interferon-g production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. Vet. Rec. 160, 660–662.

Coad, M., Clifford, D., Rhodes, S.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2010. 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. Vet. Res. 41, 14.

Collins, D.M., 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 151, 2-7.

Collins, R.A., Sopp, P., Gelder, K.I., Morrison, W.I., Howard, C.J., 1996. Bovine gd TcR1 T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. Scand. J. Immunol. 44, 444-452.

Collins, A.V., Brodie, D.W., Gilbert, R.J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, R., Stuart D.J., van der Merwe, P.A., Davis, S.J., 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. Immunity 17, 201-210.

Comstock, G.W., 1988. Identification of an effective vaccine against tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 138, 479-80.

Corner, L. A., 1994. Post-mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40, 53-63.

Corner, L.A., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol. 112, 303-312.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujicura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. infect. Dis., 4, 59-70.

Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. J. Immunol. 180, 5771-5777.

Cousins, D.V., Wilton S.D., Francis B.R., 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 27, 187-195.

Cousins, D.V., Wilton, S.D., Francis, B.R., Gow, B.L., 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30, 255-258

Cousins, D.V., Corner, L.A., Tolson, J.W., Jones, S.L., Wood, P.R. (Eds.), 1998. Eradication of bovine tuberculosis from Australia: Key management and technical aspects. CSL, Australia.

Cousins, D.V., 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 20, 71-85.

Crews, K. B., 1991. Post-mortem findings in bovine tuberculosis reactors. Surveillance 18, 15-16.

Crick, D.C., Mahapatra, S., Brennan, P.J., 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiol. 11, 107-118.

Cunningham, A.F., Spreadbury, C.L., 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog, J. Bacteriol. 180, 801-808.

David, V., Hanekom, W.A., Mansoor, N., Gamielidien, H., Gelderbloem, S.J., Hawkrigde, A., Hussey, G.D., Hughes, E.J., Soler, J., Murray, R.A., Ress, S.R., Kaplan, G., 2006. The effect of

Bacille Calmette–Guerin vaccine strain and route of administration on induced immune responses in vaccinated infants. *J. Infect. Dis.* 193, 531–536.

Davila, S., Hibberd, M.L., Dass R.H., Wong, H.E., Sahiratmadja, E., Bonnard, C., Alisjahbana, B., Szeszko, J.S., Balabanova, Y., Drobniowski, F., van Crevel, R., van de Vosse, E., Nejentsev, S., Ottenhoff, T.H., Seielstad, M., 2008. Genetic association and expression studies indicate a role of Toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS Genet.* 4(10):e1000218.

Dean, G.S., Rhodes, S.G., Coad, M., Whelan, A.O., Cockle, P.J., Clifford, D.J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 73, 6467–6471.

De Kantor, I.N., Roswurm, J.D., 1978. Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1233–1234.

De la Rúa-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and a review of the zoonótica aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 86, 77–109.

De La Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, g-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 8, 190–210.

Del Pozo, M.A., Sánchez-Mateos, P., Sánchez-Madrid, F., 1996. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? *Immunol. Today* 17, 127–131.

Denis, M., Wedlock, D.N., McCarthy, A.R., Parlane, N.A., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Buddle, B.M., 2007. Enhancement of the sensitivity of the whole-blood gamma-interferon assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infections in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1483–1489.

Desombere, I., Meuleman, P., Rigole, H., Willems, A., Irsch, J., Leroux- Roels, G., 2004. The interferon-gamma secretion assay: a reliable tool to study interferon-gamma production at the single cell level. *J. Immunol. Methods* 286:167–185.

Dharmadhikari, A.S., Nardell, E.A., 2008. What animal models teach humans about tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 39, 503–508.

Dietrich, J., Aagaard, C., Leah, R., Olsen, A.W., Stryhn, A., Doherty, T.M., Andersen, P., 2005. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J. Immunol.* 174, 6332–6339.

Dlugovitzky, D., Torres-Morales, A., Rateni, L., Farroni, M.A., Largacha, C., Molteni, O., Bottasso, O., 1997. Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *Immunol. Med. Microbiol.* 18, 203–207.

Dlugovitzky, D., Bay, M.L., Rateni, L., Fiorenza, G., Vietti, L., Farroni, M.A., Bottasso, O.A., 2000. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood

mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin. Exp. Immunol.* 122, 343–349.

Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., 1995. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.* 58, 217–221.

Draper, P., 1998. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front. Biosci.* 3, 1253-1261.

Dungworth, D.L., 1985. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N., (Editors), *Pathology of Domestic Animals*. 3rd Ed. Vol 2, Acad. Press, Orlando, Fla. pp. 493-505.

Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M.C., 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA.* 282, 677–686.

Egen, J.C., Allison J.P., 2002. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, 23-35.

Elloso, M.M., van derHeyde, H.C., Troutt, A., Manning, D.D., Weidanz, W.P., 1996. Human $\gamma\delta$ T cell subset-proliferative response to malarial antigen *in vitro* depends on CD4+ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. *J. Immunol.* 157, 2096–2102.

Endsley, J.J., Hogg, A., Shell, L.J., McAulay, M., Coffey, T., Howard, C., Capinos Scherer, C.F., Waters, W.R., Nonnecke, B., Estes, D.M., Villarreal-Ramos, B., 2007. *Mycobacterium bovis* BCG vaccination induces memory CD4+ T cells characterized by effector biomarker expression and anti-mycobacterial activity. *Vaccine* 25, 8384-8394.

Enríquez-Cruz, C., Cruz-Hernández, N.I., Zertuche-Rodríguez, J.L., Uriegas-García, J.L., Toscano-Ruiz, J.E., Flores-Gutiérrez, G.H., 2010. Epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico, bordering the United States, at establishment of controlling strategies. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 1029-1035.

Erb, K.J., Kirman, J., Delahunt, B., Moll, H., Le Gros, G., 1999. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon-gamma signalling. *Euro. Cytokine Netw.* 10, 147–53.

Ernst, J.D., 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 66, 1277–1281.

Esin, S., Batoni, G., KaËllenius, G., Gaines, H., Campa, M., Svenson, S.B., Andersson, R., Wigzell, H., 1996. Proliferation of distinct human T cell subsets in response to live, killed or soluble extracts of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Clin. Exp. Immunol.* 104, 419-425.

Estes, D.M., Brown, W.C., 2002. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 90, 1-10.

Estrada-Chávez, C., Díaz, O.F., Pérez, G.R., 1995. Comparison of three immunodiagnostic tests with necropsy examination results for diagnosis of bovine tuberculosis. *International Symposium on*

bovine tuberculosis in animals and Human beings. Riverdale (Maryland) USA. Riverdale, MD, 1995:14.

Estrada-Chávez, C., Mancilla, R., Arriaga, D.C., Pérez, G.R., Díaz, O.F., 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet. Mex.* 32, 207-211.

Estrada-Chávez, C., Díaz, O.F., Arriaga, D.C., Villegas-Sepúlveda, N., Pérez, G.R., González, S.D., 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex.* 35, 225-236.

Ferguson, J.S., Schlesinger, L.S., 2000. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* 80, 173–184.

Fifis, T., Costopoulos, C., Corner, L.A., Wood, P.R., 1992. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 30, 343–354.

Fine, P.E., 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 346, 1339–1345.

Floyd, S., Ponnighaus, J.M., Bliss, L., Nkhosa, P., Sichali, L., Msiska, G., Fine, P.E., 2002. Kinetics of delayed-type hypersensitivity to tuberculin induced by bacille Calmette-Guerin vaccination in northern Malawi. *J. Infect. Dis.* 186, 807–14.

Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Chan, J., Triebold, K.J., Pfeffer, K., Lowenstein, C.J., Schreiber, R., Mak, T.W., Bloom, B.R., 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2, 561–572.

Francis, J., 1947. Bovine Tuberculosis, including a contrast with human tuberculosis. Staples Press Ltd, London, pp. 86-87.

Francis, J., 1958. Tuberculosis in animals and man. A study of comparative pathology. Cassell, London.

Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, W.I., O'Boyle, D., Lumsden, M.J., Frost, A.J., 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103, 420–435.

Fritsche, A., Engel, R., Buhl, D., Zellweger, J.P., 2004. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 903-904.

Gallagher, J., 1980. Badgers, cattle and tuberculosis. Lord Zuckerman report. HMSO, London, pp. 86-94.

Gallagher, J., Clifton-Hadley, R.S., 2000. Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Res. Vet. Sci.* 69, 203-217.

García, M.A., Sarmiento, M., Acosta, A., 2009. La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. *VacciMonitor* 18, 31-37.

Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson R.G., 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100, 7877–7882.

Garraud, O., Nutman, T.B., 1996. The role of cytokines in human B-cell differentiation into immunoglobulin-secreting cells. Bull. Inst. Pasteur 94, 285–309.

Gey Van Pittius, N.C., Gamielien, J., Hide, W., Brown, G.D., Siezen, R.J., Beyers, A.D., 2001. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. Genome Biol. 2, Research0044.

Gheorghiu, M., Lagrange, P.H., 1983. Viability, heat stability and immunogenicity of four BCG vaccines prepared from four different BCG strains. Ann. Immunol. (Paris) 134C, 125–147.

Gil, A., Samartino, L., 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discussion, Paper No. 2. Food and Agriculture Organization Livestock Information and Policy Branch, AGAL. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 16-22.

Gobin, J., Wong, D.K., Gibson, B.W., Horwitz, M.A., 1999. Characterization of exochelins of the *Mycobacterium bovis* type strain and BCG substrains. Infect. Immun. 67, 2035–2039.

Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Elsasser, T.H., Davis, W.C., Valdez, R.A., 2002. IL-4 and IL-10 inhibition of IFN- γ - and TNF- α -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. Vet. Immunol. Immunopathol. 84, 237–51.

Glover, R.E., Richie, J.N., 1953. Field trials with BCG for immunisation of calves against tuberculosis. Br. Vet. J. 109, 411–427.

Goldfeld, A. E., Delgado, J.C., Thim, S., Bozon, M.V., Uglialoro, A.M., Turbay, D., Cohen, C., Yunis, E.J., 1998. Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis. JAMA 279, 226–228.

Gómez, J.E., McKinney, J.D., 2004. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. Tuberculosis (Edinb) 84, 29-44.

González-Llamazares, O.R., Gutiérrez C.B.M., Nistal, D.A., Redondo, V.A.D.P., Domínguez L.R., Rodríguez, E.F. F., 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Vet. Microbiol. 70, 55–66.

Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T., 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol. Microbiol. 32, 643-655.

Gormley, E., Fray, L., Sandall, L., Ke, G., Dupont, C., Carpenter, E., 1999. Detection of *Mycobacterium bovis* lymphocyte stimulating antigens in culture filtrates of a recombinant *Mycobacterium smegmatis* cosmid library. Vaccine 17, 2792–2801.

- Gormley, E., Doyle, M.B., McGill, K., Costello, E., Good, M., Collins, J.D., 2004. 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 413–420.
- Gortazar, C., Vicente, J., Gavier-Widen, D., 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet. Rec.* 152, 779-780.
- Grange, J.M., Gibson, J.A., 1986. Strain to strain variation in the immunogenicity of BCG. *Dev. Biol. Stand.* 58, 37–41.
- Griffin, J.M., Dolan, L.A., 1995. The role of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the Republic of Ireland: a review. *Irish Vet. J.* 48, 228–234.
- Griffith, A.S., 1937. Bovine tuberculosis in man. *Tubercle* 18, 528-543.
- Guarda, F., Bollo, E., Bioliotti, B., Negro, M., Comino, G., 1995. Sul coinvolgimento delle tonsille nella tubercolosi del bovino: problemi e prospettive. 27th Proceedings of the Italian Association for Buiatrics. Alba (CN) pp. 263-267.
- Guenin-Macé, L., Siméone, R., Demangel, C., 2009. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg. Dis.* 56, 255–268.
- Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., Deretic, V., 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766.
- Hamblin, S.A., 1993. Cytokines and cytokine receptors. Second edition, IRL PRESS, London.
- Hanna, J., Neill, S.D., O'Brien, J.J. 1989. Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, 47, 43-47.
- Hanna, J., Neill, S.D., O'Brien, J.J., 1992. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31, 243–249.
- Happel, K.I., Lockhart, E.A., Mason, C.M., Porretta, E., Keoshkerian, E., Odden, A.R., Nelson, S., Ramsay, A.J., 2005. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infect. Immun.* 73, 5782–5788.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, J.R., Garcia, M.M., Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nagai, S., 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28, 913–921.
- Hardie, R.M., Watson, J.M., 1992. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 109, 23-33.
- Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, M., Miyasaka, M., Taniguchi, T., 1989. Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science.* 244, 551-556.

Haring, C.M., Traum, J., Hayes, F.M., Henry, B.S., 1930. Vaccination of calves against tuberculosis with Calmette–Guerin culture, BCG. *J. Agric. Sci.* 4, 307–394.

Hedvall, E., 1942. Bovine tuberculosis in man. *Acta. Med. Scand.* 135, 1–196.

Hengster, P., Schnapka, J., Fille, M., Menardi, G., 1992. Occurrence of suppurative lymphadenitis after a change of BCG vaccine. *Arch. Dis. Child.* 67, 952–955.

Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Buddle, B.M., 2003. Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics. *Tuberculosis (Edinb).* 83, 119–130.

Hirsch, C.S., Toossi, Z., Othieno, C., Johnson, J.L., Schwander, S.K., Robertson, S., Wallis, R.S., Edmonds, K., Okwera, A., Mugerwa, R., Peters, P., Ellner, J.J., 1999. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J. Infect. Dis.* 180, 2069–2073.

Hope, J.C., Kwong, L.S., Sopp, P., Collins, R.A., Howard, C.J., 2000. Dendritic cells induce CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and *M. avium* antigens in Bacille Calmette Guerin vaccinated and nonvaccinated cattle. *Scand. J. Immunol.* 52, 285–291.

Hope, J.C., Vordermeier, H.M., 2005. Vaccines for bovine tuberculosis: current views and future prospects. *Expert. Rev. Vaccines* 4, 891–903.

Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Howard, C.J., 2005a. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immunol.* 139, 48–56.

Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Howard, C.J., 2005b. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 432–439

Hope, J.C., Thom, M.L., McAulay, M., Mead, E., Vordermeier, H.M., Clifford, D., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2011. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 373–379.

Horwitz, M.A., Harth, G., Dillon, B.J., Maslesa-Galic, S., 2000. Recombinant bacillus Calmette–Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13853–13858.

Hota, B., 2004. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Healthcare Epidemiology* 39, 1182–1189.

Howard, A.D., Zwilling, B.S., 1999. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 428–434.

Hughes, A.J., Hutchinson, P., Gooding, T., Freezer, N.J., Holdsworth, S.R., Johnson, P.D., 2005. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 132–139.

Hussain, R., Dawood, G., Abrar, N., Toossi, Z., Minai, A., Dojki, M., Ellner, J.J., 1995. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin-G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 726–732.

Hussain, R., Shiratsuchi, H., Ellner, J.J., Wallis, R.S., 2000. PPD-specific IgG1 antibody subclass upregulate tumour necrosis factor expression in PPD-stimulated monocytes: possible link with disease pathogenesis in tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 119, 449–455.

Jalapathy, K.V., 2006. NlaA: a protein of *Mycobacterium tuberculosis* mediates evasion of host cell apoptosis. Dissertation. New York: Yeshiva University.

Janeway, C., 2005. Immunobiology: The immune system in health and disease. Garland Science, New York, NY, USA, 6th edition.

Javed, M., Frasca, S., Rood, D., Cecchini, K., Gladd, M., Geary, S., Silbart, L., 2005. Correlates of immune protection in chickens vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* strain GT5 following challenge with pathogenic *M. gallisepticum* strain rlow. *Infect. Immun.* 2005; 73, 5410–5419.

Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A., 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis* 87, 71–76.

Jones, B.W., Means, T.K., Heldwein K.A., Keen M.A., Hill, P.J., Belisle, J.T., Fenton, M.J., 2001. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J. Leukoc. Biol.* 69, 1036–1044.

Jönsson, B., Ridell, M., Wold, A.E., 2012. The surface lipids of non-tuberculous mycobacteria suppress production of phagocyte activating cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes Infect.* 14, 768–777.

Juffermans, N.P., Florquin, S., Camoglio, L., Verbon, A., Kolk, A.H., Speelman, P., van Deventer, S.J., van Der Poll, T., 2000. Interleukin- 1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infec. Dis.* 182, 902–908.

Junqueira-Kipnis, A.P., Kipnis, A., Jamieson, A., Juarrero, M.G., Diefenbach, A., Raulet, D.H., Turner, J., Orme, I.M., 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J. Immunol.* 171, 6039–6045.

Kang, P.B., Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E., Schlesinger, L.S., 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J. Exp. Med.* 202, 987–999.

Karlson, A.G., 1962. Nonspecific or cross-sensitivity reactions to tuberculin in cattle. *Adv. Vet. Sci.* 7, 148–175.

Karlsson, A.C., Martin, J.N., Younger, S.R., Bredt, B.M., Epling, L., Ronquillo, R., Varma, A., Deeks, S.G., McCune, J.M., Nixon, D.F., Sinclair, E., 2003. Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* 283, 141–153.

Kasahara, K., Sato, I., Ogura, K., Takeuchi, H., Kobayashi, K., Adachi, M., 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*, J. Infect. Dis. 178, 127-137.

Kasarov, L.B., Moat, A.G., 1972. Metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide in human and bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 110, 600-603.

Katska, L., Bochenek, M., Kania, G., Ryńska, B., Smorag, Z., 2002. Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary cultures established for bovine cloning. Theriogenology 58, 1733-44.

Kaufmann, S.H.E., 2003. Immune response to tuberculosis: experimental animal models. Tuberculosis 83, 107-111.

Kaufmann, S.H.E., Hussey, G., Lambert, P.H., 2010. New vaccines for tuberculosis. Lancet. 375, 2110-2119.

Keane, J., Balcewicz-Sablinska, M.K., Remold, H.G., Chupp, G.L., Meek, B.B., Fenton, M.J., Kornfeld, H., 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect. Immun. 65, 298-304.

Kennedy, H.E., Welsh, M.D., Bryson, D.G., Cassidy, J.P., Forster, F.I., Howard, C.J., Collins, R.A., Pollock, J.M., 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells. Infect. Immun. 70, 1488-1500.

Khader, S.A., Pearl, J.E., Sakamoto, K., Gilmartin, L., Bell, G.K., Jelley-Gibbs, D.M., Ghilardi, N., deSavage, F., Cooper, A.M., 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. J. Immunol. 175, 788-795.

Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M., 2007. IL-23 and IL-17 in establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses upon vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. Nat. Immunol. 8, 369-377.

Khader, S.A., Cooper, A.M., 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. Cytokine 41, 79-83.

Kindler, V., Sappino, A.P., Grau, G.E., Piguet, P.F., Vassalli, P., 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell, 56, 731-740.

Kirkham, P.A., Takamatsu, H.H., Parkhouse, R.M.E., 1997., Growth arrest of $\gamma\delta$ T cells induced by monoclonal antibody against WC1 correlates with activation of multiple tyrosine phosphatases and dephosphorylation of MAP kinase erk2. Eur. J. Immunol. 27, 717-725.

Kisich, K.O., Higgins, M., Diamond, G., Heifets, L., 2002. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils, Infect. Immun. 70, 4591-4599.

Kleinnijenhuis, J., Joosten, L.A.B., van de Veerdonk, F.L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B.J., van der Ven, A., Ottenhoff, T.H., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., Netea, M.G., 2009.

Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*. Eur. J. Immunol. 39, 1914–1922.

Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., van Crevel, R., 2011. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Dev. Immunol. 2011, 1-12.

Kolattukudy, P.E., Fernandes, N.D., Azad, A.K., Fitzmaurice, A.M., Sirakova, T.D., 1997. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. Mol. Microbiol. 24, 263–270.

Koppel, E.A., van Gisbergen, K.P., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y., 2005. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. Cell. Microbiol. 7, 157–165.

Korbel, D.S., Schneider, B.E., Schaible, U.E., 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microb. Infect. 10, 995-1004.

Krensky, A.M., 2000. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. Biochem. Pharmacol. 59, 317-320.

Kröger, L., Korppi, M., Brander, E., Kröger, H., Wasz-Höckert, O., Backman, A., Rapola, J., Launiala, K., Katila, M.L., 1995. Osteitis caused by bacille Calmette–Guerin vaccination: a retrospective analysis of 222 cases. J. Infect. Dis. 172, 574–576.

Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Uematsu, S., Ng, Y.W., Legaspi, A., Liu, P.T., Cole, S.T., Godowski, P.J., Maeda, Y., Sarno, E.N., Norgard, M.V., Brennan, P.J., Akira, S., Rea, T.H., Modlin, R.L., 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. Nat. Med. 9, 525–532

Kulpraneet, M., Sukwit, S., Sumransurp, K., Chuenchitra, T., Santiwatanakul, S., Srisurapanon, S., 2007. Cytokine production in NK and NKT cells from *Mycobacterium tuberculosis* infected patients. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 38, 370-375.

Kundu, M., Thompson, C.B., 2008. Autophagy: basic principles and relevance to disease. Annu. Rev. Pathol. 3, 427–455.

Ladel, C. H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K., Kopf, M., Kaufmann, S.H., 1997. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. Infect. Immun. 65, 4843–4849.

Lagranderie, M., Balazuc, A., Deriaud, E., Leclerc, C., Gheorghiu, M., 1996. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. Infect. Immun. 64, 1–9.

Laguado, J., 2007. Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. Rev. MVZ Córdoba 12, 1077-1095.

Lalvani, A., Brookes, R., Wilkinson, R.J., Malin, A.S., Pathan, A.A., Andersen, P., Dockrell, H., Pasvol, G., Hill, A.V., 1998. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 270-275.

- Law, K., Weiden, M., Harkin, T., Tchou-Wong, K., Chi, C., Rom, W.N., 1996. Increased release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 799-804.
- Lenzini, L., Rottoli, P., Rottoli, L., 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 27, 230–237.
- Lepper, A.W.D., Pearson, C.W., Corner, L.A., 1977. Anergy to tuberculin in beef cattle. *Aust. Vet. J.* 53, 214–216.
- Lepper, A.W.D., Corner, L.A., 1983. Naturally occurring mycobacterioses of animals. In: Ratledge, C., Stanford, J., (Editors), *The Biology of the Mycobacteria II*. Acad. Press, London, pp. 418-521.
- Lewinsohn, D.M., Alderson, M.R., Briden, A.L., Riddell, S.R., Reed, S.G., Grabstein, K.H., 1998. Characterization of human CD8⁺ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 187, 1633–1640.
- Li, H., Ulstrup, J.C., Jonassen, T.O., Melby, K., Nagai, S., Harboe, M., 1993. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 61, 1730–1734.
- Li, L., Elliot, J.F., Mosmann, T.R., 1994. Il-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T Helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 153, 3967-3978.
- Liébana E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gómez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., Domínguez, L., 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 33–36.
- Liébana, E., Girvin, R.M., Welsh, M.D., Neill, S.D., Pollock, J.M., 1999. Generation of CD8⁺ T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 67, 1034–1044.
- Liébana, E., Aranaz, A., Aldwell, F.E., McNair, J., Neill, S.D., Pollock, J.M., 2000. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology* 99, 23–29.
- Lightbody, K.A., Skuce, R.A., Neill, S.D., Pollock, J.M., 1998. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.* 142, 295–300.
- Lightbody, K.A., McNair, J., Neill, S.D., Pollock, J.M., 2000. IgG isotype antibody responses to epitopes of the *Mycobacterium bovis* protein MPB70 in immunised and in tuberculin skin test-reactor cattle. *Vet. Microbiol.* 75, 177–188.
- Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F.M., Gong, J., Barnes, P.F., 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 64, 1351–1356.

- Lind, A., Lundholm, M., Pedersen, G., Sundaeus, V., Whalén, P., 1986. A carrier method for the assessment of the effectiveness of disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Hosp. Infect.* 7, 60-67.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., Peach, R., 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.
- Linton, D.S., 2005. Emil Von Behring: infectious disease, immunology serum therapy. Philadelphia, PA: American Philosophical Society.
- Locht, C., 2010. The history of BCG. In: Nor NM, Acosta A, Sarmiento ME, editors. The art and science of tuberculosis vaccine development. Shah Alam, Malaysia: Oxford University Press pp. 149–167.
- Lockhart, E., Green, A., Flynn, J., 2006. IL-17 production is dominated by gamma-delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 177, 4662-4669.
- Lopez-Valencia, G., Renteria-Evangelista, T., Williams, J.de J., Licea-Navarro, A., Mora-Valle, A.de L., Medina-Basulto, G., 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 88, 44–49.
- Lyashchenko, K.P., Pollock, J.M., Colangeli, R., Gennaro, M.L., 1998. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 5344–5349.
- Lyashchenko, K., Whelan, A.O., Greenwald, R., Pollock, J.M., Andersen, P., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2004. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immunol.* 72, 2462–2467.
- MacGurn, J.A., Raghavan, S., Stanley, S.A., Cox, J.S., 2005. A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 57, 1653–1663.
- Mackay, C.R., Maddox, J.F., Brandon, M.R., 1986. Three distinct subpopulations of sheep T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 16, 19–25.
- Maddock, E.C.G., 1933. Studies on the survival time of the bovine tuberculosis bacillus in soil, soil and dung, in dung and on grass, with experiments on the preliminary treatment of infected organic matter and the cultivation of the organism. *J. Hyg.* 33, 372-379.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., Stover, C.K., 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178, 1274–1282.
- Maino, V.C., Maecker, H.T., 2004. Cytokine flow cytometry: a multiparametric approach for assessing cellular immune responses to viral antigens. *Clin. Immunol.* 110, 222–231.
- Majeed, M., Perskvist, N., Ernst, J.D., Orselius, K., Stendahl, O., 1998. Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb. Pathol.* 24, 309-320.

- Martino, A., Sacchi, A., Volpe, E., Agrati, C., De Santis, R., Pucillo, L.P., Colizzi, V., Vendetti, S., 2005. Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* induces the differentiation of human monocytes directly into fully mature dendritic cells. *J. Clin. Immunol.* 25, 365-375.
- Maue, A.C., Waters, W.R., Davis, W.C., Palmer, M.V., Minion, F.C., Estes, D.M., 2005. Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infect. Immun.*, 73, 6659–6667.
- Mazzaccaro, R. Gedde, J.M., Jensen, E.R., van Santen, H.M., Ploegh, H.L., Rock, K.L., Bloom, B.R., 1996. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11786–11791.
- McCorry, T., Whelan, A.O., Welsh, M.D., McNair, J., Walton, E., Bryson, D.B., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Pollock, J.M., 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle experimentally infected with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec.* 157, 613–618.
- McIlroy, S.G., Neill, S.D. McCracken, R.M., 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet. Rec.*, 118, 718-721.
- Means, T. K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 1999a. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163, 6748-6755.
- Means, T. K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 1999b. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 163, 3920-3927.
- Means, T.K., Jones, B.W., Schromm, A.B., Shurtleff, B.A., Smith, J.A., Keane, J., Golenbock, D.T., Vogel, S.N., Fenton, M.J., 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J. Immunol.* 166, 4074–4082.
- Medlar, E.M., 1940. Pulmonary tuberculosis in cattle, *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 41, 283-306.
- Meena, L.S., Rajni. 2010. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J.* 277, 2416–2427.
- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J.* 160, 92-106.
- Milián, F., Sánchez, L.M., Toledo, P., Ramírez, C., Santillán, M.A., 2000. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42, 13-19.
- Millington, K.A., Fortune, S.M., Low, J., Garces, A., Hingley-Wilson, S.M., Wickremasinghe, M., Kon, O.M., Lalvani, A., 2011. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5730–5735.

- Millman, A.C., Salman, M., Dayaram, Y.K., Connell, N.D., Venketaraman, V., 2008. Natural killer cells, glutathione, cytokines, and innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Interferon Cytokine Res.* 28, 153-165.
- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D.S., Katoch, V.M., Srivastava, K., Thakral, S.S., Bharadwaj, S.S., Sreenivas, V., Prasad, H.K., 2005. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5670–5678.
- Mitscherlich, E., Marth, E.H., 1984. Microbial survival in the environment: bacteria and rickettsiae important in human and animal health. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 235- 242.
- Miura, K., Nagai, S., Kinomoto, M., Haga, S., Tokunaga, T., 1983. Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70. *Infect. Immun.* 39, 540–545.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40, 111–124.
- Monaghan, M.L., Quinn, P.J., Kelly, A.P., McGill, K., McMurray, C., O’Crowley, K., Bassett, H.F., Costello, E., Quigley, F., Rothel, J.S., Wood, P.R., Collins, J.D., 1997a. A pilot trial to evaluate the γ -interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle under Irish conditions. *Ir. Vet. J.* 50, 229–232.
- Monaghan, M.L., Collins, J.D., McGill, K., Kelly, A., Fitzsimmons, T.A., 1997b. A longitudinal study of cattle found positive to the interferon- γ assay for *Mycobacterium bovis* infection: preliminary findings. In: Tuberculosis Investigation Unit Selected Papers, University College Dublin, pp. 59–60.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New. Engl. J. Med.* 329, 2002-2012.
- Moodie, P.A., 1977. Tuberculin reactions in BCG-vaccinated cattle. *Br. Vet. J.* 133,642–645.
- Morales, A.L., Peñuelas, K.U., Alavarez, G.O., Martínez, I.O.V., Maldonado, J., Mendoza, G.D., Milian, F.S., 2008. Correlación entre PCR en exudado nasal y la reacción de tuberculina para la detección de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos. *Rev. Cient.* 18, 17-21.
- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R., 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40, 153–177.
- Morrison, W.I., Davis, W.C., 1991. Differentiation antigens expressed predominantly on CD4–CD8-T lymphocytes (WC1, WC2). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27, 71–76.
- Morrison, W.I., Bourne, F.J., Cox, D.R., Donnelly, C.A., Gettinby, G., McInerney, J.P., Woodroffe, R., 2000. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet. Rec.*, 146, 236-242.
- Mostowy, S., Tsolaki, A.G., Small, P.M., Behr, M.A., 2003. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 21, 4270–4274.

- Murphy, D., Corner, L.A., Gormley, E., 2008. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis (Edinb)* 88, 344–357.
- Murray, P.J., 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trend. Immunol.* 7, 366–372.
- Neill, S.D., O’Brien, J.J., McCracken, R.M., 1988a. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet. Rec.* 122, 184–186.
- Neill, S.D., Hanna, J., O’Brien, J.J., McCracken, R. M., 1988b. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340-343.
- Neill, S.D., Hanna, J., O’Brien, J.J., McCracken, R.M., 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Vet. Rec.* 124, 269-271.
- Neill, S.D., O’Brien, J.J., Hanna, J., 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet. Microbiol.* 28, 103–109.
- Neill, S.D., Hanna, J., Mackie, D.B., Bryson, T.D.S., 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from tuberculin negative cattle. *Vet. Rec.* 131, 45-47.
- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J., 1994a. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 40, 41-52.
- Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis.* 81, 79-86.
- Ng, K.H., Watson, J.D., Prestidge, R., Buddle, B.M., 1995. Cytokine mRNA expressed in tuberculin skin test biopsies from BCG-vaccinated and *Mycobacterium bovis* inoculated cattle. *Immunol. Cell Biol.* 73, 362-368.
- Ng, K.H., Aldwell, F.E., Wedlock, D.N., Watson, J.D., Buddle, B.M., 1997. Antigen-induced interferon- γ and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57, 59-68.
- Nonnecke, B.J., Waters, W.R., Foote, M.R., Palmer, M.V., Miller, B.L., Johnson, T.E., Perry, H.B., Fowler, M.A., 2005. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin. *J. Dairy Sci.* 88, 195–210.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agro alimentaria. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=2189>.
- North R.J., Jung, Y.J., 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599-623.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., Kolb, H., 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex,” *J. Immunol.* 164, 558–561.

OIE Terrestrial Manual 2009. Bovine Tuberculosis Chapter 2.4.7, pp. 1-16. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf

Orme, I.M., Collins, F.M., 1984. Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell. Immunol.* 84, 113–120.

Orme, I.M., Roberts, A.D., Griffin, J.P., Abrams, J.S., 1993. Cytokine secretion by CD4+ T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 151, 518–525.

Orme, I.M., 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 589–593.

Ota, M.O., Goetghebuer, T., Vekemans, J., Okoko, B.J., Newport, M.J., McAdam, K.P., Marchant, P., 2006. Dissociation between tuberculin skin test and *in vitro* IFN-gamma responses following neonatal BCG vaccination. *J. Trop. Pediatr.* 52, 136–140.

Pahar, B., Li, J., Rourke, T., Miller, C.J., McChesney, M.B., 2003. Detection of antigen-specific T cell interferon-gamma expression by ELISPOT and cytokine flow cytometry assays in rhesus macaques. *J. Immunol. Methods* 282, 103–115.

Pais, T.F., Silva, R.A., Smedegaard, B., Appelberg, R., Andersen, P., 1998. Analysis of T cells recruited during delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative (PPD) versus challenge with tuberculosis infection. *Immunology* 95, 69–75.

Palmer, M.V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2002. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. *Tuberculosis (Edinb)* 82, 275–82.

Palmer, M.V., Waters, W.R., Whipple, D.L., 2004. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1483–1489.

Palmer, M.V., Waters, W.R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know? *Vet. Microbiol.* 112, 181–190.

Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Lysachenko, K.P., 2006. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma-interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 387–394.

Palomino, J.C., Leão, S.C., Ritacco, V., 2007. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. First Edition. www.TuberculosisTextbook.com.

Parrish, N.M., Dick, J.D., Bishai, W.R., 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trend. Microbiol.* 6, 107–112.

Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 74, 1-15.

Placido, R., Mancino, G., Amendola, A., Mariani, F., Vendetti, S., Piacentini, M., Sanduzzi, A., Bocchino, M.L., Zembala, M., Colizzi, V., 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Pathol.* 181, 31–38.

- Plackett, P., Ripper, J., Corner, L.A., Small, K., de Wittle, K., Melville, L., Hides, S., Wood, P.R., 1989. An ELISA for detection of anérgico tuberculous cattle. *Aust. Vet. J.* 66, 15–19.
- Plattner, B.L., Hostetter, J.M., 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet. Med. Int.* 2011, 214384.
- Pollock, J.M., Pollock, D.A., Campbell, D.G., Girvin, R.M., Crockard, A.D., Neill, S.D. Mackie, D.P., 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 87, 236-241.
- Pollock, J.M., Andersen, P., 1997a. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 175, 1251-1254.
- Pollock, J.M., Andersen, P., 1997b. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun.* 65, 2587-2592.
- Pollock, J.M., Buddle, B.M., Andersen, P., 2001. Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis (Edinb)* 81, 65–69.
- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 163, 115-127.
- Pollock, J.M., McNair, J., Bassett, H., Cassidy, J.P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I., Andersen, P., 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1856–1860.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 37–43.
- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D., McNair, J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 112, 141–150.
- Pompei, L., Jang, S., Zamlynny, B., Ravikumar, S., McBride, A., Hickman, S.P., Salgame, P., 2007. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J. Immunol.* 178, 5192–5199.
- Price, S.J., Sopp, P., Howard, C.J., Hope, J.C., 2007. Workshop cluster 1⁺γδ T-cell receptor⁺ T cells from calves express high levels of interferon-γ in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunol.* 120, 57-65.
- Pritchard, D.G., 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988, Conquest and controversy. *J. Comp. Pathol.* 99, 357-399.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., Cole, S.T., 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 46, 709–717.
- Raja, A., 2004 Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 120, 213-232.

- Ranganathan, U.D., Larsen, M.H., Kim, J., Porcelli, S.A., Jacobs, Jr. W.R., Fennelly, G.J., 2009. Recombinant pro-apoptotic *Mycobacterium tuberculosis* generates CD8+ T cell responses against human immunodeficiency virus type 1 Env and *M. tuberculosis* in neonatal mice. *Vaccine* 28, 152–161.
- Ravikumar, M., Dheenadhayalan, V., Rajaram, K., Lakshmi, S.S., Kumaran, P.P., Paramasivan, C.N., Balakrishnan, K., Pitchappan, R., 1999. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. *Tuber. Lung Dis.* 79, 309–317.
- Rempt, D., 1954. Veterinary work in the Netherlands 1953. Netherlands Veterinary Service, pp. 80.
- Rennie, B., Filion, L.G., Smart, N., 2010. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. *BMC Vet. Res.* 6, 50.
- Rhodes, S.G., Palmer, N., Graham, S.P., Bianco, A.E., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000a. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 68, 5393–5400.
- Rhodes, S.G., Gavier-Widen, D., Buddle, B.M., Whelan, A.O., Singh, M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000b. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 68, 2573–2578.
- Riedel, D.D., Kaufmann, S.H., 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* 65, 4620–4623.
- Ritacco, V., Lopez, B., De Kantor, I.N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A., 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50, 365–367.
- Rizzi, C., Bianco, M.V., Blanco, F.C., Soria, M., Gravisaco, M.J., Montenegro, V., Vagnoni, L., Buddle, B.M., Garbaccio, S., Delgado, F., Leal, K.S., Cataldi, A.A., O.A., Dellagostin, Bigi, F., 2012. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. *PLoS ONE* 7, e51396.
- Rojas, R.E., Balaji, K.N., Subramanian, A., Boom, W.H., 1999. Regulation of human CD4(+) ab T-cell-receptor-positive (TCR+) and cd TCR+ T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor b. *Infect. Immun.* 67, 6461–6472.
- Rook, G.A.W., Hernandez-Pando, R., Dheda, K., Seah, G.T., 2004. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol.* 25, 483–488.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990a. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134–137.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990b. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.* 69, 1–4.
- Rowland, R., McShane, H., 2011. Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert. Rev. Vaccines* 10, 645–658.

- Ryan, T.J., Buddle, B.M., de Lisle, G.W., 2000. An evaluation of the gamma-interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res.Vet. Sci.* 69, 57–61.
- Salzman, M.B., Lorry, G.R., 1996. Meningococemia. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 10, 709-725.
- Saunders, B. M., Frank, A.A., Orme, I.M., Cooper, A.M., 2000. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 68, 3322–3326.
- Sauty, A., Dziejman, M., Taha, R., Larossi, A., Neote, K., García-Zepeda, E., Hamid, Q., Luster, A.D., 1999. The T Cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human epithelial cells. *J. Immunology* 162, 3549-3558.
- Schierloh, P., Yokobori, N., Aleman, M., Landoni, V., Geffner, L., Musella, R.M., Castagnino, J., Baldini, M., Abbate, E., de la Barrera, S.S., Sasiain, M.C., 2007. *Mycobacterium tuberculosis*-induced gamma interferon production by natural killer cells requires cross talk with antigen-presenting cells involving Toll-like receptors 2 and 4 and the mannose receptor in tuberculous pleurisy. *Infect. Immun.* 75, 5325-5337.
- Schlesinger, L.S., 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* 150, 2920–2930.
- Schwartz, R.H., 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349–1356.
- Schwarz, A., Grabbe, S., Riemann, H., Aragane, Y., Simon, M., Manon, S., Andrade, S., Luger, T.A., Zlotnik, A., Schwarz, T., 1994. *In vivo* effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.* 103, 211-216.
- Secretaria de Salud. 1995. Norma Oficial para el Control y Prevención de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. Norma No. NOM-006-SSAA2-1993. Diario oficial de la federación. 496, 20-29.
- Secretaria de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Programa de acción específico. Tuberculosis. 2007-2012. México, 2008.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes, *Annu. Rev. Immunol* 23, 197-223.
- SENASICA. 2011. Situación actual. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. NOM-031-ZOO-1995. <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical Flow Cytometry*. New York. John Wiley & Sons Inc. 4th Edition.
- Sidders, B., Pirson, C., Hogarth, P.J., Hewinson, R.G., Stoker, N.G., Vordermeier, H.M., Ewer, K., 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.* 76, 3932–3939.

Skinner, M.A., Yuan, S., Prestidge, R., Chuk, D., Watson, J.D., Tan, P.L.J., 1997. Immunization with heat-killed *Mycobacterium vaccae* stimulates CD8⁺ cytotoxic T cells specific for macrophage infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 65, 4525-4530.

Skinner, M.A., Wedlock, D.N., Buddle, B.M., 2001. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev. Sci. Tech.* 20, 112–132.

Skinner, M.A., Parlane, N., McCarthy, A., Buddle, B.M., 2003. Cytotoxic T-cell responses to *Mycobacterium bovis* during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. *Immunology* 110, 234-241.

Smith, K.A., 1984. Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 319.

Smyth, A.J., Welsh, M.D., Girvin, R.M., Pollock, J.M., 2001. *In vitro* responsiveness of $\gamma\delta$ T cells from *Mycobacterium bovis* infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1(+) cells. *Infect. Immunol.* 69, 89–96.

Sopp, P., Howard, C.J., Hope, J.C., 2006. Flow cytometric detection of gamma interferon can effectively discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated cattle from *M. bovis*-infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1343-1348.

Sousa, A. O., Salem, J.I., Lee, F.K., Vercosa, M.C., Cruaud, P., Bloom, B.R., Lagrange, P.H., David, H.L., 1997. An epidemic of tuberculosis with a high rate of tuberculin anergy among a population previously unexposed to tuberculosis, the Yanomami Indians of the Brazilian Amazon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13227–13232.

Sreedevi, B., Krishnappa, G., 2004. Standardization of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms from bovines. *Indian J. Anim. Sci.* 74 (11), 1120–1123.

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., Musser, J. M., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9869–9874.

Stamp, J.T., 1948. Bovine pulmonary tuberculosis. *J. Comp. Pathol.*, 58, 9-23.

Stamp, J.T., 1959. Epidemiology and pathology. In: Stableforth A.W., Galloway, I.A., (Editors), *Infectious diseases of animals: diseases due to bacteria*. Vol 2, Butterworths, London.

Steck, P.A., Schwartz, M.S., Rosendhal, G., Gray, R., 1978. Mycolic acids: a reinvestigation. *J. Biol. Chem.* 253, 5625-5709.

Steele, J.H., 1995. Regional and country status report. In: Thoen, C.O., Steele, J.H., (Eds.). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. State University Press, Ames, Iowa, pp.162-172.

Stenger, S., Rosat, J.P., Bloom, B., Krensky, A., Modlin, R., 1999. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol. Today* 20, 390-394.

Suni, M.A., Picker, L.J., Maino, V.C., 1998. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 212, 89–98.

Sweeney, K.A., Dao, D.N., Goldberg, M.F., Hsu, T., Venkataswamy, M.M., Henao- Tamayo, M., Ordway, D., Sellers, R.S., Jain, P., Chen, B., Chen, M., Kim, J., Lukose, R., Chan, J., Orme, I.M., Porcelli, S.A., Jacobs, W.R. Jr., 2011. A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 17, 1261–1268.

Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J.L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L.P., Gluckman, J.C., Lagrange, P.H., Gicquel, B., Neyrolles, O., 2003. DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197, 121–127.

Takamatsu, H.H., Kirkham, P.A., Michael, R., Parkhouse, E., 1997. A $\gamma\delta$ T cell specific surface receptor (WC1) signaling G0/G1 cell cycle arrest. *Eur. J. Immunol.* 27, 105–110.

Tanner, M., Michel, A.L., 1999. Investigation of the viability of *M. bovis* under different environmental conditions in the Kruger National Park. *J. Vet. Res.* 66, 185–190.

Tapping, R.I., Tobias, P.S., 2003. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J. Endotoxin Res.* 9, 264–268.

Thacker, T.C., Palmer, M.V., Waters, W.R., 2011. Transcriptome analysis of stimulated PBMC from *Mycobacterium bovis* infected cattle. In: Fourth international symposium on animal functional genomics pp. 28.

Thoen, C.O., Karlson, A.G., Himes, E.M., 1984. *Mycobacterium tuberculosis* complex In: Kubrlca, G.P., Wayne, L.G., (Editors), *The Mycobacteria - A Sourcebook*. Part B, Marcel Dekker, New York. pp. 1209-1235.

Thom, M., Morgan, J.H., Hope, J.C., Villareal-Ramos, B., Martin, M., Howard, C.J., 2004. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 399–412.

Thom, M.L., Hope, J.C., McAulay, M., Villareal-Ramos, B., Coffey T.J., Stephens, S., Vordermeier, H.M., Howard, C.J., 2006. The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune response during *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 25–36.

Thoma-Uszynski, S, Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M.T., Engele, M., Sieling, P.A., Barnes, P.F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P.L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M.V., Belisle, J.T., Godowski, P.J., Bloom, B.R., Modlin, R.L., 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291, 1544–1547.

Tizard, R.I., 2009. *Introducción a la inmunología veterinaria*. Octava edición. Elsevier. España.

Trinchieri, G., 1997. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr. Opin Immunol.* 9, 24-34.

Tsao, T.C., Hong, J., Huang, C., Yang, P., Liao, S.K., Chang, K.S., 1999. Increased TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuber. Lung Dis.* 79, 279-285.

- Tweedle, N.E., Livingstone, P., 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 40, 23–39.
- Umemura, M., Yahagi, A., Hamada, S., Begum, M., Watanabe, H., Kawakami, K., Suda, T., Sudo, K., Nakae, S., Iwakura, Y., Matsuzaki, G., 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection. *J. Immunol.* 178, 3786–3796.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D., Aderem, A., 1999. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced pro-inflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14459–14463.
- van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., van der Meer, J.W., 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 294–309.
- van Rhijn, I., Godfroid, J., Michel, A., Rutten, V., 2008. Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models. *Microb Infect* 10, 711–715.
- Velmurugan, K., Chen, B., Miller, J.L., Azogue, S., Gurses, S., Hsu, T., Glickman, M., Jacobs, W.R.Jr., Porcelli, S.A., Briken, V., 2007. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog.* 3, e110.
- Villarreal-Ramos, B., Reed, S., McAulay, M., Prentice, H., Coffey, T., Charleston, B.C., Howard, C.J., 2006. Influence of the nature of the antigen on the boosting of responses to mycobacteria in *M. bovis*-BCG vaccinated cattle. *Vaccine* 24, 6850–6858.
- Vitale, F., Capra, G., Maxia, L., Reale, S., Vesco, G., Caracappa, S., 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1050–1055.
- Vordermeier, H.M., Cockle, P.C., Whelan, A., Rhodes, S., Palmer, N., Bakker, D., Hewinson, R.G., 1999. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 675–682.
- Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.C., Farrant, L., Palmer, N., Hewinson, R.G., 2001a. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8, 571–578.
- Vordermeier, M., Aranaz, A., Pollock, J.M., 2001b. Immunodiagnosis of bovine tuberculosis. In: Summary of a Satellite Workshop of the ‘*Mycobacterium bovis* 2000’ conference, Cambridge, UK, 17 August 2000. *Tuberculosis* 81, 177–180.
- Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Simmons, J., Hewinson, R.G., 2002. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immunol.* 70, 3026–3032.
- Vordermeier, H.M., Huygen, K., Singh, M., Hewinson, R.G., Xing, Z., 2006. Immune response induced in cattle by vaccination with recombinant adenovirus expressing mycobacterial antigen 85A and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immunol.* 74, 1416–1418.

Vordermeier, H.M., Brown, J., Cockle, P.J., Franken, W.P.J., Arend, S.M., Ottenhoff, T.H.M., Jahans, K., Hewinson, R.G., 2007. Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1203–1209.

Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P.J., McAulay, M., Rhodes, S.G., Thacker, T., Gilbert, S.C., McShane, H., Hill, A.V., Xing, Z., Hewinson, R.G., 2009. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 77, 3364–3373.

Vordermeier, H.M., 2010. Development of cattle tuberculosis vaccines. In: Norazmi, M.N., Acosta, A., Sarmiento, M.E., editors. *The art & science of tuberculosis vaccine development* 1st ed. Selangor (MY): Oxford University Press pp. 405–424.

Vordermeier, M., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., 2011. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.* 151, 8–13.

Waldmann, T.A., 1989. The multisubunit interleukin-2 receptor. *A. Rev. Biochem.* 58, 875-911.

Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, H.M., 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gamma delta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J. Comp. Pathol.* 133, 223–234.

Warwick, J.B., Paul, W., Winter, N., 1994. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol.* 2, 284-288.

Waters, W.R., Rahner, T.E., Palmer, M.V., Cheng, D., Nonnecke, B.J., Whipple, D.L., 2003a. Expression of L-Selectin (CD62L), CD44, and CD25 on activated bovine T cells. *Infect. Immun.* 71, 317–326.

Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Foote, M.R., Maue, A.C., Rahner, T.E., Palmer, M.V., Whipple, D.L., Horst, R.L., Estes, D.M., 2003b. *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guerin vaccination of cattle: activation of bovine CD4+ and gamma delta TCR+ cells and modulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Tuberculosis (Edinb)* 83, 287–297.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Payeur, J.B., Harris, N.B., Minion, F.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J.M., Lyashchenko, K.P., 2006. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 611–619.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Thacker, T.C., Scherer, C.F., Estes, D.M., Jacobs, W.R.Jr., Glatman-Freedman, A., Larsen, M.H., 2007. Failure of a *Mycobacterium tuberculosis* Delta RD1 Deltapan CD double deletion mutant in a neonatal calf aerosol *M. bovis* challenge model: comparisons to responses elicited by *M. bovis* bacille Calmette Guerin. *Vaccine* 25, 7832–7840.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Thacker, T.C., Scherer, C.F., Estes, D.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Barnes, S.W., Federe, G.C., Walker, J.R., Glynn, R.J., Hsu, T., Weinrick, B., Biermann, K., Larsen, M.H., Jacobs, W.R. Jr., 2009. Efficacy and immunogenicity of

Mycobacterium bovis Delta RD1 against aerosol *M. bovis* infection in neonatal calves. *Vaccine* 27, 1201–1209.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Davis, W.C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K.G., Hope, J.C., Estes, D.M., 2011. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 1-11.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611– 2622.

Wayne, L.G., Microbiology of tubercle bacilli. 1982. *Am. Rev. Respir. Dis.* 125, 31-41.

Wayne, L.G., Hayes, L.G., 1996. *In vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. *Infect. Immun.* 64, 2062–2069.

Wayne, L.G., Sohaskey, C.D., 2001. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 139-163.

Wedlock, D.N., Bridget, V., Skinner, M.A., De Lisle, G.W., Orme, I.M., Buddle, B.M., 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 68, 5809–5815.

Wedlock, D.N., Keen, D.L., Aldwell, F.E., Andersen, P., Buddle, B.M., 2002. Effect of adjuvants on immune responses of cattle vaccinated with culture filtrate proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 79–88.

Wedlock, D.N., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Hecker, R., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L.A., Buddle, B.M., 2005a. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 53–63.

Wedlock, D.N., Michel, D., Margot, A., Skinner, J.K., de Lisle, G.W., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L.A., Hecker, R., Buddle, B.M., 2005b. Vaccination of cattle with a CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG induces levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. *Infect. Immun.* 73, 3540–3546

Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Buddle, B.M., 2007. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN-gamma post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 50–58.

Wells, C.D., Cegielski, J.P., Nelson, L.J., Laserson, K.F., Holtz, T.H., Finlay, A., Castro, K.G., Weyer, K., 2007. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm. *J. Infect. Dis.* 196, 86–107.

Welsh, M.D., Kennedy, H.E., Smyth, A.J., Girvin, R.M., Andersen, P., Pollock, J.M., 2002. Responses of bovine WC1+ $\gamma\delta$ T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 70, 6114–6120.

- Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101–111.
- Weynants, V., Walravens, K., Didembourg, C., Flanagan, P., Godfroid, J., Letesson, J.J., 1998. Quantitative assessment by flow cytometry of T-lymphocytes producing antigen-specific gamma-interferon in *Brucella* immune cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 309–320.
- Whelan, A.O., Clifford, D., Upadhyay, B., Breadon, E.L., McNair, J., Hewinson, G.R., Vordermeier, H.M., 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3176–3181.
- Whelan, A.O., Coad, M., Upadhyay, B.L., Clifford, D.J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2011. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitization and protective immunity in cattle. *Vaccine* 29, 5453–5458.
- Whipple, D.L., Bolin, C.A., Davis, A.J., Jarnagin, J.L., Johnson, D.C., Nabors, R.S., Payeur, J.B., Saari, D.A., Wilson, A.J., Wolf, M.M., 1995. Comparison of sensitivity of the caudal fold skin test and commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am. J. Vet. Res.* 56, 415–419.
- Whipple, D.L., Bolin, C.A., Miller, J.M., 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 351–354.
- Whipple, D.L., Palmer, M.V., Slaughter, R.E., Jones, S.L., 2001. Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 117–122.
- WHO. Report of the WHO group on zoonotic tuberculosis. 1994. (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO: World Health Organization. *Veter Public Health.* pp. 1-43.
- WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, pp. 3-27.
- Wickremasinghe, M.I., Thomas, L.H., Friedland, J.S., 1999. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network. *J. Immunol.* 163, 3936-3947.
- Wijngaard, P.L.J., MacHugh, N.D., Metzelaar, M.J., Romberg, S., Bensaid, A., Pepin, L., Davis, W.C., Clevers, H.C., 1994. Members of the novel WC1 gene family are differentially expressed on subsets of bovine CD4–CD8– $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J. Immunol.* 152, 3476–3482.
- Wilson, K., 1988. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 2.4. In F. M. Ausubel, R., Brent, R.E., Kingston, D.D., Moore, J.G., Seidman, J.A., Smith, K., Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology.* John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Wilson, R.A., Zolnai, A., Rudas, P., Frenyo, L.V., 1996. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves and adult bovine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53, 49–60.

Wolinsky, E., 1990. *Mycobacterium*. En: Davis, B., Dublecco, R., Eisen, H., Ginisber, H., editores. Tratado de microbiología. 3ra ed. México: Salvat. pp. 589-604.

Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweedle, N.F., 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68, 286–290.

Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., De Witte, K., Tolson, J., Ryan, T.J., de Lisle, G.W., Cox, J.C., Jones, S.L., 1992., A field reevaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 31, 71-79.

Wood, P.R., Rothel, J.S., 1994. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 40, 125–135.

Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. Bovigam: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81, 147–155.

Wyatt C.R., Madruga C., Cluff C., Parish S., Hamilton M.J., Goff W., Davis W.C. 1994. Differential distribution of $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40:187-199.

Yang, J.S., Kim, H.J., Ryu, Y.H., Yun, C.H., Chung, D.K., Han, S.H., 2006. Endotoxin contamination in commercially available Pokeweed mitogen contributes to the activation of murine macrophages and human dendritic cell maturation. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 309-313.

Yearsley, D., Egan, J., Costello, E., O'Reilly, P., Hewinson, R.G., 1998. An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculous cattle. *Ir. Vet. J.* 51, 303–306.

Young, J.S., Gormley, E., Wellington, E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1946–1952.

Zwilling, B.S., Kuhn, D.E., Wikoff, L., Brown, D., Lafuse, W., 1999. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.* 67, 1386–1392.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Immunology and Immunopathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetimm

Research paper

Comparison of immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *Mycobacterium bovis* antigens



Eve-Lyne Quevillon^a, Fernando Díaz^{b,*}, Laura Jaramillo^b, Ricardo Lascurain^c, José A. Gutiérrez-Pabello^a, Felipe A. Castañeda^a, Camila Arriaga^b, Rafael Pérez^d, Xochitl E. González^b

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, D.F., Mexico

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, Carretera México-Toluca, Km. 15.5, 05110, D.F., Mexico

^c Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

^d Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, C.P. 54714, Cuautitlán Izcalli, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2012

Received in revised form 24 January 2013

Accepted 26 February 2013

Keywords:

Bovine tuberculosis

Antibody

Immune cell populations

Cellular activation

Flow cytometry

Hematology

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) is a major economic problem in animal husbandry and is a public health risk in nonindustrialized countries. It is generally accepted that protection against TB is generated through cell-mediated immunity. Previous investigations have shown that WC1⁺ $\gamma\delta$, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subpopulations are important in the immune response to bTB. It is known that changes in the immune balance from a dominant T helper 1 (Th1)-type response toward a more prominent Th2 response may be observed during disease progression. In this study, we aimed to investigate immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *Mycobacterium bovis* antigens, using flow cytometry and hematological analysis. The evaluation of the T cell subpopulations revealed a decrease in CD8⁺ T cells of the seropositive and seronegative animals compared with the control animals ($p=0.0001$). Moreover, the seropositive group exhibited a lower percentage of CD8⁺ T cells than the seronegative group. The percentage of B cells was significantly increased in the seropositive group compared with the seronegative group and the control group ($p=0.0009$). No difference was observed in the percentage of WC1⁺ $\gamma\delta$ and CD4⁺ T cells among the groups. Furthermore, following 24 h of peripheral blood culture with bovine purified protein derivative (PPD), both apparently infected groups showed an increase in the levels of cellular activation compared with the control group ($p<0.0001$). The seropositive group displayed a higher level of cellular activation than the seronegative group. In both apparently infected groups, the hematological analysis showed an increase in total leukocyte ($p=0.0012$), lymphocyte ($p=0.0057$), monocyte ($p=0.0010$) and neutrophil ($p=0.0320$) counts in comparison with the healthy animals. Our results demonstrated differences in immune peripheral blood cells of tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens, probably due to different stages of bTB among the groups. The percentages of CD8⁺ T cells, B cells and the T cell activation levels may represent biomarkers for the progression of the disease. However, general characteristics shared by

Abbreviations: bTB, Bovine tuberculosis; CFPE, Culture filtrate protein extract; CMI, Cell-mediated immunity; *M. avium*, *Mycobacterium avium*; *M. bovis*, *Mycobacterium bovis*; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; PE, Phycoerythrin; SICCT, Single intradermal comparative tuberculin test; TB, Tuberculosis.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 36 18 08 00x34/60; fax: +52 55 36 18 08 05.

E-mail address: diof0009@servidor.unam.mx (F. Díaz).

both apparently infected groups as lymphocytosis and monocytosis may also be indicative of the disease. Further experiments are required to understand the variations between cellular and humoral immunities throughout the course of bTB infection. A detailed knowledge of the peripheral blood cells involved in all stages of the bTB immune response of naturally infected cattle is essential for the optimal exploitation of diagnosis and vaccination models.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB), which is caused by *Mycobacterium bovis*, represents a contagious chronic disease in cattle that is characterized by the formation of granulomatous lesions generally in the lungs and associated lymph nodes (Neill et al., 1988). bTB not only has a great economic importance in animal-related trade and production, but it is also an important public health problem because humans can be infected (Cousins, 2001). Although the direct correlation between *M. bovis* infections in cattle and human populations is not well-known, bTB is present in most developing countries in which surveillance and control activities are often inadequate or unavailable (de la Rua-Domenech, 2006).

It is generally accepted that cell-mediated immunity (CMI) is of great importance in the control of intracellular pathogens, such as *M. bovis*, involving complex interactions between macrophages and T cells, and the production of IFN- γ , which is essential to activate macrophage microbicidal pathways (Boom, 1996; Orme and Cooper, 1999). In cattle experimentally infected with *M. bovis*, CD4⁺ T cells appear to be the dominant cell subpopulation producing IFN- γ and CD8⁺ T cells have also been identified as producers of IFN- γ (Hope et al., 2000; Smyth et al., 2001). CD4⁺ T cells contribute to the inhibition of intracellular growth of bacilli, whereas CD8⁺ T cells lyse *M. bovis* infected macrophages (Liébana et al., 2000). $\delta\gamma$ T cells have been observed to be involved in the early stages of *M. bovis* infection and early lesion formation (Pollock et al., 1996; Cassidy et al., 2001), where they may play a significant role in the bacterial containment through the production of IFN- γ (Smyth et al., 2001; Kennedy et al., 2002), thereby contributing to a Th1-biased response, linking innate and adaptive immunities (Price et al., 2007). In addition, it has been shown that the Th1 cytokine IL-2 can influence the course of bTB infections. This cytokine plays a pivotal role in generating immune responses through the induction of antigen-specific T cell expansion (Ng et al., 1997; Rhodes et al., 2000a). Therefore, the CD4 Th1 cell-mediated IL-2 secretion or the T cell-mediated expression of its receptor represents important measurable parameters in bTB.

With disease progression, changes in the immune balance from a dominant Th1-type response toward a more prominent Th2 response are associated with B-cell antibody production, anergy of CMI responses (Ritacco et al., 1991; Boussiotis et al., 2000; Dlugovitzky et al., 2000) and an elevated risk of *M. bovis* shedding from the upper respiratory tract (McCorry et al., 2005). Thus, in the field, the presence of animals with high antibody levels might suggest the presence of active disease, which represents a threat to nearby animals and humans.

The aim of the present study was to investigate immune peripheral blood cells in tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens, using flow cytometry and hematological analysis. Any differences observed between the seropositive and seronegative animals would provide relevant information concerning the different stages of mycobacterial immunity and increase our understanding of the events that might occur during disease progression.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experiment plan

Holstein-Friesian females between 3 and 8 years of age (mean age 4.3 years) were used. The apparently infected animals were obtained from a herd with a recent history of infection with *M. bovis* and a bTB prevalence of 32% at the time of the study, as determined using the single intradermal comparative tuberculin test (SICTT), while the control animals were acquired from a bTB-free accredited herd. bTB positive animals were selected and grouped based on their antibody levels to *M. bovis*. Then, the peripheral immune cell populations and cellular activation were determined in each group.

2.2. Detection of IgG antibodies in serum

Serological responses were assessed by ELISA as described previously (Estrada-Chávez et al., 2001). Briefly, the plates (Nunclon, Roskilde, Denmark) were coated overnight at room temperature with 1 μ g/well of *M. avium* or *M. bovis* CFPE (PRONABIVE, Mexico City, Mexico) in 0.1 M carbonate buffer, washed with PBS containing 0.1% Tween-20 and blocked with skim milk (3.0%) for 1 h at 37 °C. The plates were washed and incubated with sera diluted in PBS (1:100). Following 1 h at 37 °C, the plates were washed and incubated for 1 h at 37 °C with the peroxidase-labeled G protein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (1:10,000). The plates were washed, the chromogenic substrate, 0.04% o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.04% hydrogen peroxide in citrate buffer, was added, and the plates were incubated at 37 °C for 5 min. The optical density values were read at 492 nm (OD_{492 nm}) in a spectrophotometer (Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA).

An analysis of the receiver operator characteristic (ROC) curve for the OD_{492 nm} cut-off point was performed from SICTT data, using Win Episcopy 2.0 software (Learning Technology Section, College of Medicine & Veterinary Medicine, The University of Edinburgh, Edinburgh,

Scotland, UK). The results showed an OD_{492 nm} cut-off point of 0.370. Therefore, the animals were considered reactive when the OD_{492 nm} was ≥ 0.370 . A high-level serum sample from a cow with disseminated lesions of bTB was used as a positive control on each plate. The negative control was obtained from a cow on a farm without a recent history of bTB; the cow tested negative for SICTT, IFN- γ and PCR (nasal secretions, lungs and lymph nodes of the respiratory tract).

2.3. SICTT

The SICTT was conducted by intradermal injection of the cattle with 0.1 ml (1 mg/ml) of bovine PPD and 0.1 ml (0.5 mg/ml) of avian PPD (PRONABIVE, Mexico City, Mexico). The skin thickness was measured before the intradermal injection and at 72 h post-injection. The results were recorded as increase in skin thickness at 72 h compared to thickness pre-injection, and a standard interpretation was applied according to the criteria of the Mexican Official Norm (NOM, 1995).

2.4. Production and measurement of IFN- γ

Heparinized blood (1.5 ml) was dispensed into three wells of 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and avian or bovine PPD (both at 20 μ g/ml) or PBS was added. The cultures were incubated for 24 h at 37 °C and the IFN- γ levels in the plasma supernatants were measured using a sandwich ELISA kit (Bovigam®, Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland) as described previously (Rothel et al., 1990). The results were interpreted according to the criteria described in the commercial kit instructions.

2.5. Simple and nested PCR

The simple PCR reaction was performed from nasal secretions in order to amplify a 372 pb segment of the MPB70 gene of the *M. tuberculosis* complex (Cousins et al., 1991), and the product was used to amplify a 208 pb fragment within the 372 pb region by a nested PCR, as described previously by Estrada-Chávez et al. (2004).

2.6. Group formation from ELISA data

The seropositive group ($n=8$) was composed of animals with an OD_{492 nm} ≥ 0.380 to a CFPE of *M. bovis*; the mean antibody level of the group was 0.618, which was significantly higher than that of the other groups ($p < 0.0001$). The seronegative group ($n=9$) was composed of animals with an OD_{492 nm} ≤ 0.352 ; the mean antibody level of the group was 0.250. The cattle in the control group ($n=10$) were negative with antibody levels ≤ 0.205 and a mean antibody level of 0.147. The antibody levels to the *M. avium* antigens were low in all groups, ensuring that the response was directed toward *M. bovis* antigens (Table 1).

2.7. SICTT, IFN- γ assays and PCR for each group

The results from the SICTT and IFN- γ responses of seropositive and seronegative groups showed positive cattle; the mean increases in skin thickness were 9 and 11 mm

Table 1

The groups obtained from the results of the ELISA assay.

Groups	ELISA (OD _{492 nm}) ^a	
	CFPE-A	CFPE-B
Seropositive		
17	0.196	0.680
928	0.267	0.805
940	0.324	0.704
351	0.130	0.478
354	0.144	0.380
355	0.106	0.641
2783	0.143	0.529
3217	0.197	0.729
Mean	0.188	0.618 ^b
Seronegative		
902	0.198	0.340
904	0.156	0.260
937	0.146	0.215
979	0.094	0.326
2402	0.148	0.177
2748	0.152	0.263
2793	0.097	0.124
2848	0.128	0.352
3245	0.098	0.193
Mean	0.135	0.250
Control		
173	0.103	0.128
176	0.104	0.129
213	0.195	0.199
214	0.138	0.205
217	0.160	0.098
218	0.099	0.105
219	0.088	0.130
238	0.139	0.175
252	0.121	0.160
954	0.103	0.144
Mean	0.125	0.147

^a Antibody response to *M. avium* or *M. bovis* culture filtrate protein extract (CFPE-A or CFPE-B respectively).

^b Statistically significant difference between the seropositive group and the other two groups ($p < 0.0001$).

for avian PPD and 33 and 35 mm for bovine PPD, respectively, while the mean values of IFN- γ levels (the OD_{450 nm} of the antigen minus the OD_{450 nm} of the medium alone) were 0.386 and 0.580 in blood stimulated with avian PPD and 1.561 and 1.161 in blood stimulated with bovine PPD, respectively. The animals of the control group were considered to be healthy, as all animals were negative for both tests according to the Mexican Official Norm (SICTT) or the assay kit instructions (IFN- γ). The PCR results showed 6/8, 5/9 and 0/10 positive animals in the seropositive, seronegative and control groups respectively (Table 2).

2.8. Flow cytometry

The lymphocyte subpopulations were evaluated as described previously (Sopp et al., 2006). Heparinized blood was obtained from animals and the red blood cells were lysed for 15 min in a lysis solution containing ammonium chloride. Cells were washed in PBS and 5×10^5 cells were resuspended in PBS containing 0.2% bovine albumin and 0.2% sodium azide. The cell suspensions were stained for 20 min at room temperature using the following mouse anti-bovine mAbs: MM1A (IgG1, CD3), IL-A11 (IgG2a, CD4),

Table 2

Summary of the SICTT and IFN- γ responses and the PCR results from cattle seropositive or seronegative for *M. bovis* antigen.

Groups	SICTT (mm) ^a		IFN- γ (OD _{450nm}) ^b		PCR ^c
	PPD-A	PPD-B	PPD-A	PPD-B	
Seropositive					
17	28	41	1.212	2.151	+
928	18	28	0.827	2.723	+
940	0	18	0.377	2.605	+
351	1	12	0.227	0.965	-
354	5	24	0.119	1.089	+
355	13	71	0.046	0.336	+
2783	3	53	0.187	1.829	-
3217	3	20	0.096	0.787	+
Mean	9	33	0.386	1.561	
Seronegative					
902	7	16	0.465	1.167	+
904	31	37	1.661	2.072	+
937	20	29	2.361	2.523	+
979	8	21	0.165	0.561	-
2402	4	23	0.158	0.885	-
2748	5	78	0.055	0.208	+
2793	8	24	0.083	0.856	-
2848	8	71	0.042	0.764	-
3245	4	12	0.233	1.412	+
Mean	11	35	0.580	1.161	
Control					
173	0	0	0.048	0.015	-
176	0	0	0.001	-0.013	-
213	0	0	0.017	0.002	-
214	0	0	0.000	-0.004	-
217	0	0	0.080	0.028	-
218	0	0	0.014	-0.002	-
219	0	0	0.032	0.019	-
238	0	0	0.023	0.012	-
252	0	0	0.011	-0.003	-
954	0	0	0.048	0.045	-
Mean	0 ^d	0 ^d	0.027 ^d	0.010 ^d	

^a Increases in skin thickness (thickness at 72 h minus thickness at 0 h).

^b Values represent the OD_{450nm} of the antigen minus the OD_{450nm} of the medium alone.

^c Nested PCR results using the MPB70 gene.

^d Statistically significant difference between the control group and the other two groups ($p < 0.05$).

CACT108A (IgG2a, CD25), BAQ44A (IgM, B lymphocytes), from VMRD INC (Pullman, WA, USA) and MCA837G (IgG2a, CD8), MCA838G (IgG2a, WC1) from AbD Serotec (Kidlington, Oxford, UK). The cells were washed and incubated with a FITC-conjugated anti-mouse IgG1 or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse IgG2a immunoglobulin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, Pa, USA) for 20 min at room temperature in the dark. The cells were washed and assayed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, USA). A total of 10,000 events were acquired for subsequent analysis. The data were analyzed using FlowJo 7.6.1 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). The percentage of positively stained cells was determined with reference to the control cells for which the primary mAb had been omitted. For the determination of cellular activation, whole blood samples were incubated for 24 h at 37 °C with PBS or bovine PPD (20 μ g/ml) in 24-well plates (Smyth et al., 2001). Primary labeling was performed with CD3 and CD25

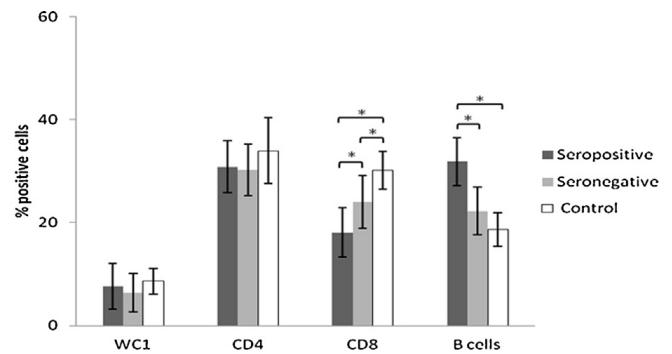


Fig. 1. Proportions of WC1⁺, CD4⁺, CD8⁺ T cells and B cells within the total lymphocyte-gated population, as determined using flow-cytometry analysis of whole-blood samples from cattle seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens. Each bar represents the group mean \pm SD of the group. * Statistically significant difference ($p < 0.05$).

mAbs, followed by the detection with FITC and PE conjugates.

2.9. Leukocyte cell population subset counts

Total leukocytes were counted, in EDTA blood samples, by using an automatic cell counter (Mindray, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China).

2.10. Statistical analyses

Significant differences between groups for antibody, IFN- γ responses, SICTT data and leukocyte counts were determined through Kruskal-Wallis analysis followed by the Dunn test. The T cell subpopulations and cellular activation were evaluated through one-way analysis of variance followed by the Tukey-Kramer HSD test, using the JMP 5.0.1 software for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A probability of $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. The seropositive group contains less CD8⁺ T cells and more B cells

The lymphocyte subsets (WC1⁺, CD4⁺, CD8⁺ and B cells) of the different groups were investigated using flow cytometry (Fig. 1). No difference was observed in the percentage of WC1⁺ $\gamma\delta$ and CD4⁺ T cells among the three groups ($p = 0.4708$ and $p = 0.0595$, respectively). Nevertheless, the CD8⁺ T cells were significantly decreased ($p = 0.0001$) in the seropositive and seronegative groups, exhibiting $18.08 \pm 4.79\%$ and $24.04 \pm 5.16\%$ CD8⁺ T cells respectively, compared with $30.19 \pm 3.65\%$ in the control group. In addition, the proportion of CD8⁺ T cells was significantly decreased in the seropositive group compared with the seronegative group. The percentage of B cells was significantly increased ($p = 0.0009$) in the seropositive group (31.86 ± 4.69) compared with the seronegative group (22.28 ± 4.67) and the control group (18.68 ± 3.31).

Table 3Mean leukocyte cell population subset counts in cattle seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens.

Groups	Leukocytes ($\times 10^9/L$)	Lymphocytes	Monocytes	Neutrophils
Seropositive	14.04 \pm 2.80	8.71 \pm 1.25	1.08 \pm 0.53	4.02 \pm 1.34
Seronegative	13.56 \pm 4.39	7.67 \pm 2.52	1.14 \pm 0.41	4.04 \pm 1.91
Control	7.63 \pm 1.89 ^a	4.84 \pm 1.92 ^a	0.14 \pm 0.12 ^a	2.06 \pm 0.55 ^a

^a Statistically significant difference between the control group and the other two groups ($p < 0.05$). The results are group mean \pm SD of the group.

3.2. The seropositive group contains more activated T cells following antigen stimulation

No significant difference was observed ($p = 0.7456$) in the activation of T cells among the three groups in the cultures containing PBS (Fig. 2). However, the levels of activation were significantly higher ($p < 0.0001$) in the seropositive and seronegative groups with $30.07 \pm 4.10\%$ and $24.48 \pm 1.28\%$ respectively, compared with the control group with $17.14 \pm 1.42\%$ in response to PPD. Moreover, the proportion of $CD3^+/CD25^+$ T cells was significantly increased in the seropositive group compared with the seronegative group.

3.3. The seropositive and seronegative groups contain similar leukocyte cell population numbers

To assess potential difference in leukocyte composition between the groups, whole blood samples were subjected to hematological analysis (Table 3). A significant difference was observed in the leukocyte counts between both apparently infected groups and the control group ($p = 0.0012$). The altered leukocyte composition was due to increases in the mean number of lymphocytes ($p = 0.0057$), monocytes ($p = 0.0010$) and neutrophils ($p = 0.0320$) of seropositive and seronegative groups relative to the control group. No difference was observed in eosinophil ($p = 0.0898$) and basophil ($p = 0.5738$) counts (data not shown).

The results indicated that the animals apparently tuberculous that are seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens exhibited in the peripheral blood a decrease in $CD8^+$ T cells and increases in cellular activation levels in response to PPD, total leukocyte, lymphocyte, monocyte

and neutrophil counts. However, the seropositive animals showed a greater decrease in $CD8^+$ T cells and a greater increase of cellular activation. In addition, although the CMI was active, animals with a high humoral immunity exhibited an increase in the number of B cells, as expected.

4. Discussion

In the present study, we used a natural host challenge model of bTB to evaluate the immune peripheral blood cells in apparently infected cattle that are seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens. Significant differences were detected between the groups.

In bTB infections, circulating $WC1^+ \gamma\delta$, $CD4^+$ Th1 and cytotoxic $CD8^+$ T cell subpopulations are involved, while the role of B-cells during is not clear and their participation needs further study. Firstly, the $WC1^+ \gamma\delta$ T cells decreased and then increased, suggesting localization to developing lesions and clonal expansion. Secondly, the $CD4/CD8$ ratio increased. Thirdly, the $CD4/CD8$ ratio decreased to less than pre-infection measurements. The latter changes suggested sequential involvement of $CD4^+$ and then $CD8^+$ T cells (Pollock et al., 1996).

In a previous study, it was observed that the percentages of peripheral blood $CD4^+$ T cells in water buffalo positive for the bTB single intradermal test were reduced, while the $CD8^+$ and $\gamma\delta$ T cells were increased compared with negative animals, although the increase in $WC1^+ \gamma\delta$ T cells was not statistically significant since the individual variations were very high (Dhinakar et al., 2007). Our data differ from these results as no difference was observed in $CD4^+$ T cells among the groups, while the $CD8^+$ T cells were decreased in both apparently infected groups. Since a comparative study of the immune responses induced after infection of cattle with *M. bovis* has suggested that the proliferative responses toward *M. bovis* antigens in the blood are equivalent to those in the site of active disease (Rhodes et al., 2000b), it is tempting to compare the immune response in peripheral blood shown in this study with the site of disease. Therefore, a study have demonstrated that in *M. bovis* infected calves, $CD4^+$ T cell numbers in lymph node granulomas remained constant over time and that the number of $CD8^+$ and $WC1^+ \gamma\delta$ T cells was diminished in matured granulomas (Palmer et al., 2007), similar to what we found in peripheral blood for $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. The authors suggested that the loss of T cell subsets during late stages correlates with a failure of the immune system to control the infection. Moreover, it has been reported that TB in goats caused by *M. caprae* induced changes in cellular populations comparable to those described for *M. bovis* in cattle and a study showed no significant difference between naturally infected and non-infected goats in the percentages

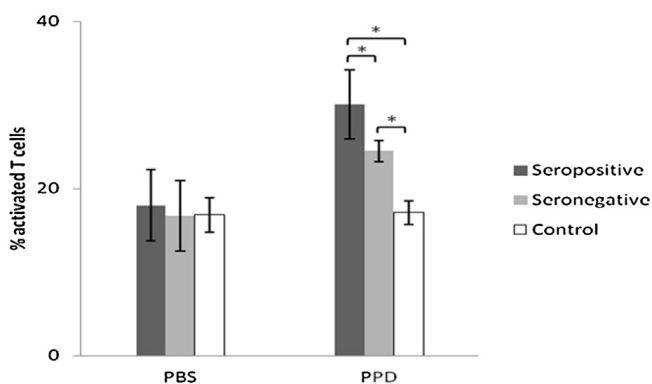


Fig. 2. Proportions of activated cells ($CD3^+/CD25^+$) within the total lymphocyte-gated population, as determined using flow-cytometry analysis of whole blood samples from cattle seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens following 24 h of culture with PBS or PPD. Each bar represents the group mean \pm SD of the group. * Significant difference ($p < 0.0001$).

of CD4⁺ T cells and a higher percentage of CD8⁺ T cells was observed in healthy compared to infected goats (Bezous et al., 2012), supporting our results. In human, studies of peripheral blood T-cell subsets in TB cases have obtained different results. In some studies, the percentages of CD4⁺ T cells were decreased, while the percentages of CD8⁺ T cells were unchanged compared with controls (Ashtekar et al., 1993; Carvalho et al., 2002). However, other studies showed that CD4⁺ T cells are reduced while CD8⁺ T cells are increased (Tsao et al., 2002; Pessarar et al., 2005). Other works have shown a decrease in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Jones et al., 1997; Rodrigues et al., 2002), while Shijubo et al. (1992) found only CD8⁺ T cells to be significantly decreased; the other T-cell subsets were normal. Variations between studies suggest diverse stages of the disease; nevertheless, all studies mentioned an alteration in the CMI response. The activity of the peripheral T cells exhibit the nature of the immune response and the results of our study confirm an alteration in CMI during bTB, as the percentages of CD8⁺ T cells are decreased. Thus, we suggest a failure of the host response to control the infection and advanced stages of the disease in both apparently infected groups.

The majority of cattle infected with *M. bovis* develop a delayed-type hypersensitivity response, which is manifested as a positive response to intradermal injection with PPD, which normally correlates with the *in vitro* IFN- γ blood test. Unfortunately, a proportion of cattle with advanced and generalized infection fail to develop an *in vivo* or *in vitro* responsiveness to PPD (so-called anergic animals), giving false negative despite being infected with bTB (Welsh et al., 2005; Pollock et al., 2005). Animals with such disease stage are recognized as having a high antibody titer (Lightbody et al., 1998; Lyashchenko et al., 2004), which can be detected by serological assays (Plackett et al., 1989; Yearsley et al., 1998; de la Rua-Domenech et al., 2006). Importantly, anergic animals are thought to be highly infective (Pollock et al., 2005). In the present study, the exact time of infection of the animals was not known. However, the higher decrease observed in the percentage of CD8⁺ T cells of the seropositive group compared to the seronegative group, along with a greater percentage of B cells and circulating antibodies could be ascribed to the different immunological status that parallel the evolution of the natural infection. These results suggest an imminent shifting from the CMI response toward an humoral response and a more advanced stage of the disease in this group. The sacrifice of the animals would have confirmed this supposition; however, animal sacrifice could not be performed, due to establishment constraints, and might be envisaged for future studies.

In cattle, the proportion of activated cells (CD25⁺) *in vivo* increases 30 days after *M. bovis* infection (Pollock et al., 1996), and it has been shown that the three subpopulations of T cells activate and upregulate the CD25 molecule, which represents the IL-2 receptor alpha chain (Smyth et al., 2001; Kennedy et al., 2002). Moreover, following culture with *M. bovis* antigens, an increase of the expression of CD25 has been detected in WC1⁺ $\gamma\delta$, CD4⁺ and CD8⁺ T cells of infected cattle (Smyth et al., 2001; Maue et al., 2005; Blanco et al., 2011).

In the present investigation, the cellular activation in circulating total T cells was evaluated following 24 h of culture with PBS or PPD. No significant difference was observed among the three groups after 24 h of culture with PBS; all groups had approximately 17% activated T cells. The activation of T cells in the absence of antigen has been reported in both infected and uninfected cattle (Smyth et al., 2001). In addition, it has been shown that the WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells constitutively express CD25 (Collins et al., 1996).

However, following culture with PPD, distinct levels of T cell activation were observed; there was an increase of the levels of activation in both apparently infected groups, unlike the control group, indicating the specificity of the response to *M. bovis* antigens. The cellular activation of total T cells induced by *M. bovis* antigens demonstrates their role in anti-mycobacterial immunity. In addition, a significant difference was observed between the seropositive and seronegative groups, indicating a greater number of *M. bovis*-specific T cells in circulation in the seropositive group, probably due to the more prolonged time of the infection. Blanco et al. (2011) determined whether the cellular activation was related with the pathology during early *M. bovis* infection and values of T cell activation were divided into two groups based on the presence or the absence of pathology in the infected animals. At 15 days post-infection, the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells after PPD stimulation from the group with macroscopic lesions was significantly greater than that of the group without macroscopic lesions. At 60 and 90 days post-infection, the activation of all T cell subsets was consistently superior in the group with macroscopic lesions; however, these differences were not statistically significant. Similarly, the absolute number of CD25⁺ T cells was superior in the group with macroscopic lesion. They concluded that CD4⁺ and CD8⁺ T cells activation during the early stages of infection was positively associated with pathology. In the present study, we observed similar results, as the seropositive group, probably with a more advanced disease, shows a higher T cell activation than the seronegative group, suggesting a positive correlation with the degree of the disease.

bTB affects hematological parameters. However, it has been reported that the results can vary with the stage and progress of the disease (Lepper et al., 1977), and leukocytosis, leukopenia, lymphocytosis, lymphopenia, neutrophilia and monocytosis can occur (Kumar et al., 1994). According to Samad and Rahman (1986), total leukocyte and lymphocyte counts significantly increased, while neutrophils decreased in positive reactors. Another study has shown that infected cattle displayed an increase in the proportion of lymphocytes, accompanied by a decrease in the proportion of monocytes (Killick et al., 2011). Shettar et al. (2011) observed an increase in monocyte and eosinophil number values and a decrease in neutrophil counts in reactor cattle, while Javed et al. (2010) have shown a higher lymphocyte percentage and a lower value of neutrophils in reactor cattle.

The leukocyte formula of healthy female Holstein cattle in various stages of lactation and pregnancy from over two years to ten years of age consists of $3.8\text{--}11.0 \times 10^9/\text{L}$ of leukocytes, $1.0\text{--}5.8 \times 10^9/\text{L}$ of lymphocytes, $0.0\text{--}0.9 \times 10^9/\text{L}$ of monocytes and $0.7\text{--}4.9 \times 10^9/\text{L}$ of neutrophils (Lumsden

et al., 1980). In the present study marked differences were found in apparently infected groups. The altered leukocyte count was due to an increase in lymphocytes, monocytes and neutrophils of both groups compared with the healthy group. However, the neutrophils values were within the normal reference intervals for healthy female Holstein cattle. It has been observed that the animals with discrete lesions may not indicate any change in the blood picture though it may elicit a positive tuberculin reaction, while in advanced cases a slight neutrophilic reaction may be observed (Samad and Rahman, 1986), supporting our results. Leukocytosis (monocytosis and lymphocytosis) have developed in both apparently infected groups of the present study. Lymphocytosis represents a common response to antigenic stimulation and both monocytosis and lymphocytosis may develop in chronic diseases (Duncan and Prasse, 1986). Moreover, it has been observed that monocytosis was a common picture observed in blood samples of tubercular cattle (Kumar et al., 1994); whereas no significant difference was observed in monocyte percentage between reactors and non-reactors (Samad and Rahman, 1986). Hence monocytosis can be regarded as an evidence of active extension of tuberculous process (Shettar et al., 2011), supporting an advanced stage of the disease of both apparently infected groups. The presence of humoral immunity (seropositive group), attributable to more advanced stages of bTB did not affect the leukocyte composition. Despite the influx of lymphocytes and monocytes, the inability of infected cattle to eliminate *M. bovis* suggests a failure of the host immune response to control the infection.

5. Conclusion

In conclusion, the results from this study demonstrated differences in immune peripheral blood cells of tuberculin reactor cattle that are seropositive or seronegative for *M. bovis* antigens, probably due to different stages of bTB among the groups. The percentage of CD8⁺ T cells, B cells and the T cell activation levels may represent biomarkers for the progression of the disease. However, general characteristic shared by both apparently infected groups as lymphocytosis and monocytosis may also be indicative of the disease. Further experiments are required to understand the variations between cellular and humoral immunities throughout the course of bTB infection. A number of studies have determined the contribution of Th1 and Th2 responses to the protective immunity and pathology of *M. bovis* infection. However, much of that information is derived from experimentally infected cattle and few data from naturally infected animals are available. A detailed knowledge of the peripheral blood cells involved in all stages of the bTB immune response of naturally infected cattle is essential for the optimal exploitation of diagnosis and vaccination models.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank PRONAVIBE and the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FES-Cuautitlán) of the UNAM for providing the facilities to conduct this research.

References

- Ashtekar, M.D., Samuel, A.M., Kadival, G.V., Sakhalkar, V., Rajadhyaksha, S., Viridi, S.S., 1993. T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.* 97, 14–17.
- Bezos, J., Álvarez, J., Moreno, I., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Domínguez, M., Toraño, A., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2012. Study of peripheral blood cell populations involved in the immune response of goats naturally infected with *Mycobacterium caprae*. *Res. Vet. Sci.* 98, 163–167.
- Blanco, F.C., Bianco, M.V., Meikle, V., Garbaccio, S., Vagnoni, L., Forrellad, M., Klepp, L.I., Cataldi, A.A., Bigi, F., 2011. Increased IL-17 expression is associated with pathology in a bovine model of tuberculosis. *Tuberculosis* 91, 57–63.
- Boom, W.H., 1996. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Agents Dis.* 5, 73–81.
- Boussiotis, V.A., Tsai, E.Y., Yunis, E.J., Thim, S., Delgado, J.C., Dascher, C.C., Berezovskaya, A., Rousset, D., Reynes, J.M., Goldfeld, A.E., 2000. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J. Clin. Invest.* 105, 1317–1325.
- Carvalho, A.C., Matteelli, A., Airò, P., Tedoldi, S., Casalini, C., Imberti, L., Cadeo, G.P., Beltrame, A., Carosi, G., 2002. gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with tuberculosis with and without HIV co-infection. *Thorax* 57, 357–360.
- Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Gutiérrez Cancela, M.M., Forster, F., Pollock, J.M., Neill, S.D., 2001. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesions. *J. Comp. Pathol.* 124, 46–51.
- Collins, R.A., Sopp, P., Gelder, K.I., Morrison, W.I., Howard, C.J., 1996. Bovine $\gamma\delta$ TcR⁺ T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. *Scand. J. Immunol.* 44, 444–452.
- Cousins, D.V., Wilton, S.D., Francis, B.R., 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 27, 187–195.
- Cousins, D.V., 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech.* 20, 71–85.
- de la Rua-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and a review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86, 77–109.
- Dhinakar, R.G., Mathivanan, B., Matheswaran, K., Nachimuthu, K., Davis, W.C., 2007. Lymphocyte subset distribution in apparently normal and single intradermal test-positive water buffaloes analyzed by flow cytometry. *Res. Vet. Sci.* 82, 34–38.
- Dlugovitzky, D., Bay, M.L., Rateni, L., Fiorenza, G., Vietti, L., Farroni, M.A., Bottasso, O.A., 2000. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin. Exp. Immunol.* 122, 343–349.
- Duncan, J.R., Prasse, K.W., 1986. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. State University Press, 44–57, 229–233 pp.
- Estrada-Chávez, C., Mancilla, R., Arriaga, D.C., Pérez, G.R., Díaz, O.F., 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet. Mex* 32, 207–211.
- Estrada-Chávez, C., Díaz, O.F., Arriaga, D.C., Villegas-Sepúlveda, N., Pérez, G.R., González, S.D., 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex* 35, 225–236.
- Hope, J.C., Kwong, L.S., Sopp, P., Collins, R.A., Howard, C.J., 2000. Dendritic cells induce CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and *M. avium* antigens in Bacille Calmette Guérin vaccinated and nonvaccinated cattle. *Scand. J. Immunol.* 52, 285–291.
- Javed, M.T., Ahmad, L., Irfan, M., Ali, I., Khan, A., Wasiq, M., Farooqi, F.A., Shahid, A.L., Cagiola, M., 2010. Haematological and serum protein values in tuberculin reactor and non-reactor water buffaloes, cattle, sheep and goats. *Pak. Vet. J.* 30, 100–104.
- Jones, B.E., Oo, M.M., Taikwel, E.K., Qian, D., Kumar, A., Maslow, E.R., Barnes, P.F., 1997. CD4 cell counts in human immunodeficiency virus-negative patients with tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 24, 988–991.

- Kennedy, H.E., Welsh, M.D., Bryson, D.G., Cassidy, J.P., Forster, F.I., Howard, C.J., Collins, R.A., Pollock, J.M., 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells. *Infect. Immun.* 70, 1488–1500.
- Killick, K.E., Browne, J.A., De Park, S., Magee, D.A., Martin, I., Meade, K.G., Gordon, S.V., Gormley, E., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D.E., 2011. Genome-wide transcriptional profiling of peripheral blood leukocytes from cattle infected with *Mycobacterium bovis* reveals suppression of host immune genes. *BMC Genomics* 12, 611.
- Kumar, G.S., Iyer, P.K.R., Prasad, M.C., Sharma, A.K., Sharma, A.K., 1994. Tuberculosis in cattle: Haematobiochemical studies. *Indian J. Vet. Pathol.* 18, 38–42.
- Lepper, A.W., Comer, L.A., Pearson, C.W., 1977. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 53, 301–305.
- Liébana, E., Aranaz, A., Aldwell, F.E., McNair, J., Neill, S.D., Smyth, A.J., Pollock, J.M., 2000. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology* 99, 23–29.
- Lightbody, K.A., Skuce, R.A., Neill, S.D., Pollock, J.M., 1998. Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. *Vet. Rec.* 142, 295–300.
- Lumsden, J.H., Mullen, K., Rowe, R., 1980. Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. *Can. J. Comp. Med.* 44, 24–31.
- Lyashchenko, K., Whelan, A.O., Greenwald, R., Pollock, J.M., Andersen, P., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2004. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immun.* 72, 2462–2467.
- Maue, A.C., Waters, W.R., Davis, W.C., Palmer, M.V., Minion, F.C., Estes, D.M., 2005. Analysis of immune responses directed toward a recombinant early secretory antigenic target six-kilodalton protein-culture filtrate protein 10 fusion protein in *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Infect. Immun.* 73, 6659–6667.
- McCorry, T., Whelan, A.O., Welsh, M.D., McNair, J., Walton, E., Bryson, D.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Pollock, J.M., 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec.* 157, 613–618.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J., McCracken, R.M., 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet. Rec.* 122, 184–186.
- Ng, K.H., Aldwell, F.E., Wedlock, D.N., Watson, J.D., Buddle, B.M., 1997. Antigen-induced interferon- γ and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 57, 59–68.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=2189>
- Orme, I.M., Cooper, A.M., 1999. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol. Today* 20, 307–312.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C., 2007. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Pathol.* 44, 863–874.
- Pessarar, Z., SahebFosul, F., Oreizi, F., Ghavaminejad, A., Kiani, A., Siadat, Z.D., 2005. Immunophenotypic characterization of peripheral blood T-lymphocytes and their subpopulations in tuberculosis patients before and after treatments. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 4, 23–26.
- Plackett, P., Ripper, J., Corner, L.A., Small, K., de Witte, K., Melville, L., Hides, S., Wood, P.R., 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust. Vet. J.* 66, 15–19.
- Pollock, J.M., Pollock, D.A., Campbell, D.G., Girvin, R.M., Crockard, A.D., Neill, S.D., Mackie, D.P., 1996. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 87, 236–241.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D., McNair, J., 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 37–43.
- Price, S.J., Sopp, P., Howard, C.J., Hope, J.C., 2007. Workshop cluster 1⁺ $\gamma\delta$ T-cell receptor⁺ T cells from calves express high levels of interferon- γ in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunology* 120, 57–65.
- Rhodes, S.G., Gavier-widen, D., Buddle, B.M., Whelan, A.O., Singh, M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000a. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 68, 2573–2578.
- Rhodes, S.G., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2000b. Bovine tuberculosis: immune responses in the peripheral blood and at the site of active disease. *Immunology* 99, 195–202.
- Ritacco, V., Lopez, B., Dekantor, I.N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A., 1991. Reciprocal cellular and humoral immune-responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50, 365–367.
- Rodrigues, D.S., Medeiros, E.A., Weckx, L.Y., Bonnez, W., Salomao, R., Kallas, E.G., 2002. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Clin. Exp. Immunol.* 128, 149–154.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 67, 134–137.
- Samad, M.A., Rahman, M.S., 1986. Incidence of bovine tuberculosis and its effect on certain blood indices in dairy cattle of Bangladesh. *Indian J. Dairy Sci.* 39, 3231–3234.
- Shettar, M., Nalini, T.S., Kumar, K.R.A., Ravikumar, P., Azeemulla, H.R., 2011. Hematological and biochemical studies in tuberculin test positive reactors. *Int. J. Pharmacol. Biol. Sci.* 2, 16–22.
- Shijubo, N., Nakanishi, F., Hirasawa, M., Sigehara, K., Sasaki, H., Asakawa, M., Suzuki, A., 1992. Phenotypic analysis in peripheral blood lymphocytes of patients with pulmonary tuberculosis. *Kekkaku* 67, 581–585 (in Japanese).
- Smyth, A.J., Welsh, M.D., Girvin, R.M., Pollock, J.M., 2001. *In vitro* responsiveness of $\gamma\delta$ T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: predominant involvement of WC1⁺ cells. *Infect. Immun.* 69, 89–96.
- Sopp, P., Howard, C.J., Hope, J.C., 2006. Flow cytometric detection of gamma interferon can effectively discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated cattle from *M. bovis*-infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 1343–1348.
- Tsao, T.C., Chen, C.H., Hong, J.H., Hsieh, M.J., Tsao, K.C., Lee, C.H., 2002. Shifts of T4/T8 lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 122, 1285–1291.
- Welsh, D.M., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101–111.
- Yearsley, D., Egan, J., Costello, E., O'Reilly, P., Hewinson, R.G., 1998. An evaluation of an anamnestic ELISA for the detection of tuberculous cattle. *Irish Vet. J.* 51, 303–306.