



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

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

**“ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO DE LIBERACIÓN DE
INTERFERÓN-GAMMA MULTIANTIGÉNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS BOVINA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ROMINA ALEJANDRA ORTEGA ARMENTA

TUTOR:

FERNANDO DÍAZ OTERO (INIFAP CENID-MA.)

COMITÉ TUTORAL:

JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA (FMVZ-UNAM)

RICARDO LASCURAIN LEDESMA (FM-UNAM)

México, D.F. Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi abuelita, por ser la gran y hermosa mujer que eres, gracias por estar conmigo y decirme siempre las palabras precisas que necesito escuchar. Por ser mi inspiración y ejemplo, por darme grandes lecciones de vida e inolvidables momentos de alegría. Por el inmenso amor que tienes guardado para mi en ese gran corazón. Gracias por todo abue, te adoro.

Con mucho cariño, a mis papas que han caminado junto conmigo y que con paciencia y amor me han apoyado y motivado a seguir adelante para llegar a tan anhelada meta.

A mi hermana que siempre ha sabido hacerme sonreír, gracias por cuidarme, escucharme y abrazarme cuando te necesito.

A mis tíos, gracias por todos sus consejos y apoyo incondicional que me han brindado siempre.

¡¡Mira abuelito+... lo logré!!

“Porque los planes no dejaran de ser sueños hasta que los realizas”

Agradecimientos

A la UNAM y a la FMVZ por haberme formado como profesionista.

A CONACYT por la beca otorgada.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi asesor, el Dr. Fernando Díaz Otero y a la Dra. Laura Jaramillo Meza por haberme dado la oportunidad y confianza para el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias por toda la ayuda y las facilidades que me brindaron, y por haberme compartido sus conocimientos.

A mi comité tutorial, el Dr Ricardo Lascurain Ledesma y al Dr José Juan Martínez Maya, por sus observaciones y sugerencias que enriquecieron el proyecto durante su desarrollo, pero sobre todo, muchas gracias por toda su paciencia y disponibilidad.

Al MVZ Heber Martínez por su colaboración en el muestreo y trabajo de campo.

A mi jurado, el Dr Edgar Zenteno Galindo, Dra Beatriz Arellano Reynoso, Dr Miguel Quiroz Martínez, Dr Francisco Morales Álvarez por sus valiosas observaciones y aportaciones que ayudaron a concretar esta tesis.

Al Dr. James Horton por la revisión de la literatura en inglés.

A la Dra. Martha Torres Rojas por permitir el uso del lector automático del ELISpot y a la QFB María de Jesús Ramírez Lira por la asesoría técnica en el manejo del equipo.

A los productores y encargados del establo por permitir el muestreo de los animales, y a todas las vaquitas que participaron y formaron parte del estudio.

A todas las personas que me escucharon y alentaron a seguir adelante.

LA INVESTIGACIÓN SE EFECTUÓ EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIA EN MICROBIOLOGÍA ANIMAL (CENID-MICROBIOLOGÍA) DEL INIFAP, COMO PARTE DE LAS INVESTIGACIONES DEL PROYECTO:

“IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA MULTIANTIGÉNICO Y UN DOT-ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA”.



FINANCIADO POR FONDOS FISCALES 2013.

PROYECTO N° 1345313

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Situación actual de la tuberculosis bovina.....	2
1.1. La tuberculosis zoonótica	2
2. Generalidades de la tuberculosis bovina.....	4
2.1. Agente etiológico.....	4
2.2. Hospedero	5
2.3. Vía de excreción.....	5
2.4. Vía de entrada	5
2.5. Dosis infectiva	6
2.6. Factores de riesgo	6
2.7. Patogenia y respuesta inmune	6
1.9.1. Interacción, micobacteria-hospedero	7
1.9.2. Respuesta inmunológica.....	8
1.10. Signos clínicos	10
3. Diagnóstico de la tuberculosis bovina	10
3.1. Prueba de tuberculina.....	11
3.2. Ensayos de liberación de interferón gamma.....	14
3.2.1. Ensayo para determinar IFN- γ	15
3.2.2. Ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot)	17
3.3. Principales antígenos de <i>M. bovis</i> utilizados en el diagnóstico de la TBb	19
4. Planteamiento del problema	20
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	21
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5	22
2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	23

3. Separación del extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5 por isoelectroenfoque	23
4. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)	24
5. Población de estudio	24
6. Prueba cervical comparativa	25
7. Prueba de IFN- γ	25
8. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	26
9. Ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot).....	27
10. Análisis de los resultados	29
VII. RESULTADOS	30
1. Obtención de las fracciones del extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5 por isoelectroenfoque en fase líquida.	30
2. Animales de estudio y criterios de selección	32
3. Estandarización del ELISpot BoIFN- γ	33
4. Determinación del IFN- γ en respuesta al extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> , a las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque en fase líquida, al PPD _b y al ESAT-6. 37	
VIII. DISCUSIÓN	44
IX. CONCLUSIÓN	47
X. PERSPECTIVAS.....	47
REFERENCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Envoltura celular micobacterina	4
Fig. 2: Perspectiva de la infección y el ciclo de vida de <i>M. bovis</i>	7
Fig. 3: Respuesta inmune durante la infección micobacteriana.	9
Fig. 4: Pruebas diagnósticas para TBb <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	11
Fig. 5: Pasos para realizar la prueba cervical comparativa.....	13
Fig. 6: Esquema del ELISpot	19
Fig. 7: Diagrama del ensayo de IFN- γ y del ELISpot para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	28
Fig. 8: Concentración de proteína de las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5	30
Fig. 9: Determinación de la concentración de células mononucleares de sangre periférica y anticuerpo de captura para la prueba de ELISpot BoIFN- γ	35
Fig. 10: Determinación de la concentración de células mononucleares de sangre periférica y del anticuerpo de captura anti IFN- γ para el ELISpot BoIFN- γ	36
Fig. 11: Comparación del IFN- γ producido en respuesta al estímulo con PPD _b , ESAT-6, el extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de <i>M. bovis</i> AN5 y las fracciones obtenidas por la separación del EPFC por isoelectroenfoque	38
Fig. 12: Evaluación de la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica productoras de IFN- γ frente al estímulo con PPD, y las fracciones del extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5.....	40
Fig. 13: Comparación del total de células productoras de IFN- γ obtenidos con los diferentes antígenos en bovinos infectados y no infectados.....	41
Fig. 14: Gráfico de curva ROC para determinar si el PPD y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5 que discriminan bovinos infectados y no infectados.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad de la tuberculina	14
Tabla 2: Comparación de ELISpot y Ensayo IFN- γ	15
Tabla 3: Tuberculina vs ensayo IFN- γ	17
Tabla 4: Punto Isoeléctrico y peso molecular de las proteínas presentes en las fracciones obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5.	32
Tabla 5: Resultados de las prueba cervical comparativa y del ensayo de IFN- γ	33
Tabla 6: Área bajo la curva. Evaluación del PPD _b y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5.....	43
Tabla 7: Determinación de la sensibilidad y especificidad del ELISpot el PPD _b y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> AN5.....	43

ABREVIATURAS

ABC:	Área bajo la curva
Ag:	Antígeno
BAAR:	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG:	Bacilo Calmette-Guérin
BCIP/NBT:	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato/nitrozol de tetrazolio (5-bromo-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium)
BSA:	Albúmina sérica bovina (bovine serum albumin)
CFP-10:	Antígeno de 10 kDa del filtrado de cultivo (10 kDa culture filtrate antigen)
DC:	Células dendríticas (Dendritic cells)
DO:	Densidad óptica
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático por adsorción (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ELISpot:	Ensayo inmunoenzimático de puntos (Enzyme-Linked ImmunoSpot assay)
EPFC:	Extracto proteico de filtrado de cultivo
ESAT-6:	Antígeno de 6 kDa de secreción temprana (6kDa early secreted antigenic)
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
IEF:	Isoelectroenfoque (Isoelectric focusing)
IFN- γ :	Interferón gamma
IGRAs:	Ensayos de liberación de interferón gamma (Interferon-gamma Release Assays)
IL-1:	Interleucina 1
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible (Inducible Nitric Oxide Synthase)
LAM:	Lipoarabinomananos
M:	Molar
mAb:	Anticuerpos monoclonales (Monoclonal antibodies)
MHC:	Complejo principal de histocompatibilidad (Major histocompatibility complex)
MTC:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex)
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organisation for Animal Health)

OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns)
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral blood mononuclear cells)
PBS:	Solución salina amortiguadora de fosfatos (Phosphate buffer solution)
PBST:	Solución salina amortiguadora de fosfatos con Tween
PPC:	Prueba en pliegue caudal
PCC:	Prueba cervical comparativa
PCS:	Prueba cervical simple
PPD:	Derivado proteico purificado (Purified protein derivative)
PPDa:	Derivado proteico purificado aviar (Aviar purified protein derivative)
PPDb:	Derivado proteico purificado bovino (Bovine purified protein derivative)
PRRs:	Receptores Relacionados a Patógenos (Pattern recognition receptor)
PT:	Prueba de tuberculina
PVDF:	Polivinildifluoruro
PWM:	Mitógeno Pokeweed (Pokeweed mitogen)
RD1:	Región de diferenciación 1
ROC:	Curva operativa característica del receptor (Receiver operating characteristic curve)
Se:	Sensibilidad
SFC:	Células formadora de puntos (Spots forming cell)
SIDA:	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Sp-A:	Proteína A surfactante (Surfactant protein A)
Sp:	Especificidad (Specificity)
TB:	Tuberculosis
TBb:	Tuberculosis bovina
TBh:	Tuberculosis en humanos
TNF- α :	Factor alfa de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor alpha)

RESUMEN

El ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot) permite contabilizar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) productoras de IFN- γ estimuladas con antígenos micobacterianos. El ELISpot ha sido utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos, pero faltan estudios para validar su uso en bovinos. El propósito del estudio fue estandarizar el ensayo ELISpot para IFN- γ bovino (ELISpot BoIFN- γ) y evaluar su utilidad en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Se consideró la concentración del anticuerpo de captura y de las PBMC. Asimismo, se analizaron diferentes antígenos PPD_b, el ESAT-6 y el extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 (EPFC). Este último se separó por isoelectroenfoque (IEF) en fase líquida para obtener 19 fracciones en un rango de pH de 3 a 12. Las condiciones óptimas para ELISpot fueron 5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de captura con 3×10^5 de PBMC por pozo. El PPD_b y las fracciones con pI de 3 (F1), 5.5 (F6) y 10 (F15) del EPFC mostraron mayor respuesta ($p < 0.05$) en los animales infectados. La sensibilidad y especificidad que se determinó para ELISpot con el PPD_b y las fracciones 1, 6 y 15 del EPFC fueron de 61 % y 78 %, 57 % y 83 %, 52 % y 61 %, 60 % y 52 % respectivamente. Las fracciones ácidas (F1-F9) obtenidas a partir de la separación por IEF estimulan la producción IFN- γ en animales infectados ($p < 0.05$). El ELISpot BoIFN- γ puede discriminar animales infectados y las proteínas presentes en las fracciones 1, 6 y 15 pueden ser candidatas para formar parte de una combinación antigénica específica para el diagnóstico de *M. bovis*.

Palabras clave: Diagnóstico, Tuberculosis bovina, ELISpot, IFN- γ .

ABSTRACT

Production of interferon gamma from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with mycobacterial antigens can be detected using the enzyme linked immunospot assay (ELISpot). ELISpot has been used in human tuberculosis diagnostic but not in cattle. The aim of this study was standardize and validate the bovine IFN- γ (BoIFN- γ) ELISpot assay. The BoIFN- γ ELISpot parameters involved were the capture antibody and the PBMC concentration. The PPD, ESAT-6 and the *M. bovis* AN5 culture filtrate protein extract were used like antigens. The culture filtrate protein extract was fractionated based on their isoelectric point (pI) by liquid-phase isoelectric focusing (IEF). The pH of the separate fractions (19) ranged from 3 to 12. The optimal conditions of ELISpot assay were 5 $\mu\text{g/ml}$ coating antibody and 3×10^5 PBMC per well. These study suggest a significant response with PPD and fractions with pI 3 (F1), 5.5 (F6) and 10 (F15). Analyses demonstrated sensitivity and specificity of 61 % and 78 %, 57 % and 83 %, 52 % and 61 %, 60 % and 52 % for PPD and fractions 1, 6 and 15 respectively. In the separated fractions, highest level of IFN- γ was observed for acid fractions (F1-F9) in infected animals. The BoIFN- ELISpot assay could be used to detect bovine tuberculosis and proteins in fractions 1, 6 and 15 may have potential for use in a future diagnostic *M. bovis* cocktail.

Key words: Diagnostic, Bovine tuberculosis, ELISpot, IFN- γ .

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a humanos (TBh) y animales causada por bacterias del género *Mycobacterium* (1). La tuberculosis bovina (TBb) se caracteriza por lesiones granulomatosas, principalmente en tejido linfoide asociado al tracto respiratorio (2). Es causada por *M. bovis* que forma parte del complejo *M. tuberculosis* (MTC) cuyos integrantes tienen una similitud genómica >99.9 % y son *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* y *M. microti* (3,4). La TB en humanos es causada principalmente por *M. tuberculosis*, aunque también puede ser ocasionada por *M. bovis* representando un riesgo en la salud pública (3,5,6). Se estima que la pérdida económica en la ganadería mundial a causa de la enfermedad, es de tres mil millones de dólares (2). La prueba de tuberculina (PT) se utiliza desde 1890 para el diagnóstico de la enfermedad, se ha considerado como prueba primaria en los programas de control y erradicación de la TBb a nivel mundial, ya que es económica y no requiere la infraestructura de un laboratorio. Se basa en la identificación de la respuesta inmune celular, mediante una reacción de hipersensibilidad en respuesta al derivado proteico purificado (PPD), que es una mezcla de antígenos de *M. bovis* AN5. La PT tiene el inconveniente de que la especificidad se afecta ante poblaciones expuestas a micobacterias ambientales o no tuberculosas y la sensibilidad disminuye en bovinos inmunosuprimidos (7). Han surgido pruebas alternativas a la PT para el diagnóstico *ante mortem* de la TB conocidas como ensayos de interferón gamma (IFN- γ) o IGRAs, por sus siglas en inglés (Interferon-gamma Release Assays), cuyo principio es la liberación e identificación y del IFN- γ en respuesta al estímulo hacia antígenos micobacterianos (7). En el ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot) las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) productoras de IFN- γ se visualizan por medio de puntos (8). Esta prueba se ha tenido éxito en el diagnóstico de la TB en humanos; sin embargo, hay poca información acerca de su utilidad en el diagnóstico de la TBb. Tanto en la PT como en los IGRAs se han utilizado como antígenos al PPD bovino (PPDb) y aviar (PPDa), pero debido a la reacción cruzada que existe, es necesario identificar y evaluar antígenos que puedan

sustituir al PPD para el diagnóstico de la enfermedad (9). Los antígenos que más se han descrito para dicho fin, son el antígeno de secreción temprana (ESAT-6) y la proteína 10 de filtrado de cultivo (CFP-10) que son proteínas de bajo peso molecular e inducen la producción de IFN- γ de animales infectados. Son codificadas por genes localizados en la región de diferenciación 1 (RD1), la cual está ausente en la vacuna BCG y en la mayoría de micobacterias ambientales o no tuberculosas (7,10,11). Sin embargo, el diagnóstico de la TB es complejo por el propio curso de la enfermedad; por ello, es importante analizar otras proteínas para optimizar el diagnóstico de *M. bovis* (12).

1. Situación actual de la tuberculosis bovina

En los bovinos se estima que máximo el 30 % de los animales expuestos al agente se pueden infectar, pero son capaces de controlar la infección con una efectiva respuesta inmunológica (13). Las pérdidas económicas a nivel mundial por TBb se estiman en 3 mil millones de dólares anualmente, afectando a más de 50 millones de bovinos (14). En los animales afectados puede disminuir la producción de leche hasta un 17 % (15).

En 2015, México reconoce un área del 84.13 % que corresponde a 25 regiones o estados clasificados con baja prevalencia de TBb (<0.5 %) denominadas “en fase de erradicación”. El 66 % del territorio mexicano está reconocido por el APHIS, USDA como zonas de baja prevalencia de TBb y tienen la posibilidad de exportar ganado bovino castrado a EEUU. La prevalencia a nivel nacional de TBb, con base en la información de estas zonas acreditadas por APHIS es de 0.23 %. Las zonas en fase de control tienen una prevalencia promedio de 2.05% excepto en cuencas lecheras que es de 16.5 % (16,17).

1.1. La tuberculosis zoonótica

La tuberculosis pulmonar en humanos es causada principalmente por *M. tuberculosis* (18); sin embargo, también puede ser provocada por *M. bovis* dando un cuadro imposible de

distinguir clínica, patológica y radiológicamente (19–21). Las personas se pueden infectar por consumir leche o derivados lácteos sin pasteurizar manifestando lesiones extra pulmonares principalmente. Las personas que tengan contacto directo con animales infectados pueden adquirir el bacilo tuberculoso por vía respiratoria hasta desarrollar una tuberculosis pulmonar (19). Afortunadamente los casos de tuberculosis causados por *M. bovis* en humanos, han disminuido gracias a la pasteurización de la leche; no obstante, se ha considerado un problema reemergente, afectando principalmente a personas inmunocomprometidas; p. ej. personas que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1,20,22). Se estima que la proporción de casos de tuberculosis humana por *M. bovis* va de 0.5 a 7.2 % (21,23).

En México se producen alrededor de 9.5 millones de litros de leche, de los cuales, del 28 al 30 % se consume cruda o se transforma en derivados lácteos sin pasar por un proceso térmico, lo que implica un riesgo para la salud pública (18,24). En un estudio para determinar la prevalencia de tuberculosis causada por *M. bovis* en pacientes mexicanos, se demostró que los pacientes afectados por el microorganismo (28 %) presentaban tuberculosis extra pulmonar (74 %), afectando principalmente a niños desnutridos que habían consumido leche sin pasteurizar (18). Muchos niños infectados son asintomáticos, no se diagnostican ni reciben tratamiento quedando en estado de latencia por lo que existe el riesgo de que en edad adulta se pueda reactivar la infección (1). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la han clasificado como una zoonosis por negligencia (14), por deficiencias en las estrategias de vigilancia y control, especialmente en países en desarrollo, donde se consumen frecuentemente productos lácteos sin pasteurizar y además hay problemas de desnutrición u otras condiciones inmunosupresoras que aumentan el riesgo de infección (25).

2. Generalidades de la tuberculosis bovina

2.1. Agente etiológico

El género *Mycobacterium* (bacilos semejantes a un hongo) forma parte de la familia Mycobacteriaceae que comprende bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0.2 a 0.6 x 1 a 10 μm (26). Pertenece al orden Actinomycetales que incluye más de 120 especies y al suborden Corynebacterineae. Contiene un alto contenido genómico de guanina-citocina (61-71 %). Son resistentes a detergentes, agentes microbicidas y a tinciones comunes. Cuando los bacilos se tiñen, tampoco se pueden decolorar con soluciones ácidas por lo que reciben el nombre de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). En procedimientos diagnósticos se puede utilizar la tinción de Ziehl-Neelsen o de Kinyoun (19,26). Dentro de sus componentes se encuentra gran cantidad de lípidos (50-60 %), peptidoglicanos, arabinogalactanos, ácidos micólicos y lipoarabinomananos (**Figura 1**).

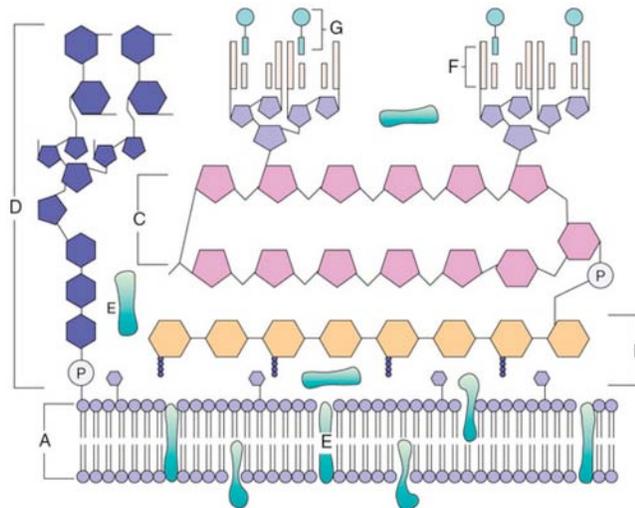


Fig. 1: Envoltura celular micobacteriana (A) Membrana plasmática, (B) Peptidoglicanos, (C) Arabinogalactanos, (D) Lipoarabinomananos manosa terminal, (E) Proteínas asociadas a la membrana plasmática y pared celular, (F) Ácidos micólicos, (G) Moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos (26)

2.2. Hospedero

El bovino es el hospedero principal de *M. bovis*, aunque la enfermedad se ha reportado en diferentes mamíferos incluyendo animales domésticos y silvestres como la zarigüeya (*Didelphis virginiana*), tejón (*Meles meles*) y ciervo rojo (*Cervus elaphus*). El patógeno también se ha aislado de jabalíes (*Sus scrofa*), búfalos (*Syncerus caffer*), bisontes (*Bison bison*), renos (*Rangifer tarandanus*), mamíferos marinos, entre otros (27).

2.3. Vía de excreción

Alrededor del 9 al 20 % de los bovinos infectados expulsan al bacilo por secreciones nasales; no obstante, la ausencia del patógeno en una muestra de moco no indica de manera estricta la inexistencia de su excreción. En bovinos infectados, se puede identificar a *M. bovis* en secreción nasal durante los primeros días y después de los 80-100 días postinfección pero su excreción es intermitente. Es rara la excreción de *M. bovis* por leche, orina o heces, sin embargo, existe dicha posibilidad (28–30).

2.4. Vía de entrada

Los animales pueden infectarse por diferentes vías, se ha observado que la distribución de las lesiones involucra principalmente al aparato respiratorio y a los linfonodos asociados. Por ello, se considera que la vía aerógena es la ruta más importante y común para la inhalación de gotitas con el bacilo, arrojadas en secreciones nasales, tos o mugidos de animales infectados. La ingestión de la bacteria es la segunda vía más importante, ya que se han observado lesiones tuberculosas en menor proporción durante la inspección *post mortem* en tracto digestivo de bovinos afectados. Los animales se pueden infectar por ingerir pastura o agua contaminada. Los becerros se pueden infectar principalmente por la ingesta de leche de vacas tuberculosas (19,27,30).

2.5. Dosis infectiva

La dosis infectiva puede influir en la gravedad de la enfermedad, de 6 a 10 bacilos pueden producir lesiones (31). Aunque se ha mencionado que basta una micobacteria para que el animal se infecte (28). El tamaño y consistencia de las gotitas arrojadas de animales infectados son factores importantes para el establecimiento de la infección. Las partículas grandes quedan atrapadas en la superficie mucosa y son eliminada por la acción de los cilios del tracto respiratorio, mientras que las suspensiones pequeñas son mas efectivas para contener a la bacteria viva y llegar hasta los alvéolos pulmonares comenzando una infección (26,32). Se ha reportado que solo una pequeña cantidad de gotitas contienen al microorganismo viable por más de una hora (30). Para provocar una infección en el tracto digestivo se requiere una dosis mucho mayor que para el tracto respiratorio (1).

2.6. Factores de riesgo

Existen factores que favorecen la transmisión de la enfermedad como el contacto estrecho de un animal infectado con otro susceptible. Puede influir la edad, el estado fisiológico, hacinamiento, el medio ambiente, el padecimiento de alguna enfermedad inmuno-supresora p. ej. diarrea viral bovina o la coinfección con parásitos como *Fasciola hepática*, así como el manejo y medidas preventivas internas de los establos como la introducción de animales infectados en el hato, la pasteurización del calostro para el consumo de los becerros o la aplicación rutinaria de pruebas diagnósticas para la identificación de animales infectados. Se ha observado que el ganado *Bos taurus* tiene mayor predisposición a padecer la enfermedad (21,33–35).

2.7. Patogenia y respuesta inmune

Al ingresar las micobacterias al organismo puede haber cuatro posibles caminos durante el proceso infeccioso: 1) la respuesta inmune elimina al bacilo, 2) las micobacterias no son eliminadas y se multiplican provocando tuberculosis primaria, 3) el sistema inmunológico

impide el crecimiento del bacilo sin eliminarlo en su totalidad, provocando un estado de latencia, y 4) las bacterias que han estado latentes, vuelven a multiplicarse causando una reinfección (tuberculosis secundaria) (36,37). **(Figura 2)**

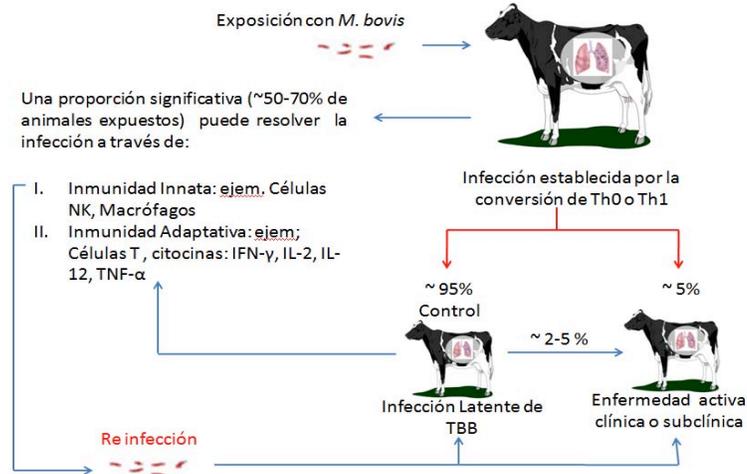


Fig. 2: Perspectiva de la infección y el ciclo de vida de *M. bovis* Muchos animales expuestos (~ 30-50 %), no tienen ninguna evidencia inmunodiagnóstica de la infección por *M. bovis* o presencia de células de memoria de linfocitos T, a pesar de haber sido expuestas a *M. bovis* o antígenos micobacterianos (30,38).

1.9.1. Interacción, micobacteria-hospedero

Los macrófagos y células dendríticas cuentan con receptores que identifican determinadas estructuras que se conservan entre los microorganismos, estos receptores son llamados receptores relacionados a patógenos (PRRs) (39). Las estructuras moleculares que se conservan en los patógenos (PAMPs) son reconocidos por los PRRs dando como resultado la producción de citocinas que favorecen la respuesta inmune. Los receptores más notables involucrados en el reconocimiento del bacilo son el receptor de manosa, receptores tipo Toll (TLRs), DC-SIGN, basurero, citosólicos (NLRs), dectina 1, proteína surfactante A (Sp-A), receptores del complemento (CR), receptor CD14 y receptor mincle. El receptor que se una a la micobacteria puede determinar el destino de la infección (40,41).

1.9.2. Respuesta inmunológica

El hospedero susceptible inhala gotitas que contienen al bacilo, atraviesan la barrera mucociliar del tracto respiratorio hasta llegar a los alveolos pulmonares, donde lo identifican las células fagocíticas residentes (macrófagos, células dendríticas y neutrófilos). Los macrófagos son las células blanco de la micobacteria y son los principales encargados de su eliminación. Al identificar al organismo invasor, lo internalizan alojándolo en una vacuola denominada fagosoma. Este fagosoma se fusiona con el lisosoma formando un fagolisosoma, donde los microorganismos son degradados por la acción de enzimas hidrolíticas. Las micobacterias patógenas poseen mecanismos para evitar la formación del fagolisosoma, lo cual favorece la proliferación del bacilo y su diseminación (40,42,43). Después del día 9 postinfección, las células dendríticas que han capturado al microorganismo, migran a los linfonodos regionales en donde realizan la presentación de antígenos junto con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH) tipo II a los linfocitos T CD4 (40,44–46) (47). Los células T pueden diferenciarse y transformarse en células efectoras dependiendo de las señales que reciban en su activación; estas señales son dadas por las citocinas producidas frente al estímulo del patógeno. Al fagocitar la micobacteria, los fagocitos producen citocinas como TNF- α , IL-1 que dirigen la diferenciación de los linfocitos T hacia Th1 (41,45). Los linfocitos T efectoras que se desarrollaron en los linfonodos, salen a la circulación entre la semana 2 a la 12 postinfección y se dirigen al sitio de infección (41,42,44,48). Al llegar las células CD4+ productoras de IFN- γ junto con otras citocinas como el TNF- α promueven la actividad microbicida de los macrófagos como la producción de intermediarios de oxígeno y del nitrógeno (43,45,47) (**Figura 3**). Para contener al bacilo se forma un tubérculo o granuloma compuesto por macrófagos, los linfocitos T, neutrófilos, monocitos y células dendríticas. De esta forma la micobacteria permanece en un estado de dormancia (o latencia) por un largo tiempo (27,39). A esta condición se le nombra tuberculosis latente en donde los animales no presentan signos clínicos, ni diseminan al bacilo (39,40,49). Después de que hayan transcurrido meses o incluso años, el bacilo se puede reactivar y

progresar a una enfermedad activa (tuberculosis secundaria) (39,42,45). Esto puede deberse por una alteración en el sistema inmunológico del hospedero provocada por la edad, por una enfermedad, algún tratamiento inmunosupresor o puede ser por una re-infección particularmente en áreas de alta prevalencia, ya que los animales pueden mantener contacto estrecho con bovinos infectados (26,42,45,47). Durante el primer periodo de infección, se desarrolla una respuesta celular tipo Th1; pero, si la enfermedad progresa puede sufrir un cambio y se desarrolla una respuesta humoral que no es protectora (36).

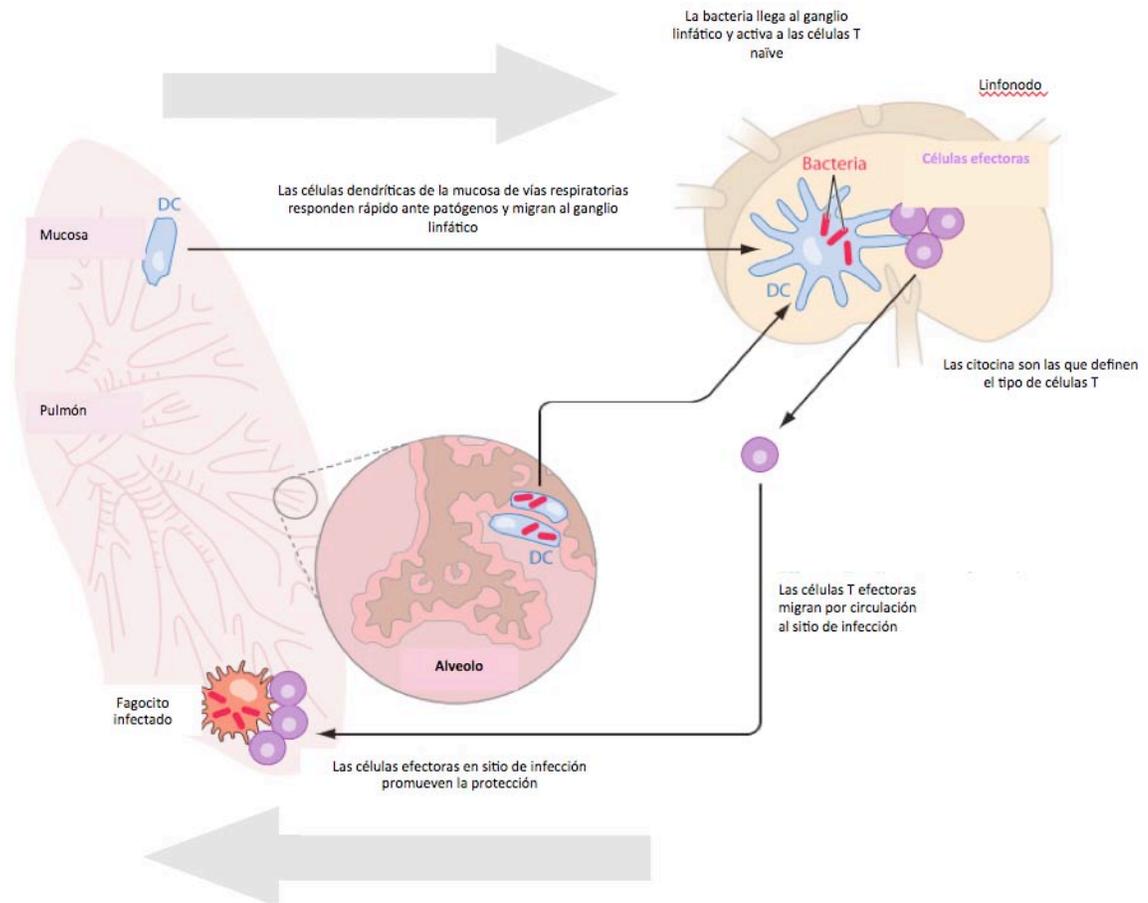


Fig. 3: Respuesta inmune durante la infección micobacteriana. La micobacteria (rojo) es inhalada y llega a pulmón donde es fagocitada por células dendríticas (DC) y macrófagos. Las DC migran a los linfonodos regionales para activar a las células T naïve (morado). Las células T activadas salen a la circulación entre la semana 2 a la 12 postinfección hasta alcanzar el sitio de infección para promover la actividad microbicida de los macrófagos y controlar la infección (44)

1.10. Signos clínicos

Los signos clínicos se hacen visibles en casos de tuberculosis activa y estados avanzados de la enfermedad; sin embargo, pueden ser inespecíficos por lo que el diagnóstico clínico tiene poca relevancia. Los animales pueden presentar tos con expectoración purulenta, disnea, fiebre intermitente, emaciación, anorexia, debilidad, inflamación de linfonodos (bronquiales, mediastínicos, retrofaríngeos y submaxilares) y puede haber hemoptisis. Se estima que cerca de 5 % de las vacas tuberculosas, sobre todo en casos avanzados, tienen lesiones en útero o presentan metritis tuberculosa y que del 1 al 2 % tienen mastitis tuberculosa (43).

3. Diagnóstico de la tuberculosis bovina

El diagnóstico de la TBb sigue siendo un desafío, ya que las pruebas tienen limitaciones con respecto a la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp) (9). El diagnóstico de la TBb *ante mortem* se basa en la detección de la respuesta mediada por células, *in vivo* (prueba de tuberculina) o *in vitro* (ensayo de interferón gamma) (50,51). Ninguna de las pruebas que se utilizan para el diagnóstico de la TBb tiene una precisión exacta que determine al 100 % de los animales infectados y no infectados con *M. bovis* (52) (**Figura 4**).

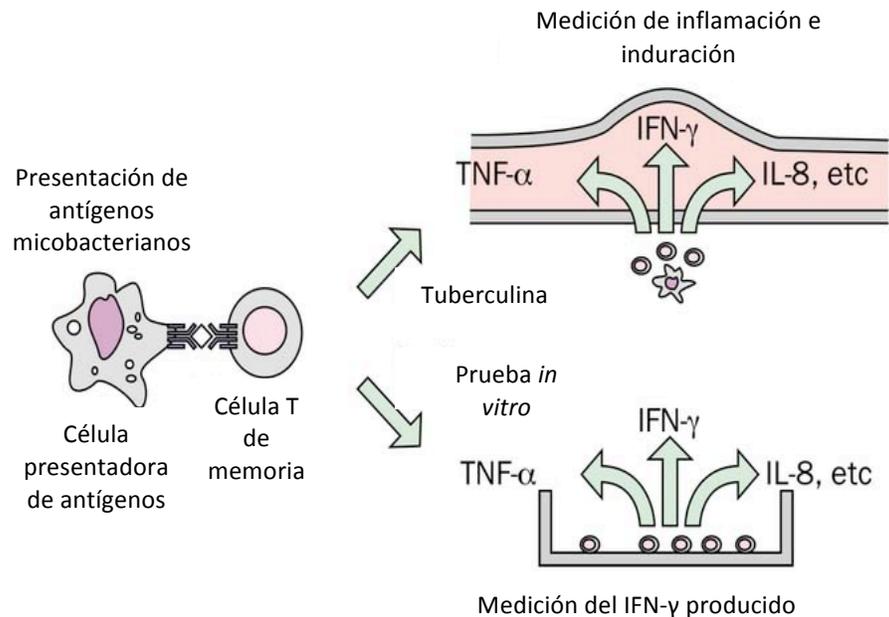


Fig. 4: Pruebas diagnósticas para TBb *in vivo* e *in vitro*. Tanto la prueba de tuberculina como los ensayos de IFN- γ requieren de la producción de citocinas producidas por las células T sensibilizadas a antígenos micobacterianos. En la prueba de tuberculina, los antígenos se inyectan intradérmicamente provocando la infiltración de linfocitos antígeno-específicos y de citocinas produciendo una inflamación en el sitio de inyección. En los ensayos de IFN- γ , las PBMC se estimulan *in vitro* y se mide la citocina a través de un ELISA o se cuantifican las células productoras con ELISpot (7,51).

3.1. Prueba de tuberculina

La prueba de tuberculina (PT) se ha utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis por más de 100 años (52). Al inicio se utilizaba cepas de *M. tuberculosis* para la producción del PPD para el diagnóstico de la TBb. En 1975 se empezó a utilizar *M. bovis* cepa AN5 para la producción del PPD_b que ahora se utiliza en todo el mundo (53). El PPD_b es una mezcla de proteínas que se obtienen a partir de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 cultivado en un medio sintético como Lowenstein-Jensen o Dorset-Henley a 37°C durante 6 a 12 semanas. El contenido es inactivado por calor mediante vapor, se filtra para separar las células micobacterianas del líquido residual y se obtiene el filtrado de cultivo (54).

La PT consiste en la inyección intradérmica de 0.1 ml del PPD en el cuello o en el pliegue caudal de los animales (52). La reacción se caracteriza por la presencia de edema e

inflamación en el sitio de inyección (5,18). La prueba ha sido aceptada en los programas de control y erradicación de la enfermedad a nivel mundial. En México se realiza de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-031- ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) la cual menciona que los animales reactivos a la prueba deberán ser llevados a rastro, o bien segregados, con la finalidad de aprovechar su producción antes del sacrificio (15). La PT se realiza en tres formas:

- *Prueba en pliegue caudal*: se realiza en hatos donde se desconoce la situación zoonosanitaria en materia de tuberculosis. El PPD_b se inyecta de manera intradérmica en el pliegue caudal de los animales. La lectura se realiza 72 h después mediante la observación y palpación del sitio de inyección, cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis de la piel se considera como “reactor” (15).
- *Prueba cervical comparativa*: Es utilizada en animales reactivos a la prueba de pliegue caudal, en la cual se compara la respuesta hacia el PPD_b y el PPD aviar cepa D4 con el objetivo de aumentar la especificidad (**Figura 5**). Antes de inocular la tuberculina se rasuran dos sitios en el tercio medio del cuello a una distancia aproximada de 12 cm y se mide el grosor de la piel con un vernier, después en el espacio superior se inyecta el PPD_a y en el inferior el PPD_b. La lectura se hace 72 h. después de la inyección midiendo con el vernier la induración de la piel. Los valores obtenidos en la primera y segunda lectura se restan y se interpretan de acuerdo a la gráfica oficial. El resultado clasifica a los animales en negativos, sospechosos o reactivos.
- *Prueba cervical simple*: se emplea para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis* o para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados. Debe rasurarse en la región media de la tabla del cuello, se inyecta el PPD_b y se realiza la lectura a las 72 h. Un animal reactor es cuando es visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación (15).

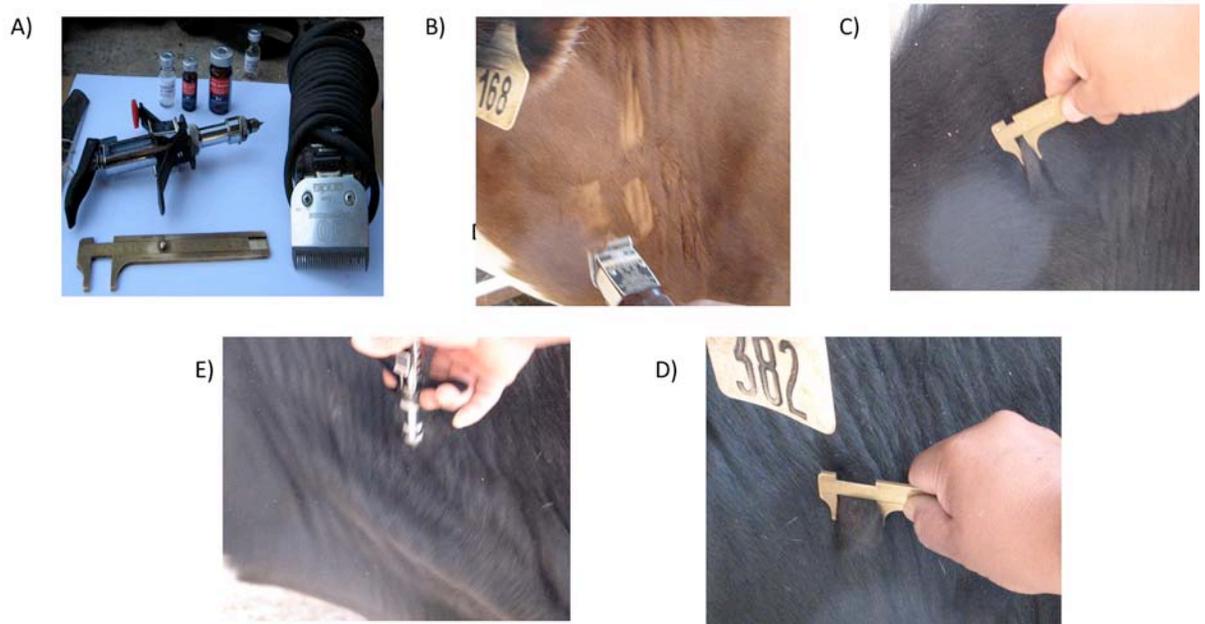


Fig. 5: Pasos para realizar la prueba cervical comparativa. A) Equipo para realizar la prueba: PPD bovino y aviar, vernier, rasuradora y jeringa automática; B) Antes de la inoculación se rasuran dos sitios en el tercio medio del cuello; C) Se mide el grosor de la piel con un vernier antes de la inoculación del PPD; D) En el espacio superior se inyecta el PPDa y en el inferior el PPDb; E) La lectura se hace a las 72 horas de la inyección midiendo con el vernier la induración de la piel.

El principal inconveniente de la PT para el diagnóstico de la enfermedad es que muchas proteínas presentes en el PPDb se comparten con otras especies de micobacterias ambientales o no tuberculosas (ej. *M. avium avium*, *M. avium paratuberculosis*) (50,55,56). Este hecho, molesta a los productores ya que deberían desechar animales falsos positivos, y afrontar el costo de la eliminación (57). Alrededor del 10-25 % de los bovinos infectados no reaccionan al PPD debido a una infección temprana o porque los animales cursan por un periodo de postparto, lactancia, gestación, desnutrición o enfermedades inmunosupresoras; por lo tanto, permanecen en el hato como fuente de infección. Para repetir la prueba hay que esperar hasta 60 días después de la inyección (11,50,51); la especificidad de la PT disminuye hasta un 50 % en estados avanzados o de anergia. A nivel de técnica, la causa de falsos negativos puede ser una lectura incorrecta o

mala inoculación del PPD (51,56,57). Además requiere movilizar a los animales en dos ocasiones, uno para efectuar la inoculación y otro para realizar la lectura a las 72 h, provocando estrés en los animales con las consecuentes caídas en la producción láctea generando inconformidad en los ganaderos (9,51,56). La sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de las diferentes modalidades de tuberculina son muy variables (**Tabla 1**). Esto puede deberse al criterio de interpretación de cada operador (50).

Tabla 1: Sensibilidad y especificidad de la tuberculina

Prueba	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
Pliegue caudal (PPC)	68-96 %	96-98 %	(50)
Cervical comparativa (PCC)	55-93 %	88-98 %	(50)
Cervical simple (PCS)	80-100 %	55-90 %	(52)

Cuando se efectúa la PCC después de haber hecho la prueba en pliegue caudal se estima una Se de 74-88 % y una Sp de 97-98 % (9).

Debido a la complejidad antigénica del PPD, la evaluación del papel que desempeñan los linfocitos T y la importancia de la secreción de IFN- γ en la infección tuberculosa ha llevado al desarrollo de inmunoensayos para evaluar la respuesta inmune celular *in vitro* (9,58).

3.2. Ensayos de liberación de interferón gamma

Los ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs), por sus siglas en inglés, son pruebas inmunodiagnósticas *in vitro* que se han desarrollado para complementar a la PT (59). Los IGRAs miden el IFN- γ liberado durante la respuesta inmune generada frente al estímulo

con antígenos micobacterianos (14). Actualmente se han evaluado dos pruebas: el ELISA para determinar la concentración de IFN- γ liberado en plasma y el ensayo inmunoenzimático de puntos o ELISpot, el cual cuantifica las células secretoras de la citocina (**Tabla 2**) (60).

Tabla 2: Comparación de ELISpot y Ensayo IFN- γ

	ELISpot	Ensayo IFN- γ
Antígenos	ESAT-6 y CFP-10	1ª generación: PPD _b y PPD _a 2ª generación: ESAT-6 y CFP-10
Control positivo y negativo	Si	Si
Lectura	Células formadoras de puntos (SFC)	Medición del IFN- γ en DO*
Sustrato de la prueba	PBMC*	Sangre
Sistema de lectura	Visual con un microscopio o lector automático de ELISpot	Lector de ELISA
Proceso técnico	Separar, contabilizar y distribuir las PBMC en placas de ELISpot y estimular con Ags*	Distribución de sangre en placas de cultivo y estimular con Ags
Sp*	93 % (ESAT-6/CFP-10)	87 a 99 % (con PPD)
Se*	90 % (ESAT-6/CFP-10)	73 a 100 % (con PPD)

*DO: densidades ópticas; PBMC: células mononucleares de sangre periférica; Ags: antígenos; Se: sensibilidad; Sp: especificidad (60,61)

3.2.1. Ensayo para determinar IFN- γ

La prueba se divide en dos partes, la primera consiste en incubar sangre completa a 37°C durante 24 h en presencia de PPD bovino y aviar, de manera independiente, dejando un control sin estimular. En la segunda fase, se recolecta el plasma sobrenadante y se determina el IFN- γ liberado por los linfocitos a través de un ensayo inmunoenzimático por adsorción (ELISA), tipo emparejado utilizando anticuerpos monoclonales (mAb) para IFN- γ

bovino. Cuando existe una infección con *M. bovis*, el IFN- γ producido con el PPD_b es mayor que con el PPD_a y el control. Esta prueba se encuentra de manera comercial con el nombre de BOVIGAM (*Mycobacterium bovis* Gamma interferón test kit for cattle; Prionics AG, Schlieren, Suiza) (58). Los beneficios que presenta la prueba de IFN- γ , en comparación con la intradérmica son, que puede repetirse la prueba en caso necesario, identifica etapas tempranas de infección (**Tabla 3**). En estudios experimentales, la prueba de IFN- γ ha mostrado detectar ganado infectado con *M. bovis* a partir del día 14 postinfección. La sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando PPD se estima en 73 a 100 % y de 87 a 99 % respectivamente (3) Las desventajas son que tiene un costo elevado (26 dólares por animal aproximadamente), las muestras deben ser procesadas dentro las primeras 30 h tras su colección y se requiere de la infraestructura de un laboratorio (26).

La prueba de IFN- γ se ha utilizado junto con la PT en programas de erradicación y control de algunos países, como Australia, obteniendo una sensibilidad y especificidad alrededor del 95 % y de 55-97 % dependiendo del criterio de interpretación de los resultados (9,55,58,62). Es una prueba reconocida y certificada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico de la enfermedad. En México, se ha considerado como una prueba complementaria a la PT para la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (20).

Tabla 3: Tuberculina vs ensayo IFN- γ

Prueba	Ventaja	Desventaja
Tuberculina	<ul style="list-style-type: none"> Económica Práctica 	<ul style="list-style-type: none"> Repetición de la prueba a los 60 días (62) Requiere movilizar a los animales dos días (9,51) Reacción cruzada con micobacterias ambientales (55) No identifica infección temprana ni estado de anergia (51)
Ensayo IFN-γ	<ul style="list-style-type: none"> Identificación 14 días pos infección (63) Manejo de los animales una sola vez (63) No requiere tiempo de espera para 2° muestreo (63) El resultado no depende de la interpretación del operador (64) Opción de tener control positivo (mitógeno) y negativo (sin estimular) (62) 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere el uso de un laboratorio (62) Costo elevado (63) Personal capacitado

3.2.2. Ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot)

El ELISpot de IFN- γ bovino (ELISpot BoIFN- γ) requiere el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para visualizar una “huella” que corresponde a una célula productora de alguna citocina (59,65,66). Esta huella o punto tiene como característica un centro oscuro con un halo alrededor, su tamaño e intensidad son indicadores de la actividad secretora de cada célula (8). La prueba consiste en incubar PBMC, en una placa polivinildifluoruro (PVDF) previamente cubierta con un mAb de

captura en presencia de: 1) antígenos micobacterianos, y 2) un mitógeno para evaluar la viabilidad de los linfocitos. Después de incubar las células con los antígenos, se agrega un mAb de detección, una enzima y un sustrato. Al final se cuantifican las células formadoras de puntos o *spots* (SFC) de cada pozo de manera visual con un microscopio estereoscópico o bien, con un lector automático de ELISpot (56) (**Figura 6**) .

El ELISpot se ha utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos estimando una sensibilidad y especificidad del 80 y 91 % para diagnosticar personas con tuberculosis activa (67). Aunque se ha reportado una Se y Sp de 93 y 90% (68). Existe un kit comercial para diagnóstico de TBh con el nombre de T-SPOT.TB (Oxford Immunotec; Oxford, UK) en el cual se utilizan los antígenos ESAT-6 y CFP-10. En bovinos se ha utilizado básicamente para el desarrollo y evaluación de vacunas para la TBb. Para ello, se maneja una variante de la prueba llamado “ELISpot largo” o “cultivo de ELISpot” el cual consiste en la incubación de las PBMC durante 12-14 días agregando IL-2 y células presentadoras de antígeno (CPA) durante el proceso. El objetivo es visualizar específicamente las células de memoria presentes, ya que las células efectoras mueren durante los primeros días (8,14). Para ELISpot BoIFN- γ han evaluado métodos de aislamiento y la concentración de PBMCs (66). En otro estudio, identificaron que los antígenos ESAT6 y CFP-10 pueden ser utilizados en la identificación de animales tuberculosos (11).

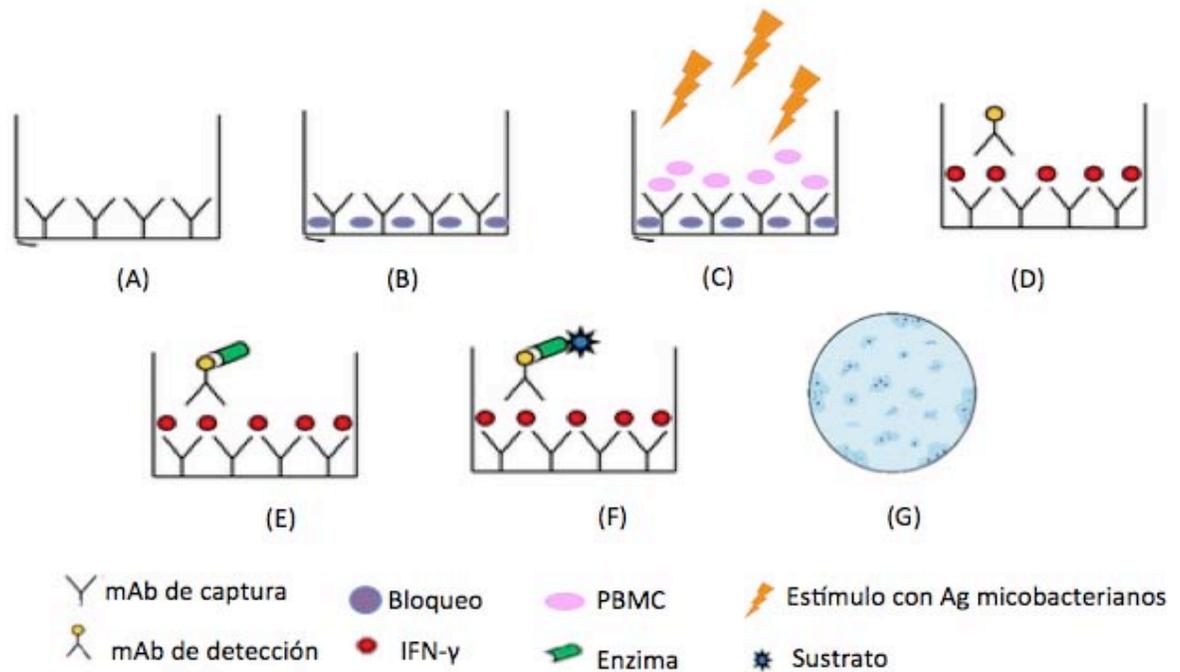


Fig. 6: Esquema del ELISpot (A) Sensibilización de placas de PVDF con un anticuerpo de captura anti IFN- γ bovino (1° mAb); (B) Bloqueo de los espacios vacíos con medio RPMI 1640; (C) Se agregan las PBMC suspendidas en RPMI 1640 y se estimulan con los antígenos micobacterianos, como control positivo se utiliza un mitógeno se deja un pozo sin estimular como control negativo y se incuban a 37°C en CO₂ al 5%; (D) Se añade un anticuerpo de detección biotilado (2° mAb); (E) Se agrega una enzima; (F) Se adiciona el sustrato; (G) En 10 min aproximadamente se pueden visualizar los puntos. Para terminar, se decanta el sustrato y se detiene la reacción con agua destilada. Las placas se secan al aire y se mantienen en oscuridad hasta su lectura con un lector automático o de manera visual con un microscopio estereoscópico.

3.3. Principales antígenos de *M. bovis* utilizados en el diagnóstico de la TBb

El conocimiento que se tiene de *M. bovis*, se ha ampliado gracias a la secuencia genómica del microorganismo así como de otras micobacterias. El genoma contiene alrededor de 4000 genes (53). De los antígenos micobacterianos más estudiados en pruebas inmunodiagnósticas son los antígenos de secreción como el ESAT-6 (Rv3875), que originalmente se describió en *M. tuberculosis* y la proteína 10 de filtrado de cultivo (CFP-10, Rv3874); estas proteínas son de bajo peso molecular que se expresan en etapas

tempranas de cultivo, estimulan la producción de IFN- γ de las células T en animales infectados y son codificadas por genes localizados en la región de diferenciación 1 (RD1) la cual está ausente en la vacuna BCG y en la mayoría de micobacterias ambientales o no tuberculosas excepto en *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai* y *M. riyadhense* (7,10,11,51,69). Se han estudiado en los ensayos de liberación de IFN- γ y en la prueba de tuberculina en donde se han obtenido buenos resultados (11,70).

4. Planteamiento del problema

El diagnóstico de la tuberculosis es complejo por el propio curso de la enfermedad, los estudios enfocados en la respuesta inmunológica han demostrado que la respuesta inmune mediada por células es elemental para combatir al bacilo tuberculoso. Por ello, se han propuesto métodos diagnósticos que permitan evaluar la respuesta de las células T frente a *M. bovis*. El ELISpot ha sido empleado para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos. En bovinos se ha utilizado principalmente para la evaluación de vacunas, pero hay poca información como herramienta diagnóstica para TBb (66). Asimismo, el PPD utilizado en la prueba de tuberculina contiene una mezcla de antígenos que pueden estar presentes en micobacterias patógenas y no patógenas, por lo que los estudios se han enfocado en identificar proteínas más específicas de *M. bovis* para realizar un diagnóstico más preciso e incluso que sean capaces de diferenciar entre animales infectados de los vacunados (9,40,59,62,71). Los antígenos ESAT-6 y el CFP-10 se han evaluado de manera individual o en combinación tanto en la PT como en el ensayo de IFN- γ (9,13,29,88,89). Sin embargo, continúa la búsqueda de más proteínas que puedan complementar a ESAT-6 y CFP-10 y formar una combinación más específica de *M. bovis* (12,72).

II. JUSTIFICACIÓN

Es necesaria la evaluación de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para la tuberculosis bovina con el propósito de optimizar los programas de control y saneamiento de los hatos. El análisis inmunoenzimático de puntos (ELISpot) ha sido utilizado para diagnosticar la tuberculosis en humanos alcanzando una sensibilidad y especificidad hasta del 90 y 93 % respectivamente. En el presente trabajo se propone estandarizar y evaluar la prueba para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad en los bovinos.

III. HIPÓTESIS

La técnica ELISpot puede ser una herramienta para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar y evaluar la utilidad de ELISpot para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ★ Fraccionar el extracto de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 por isoelectroenfoque en fase líquida para identificar mediante su punto isoeléctrico y peso molecular las proteínas que estimulen la producción de IFN- γ en bovinos infectados.
- ★ Determinar la concentración de células mononucleares de sangre periférica y del anticuerpo de captura para el ELISpot.

- ★ Evaluar la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica productoras de IFN- γ por ELISpot frente al estímulo con PPD, ESAT-6 y las fracciones del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5.
- ★ Determinar el IFN- γ en respuesta al PPD, ESAT-6 y el extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 fraccionado por isoelectroenfoque en fase líquida.
- ★ Comparar el resultado del total de células productoras de IFN- γ obtenidos con los diferentes antígenos en bovinos infectados y no infectados.
- ★ Determinar la sensibilidad y la especificidad del ELISpot.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5

Se utilizó el filtrado de cultivo de la cepa AN5 de *M. bovis* el cual fue donado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). Se obtuvo cultivando *M. bovis* AN5 en medio Dorset-Henley a 37°C durante 6 a 10 semanas. El contenido se pasó por filtros de poro de 0.22 μm para separar la masa bacilar y se obtuvo el filtrado de cultivo (54,73). Se precipitaron las proteínas del filtrado de cultivo con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ agregándolo de manera gradual hasta llegar a una saturación del 80 % a 4°C. Se dejó durante 24 h en agitación constante; posteriormente se centrifugó a 19 040 x g durante 1 h. Se recuperó el precipitado el cual se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se dializó con membranas (Cellu-Sep H1) con exclusión de 2 000 kDa frente a PBS (pH 7.2) a 4°C en agitación suave (74). El material obtenido se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC), se colocó en viales de 1.5 ml y se mantuvo a -70°C hasta su uso.

2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para cuantificar las proteínas totales se empleó la técnica de Bradford (75). Para ello, se tomaron 5 y 10 μl de la muestra (EPFC y fracciones obtenidas por isoelectroenfoque), ajustando con agua destilada a 10 μl y se agregan 190 μl del reactivo Bradford, se incubó por 5 min. a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 595 nm. Asimismo, se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (BSA; 1 mg/ml) como estándar.

3. Separación del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 por isoelectroenfoque

Se utilizó la técnica de isoelectroenfoque (IEF) preparativo en fase líquida empleando el equipo Rotofor Preparative Cell System (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (76). El equipo se preparó colocando en los electrodos las soluciones aniónica (0.1M de NaOH) y catiónica (0.1M de H_3PO_4), para permitir el flujo eléctrico en la cámara durante el enfoque. Durante todo el proceso, la cámara se conectó a un baño con refrigeración para permitir la recirculación del agua a 4°C. Antes de realizar el IEF, se realizó un lavado colocando 55 ml de agua destilada en la cámara durante 5 min. y se drenó con el cosechador. Después se realizó un pre-enfoque para establecer un gradiente continuo de pH de 3 a 10 con 2.5 ml de anfolitos al 2 % (Bio Rad Laboratories) mezclados con 34 ml de agua destilada y 10 ml de glicerol a 12 watts por una hora (76). Posteriormente se agregaron 5 ml de EPFC (1 mg/ml) y se llevó a cabo la corrida a 12 watts constantes, haciendo un monitoreo del aumento del voltaje para verificar su progreso; cuando éste se estabilizó (en 4 a 5 h) se mantuvo 15 a 30 minutos más para verificar que no hubiera variaciones en el voltaje y finalmente se recolectaron las fracciones en tubos de 12 x 75 mm conectando el equipo de cosecha a una bomba de vacío (10-50 mmHg) (76). Se cosecharon las fracciones y se les determinó el pH con tiras reactivas. Después, se sometieron a diálisis colocando 500 μl de cada una en viales, se

sellaron con membranas de diálisis (cellu-sep H1) con poro de exclusión de 2 000 kDa en una solución 1M de NaCl a 4°C en agitación suave, a diferentes tiempos, para eliminar los anfolitos. Se utilizó el método Bradford y se realizó una electroforesis SDS-PAGE para evidenciar las proteínas y estimar su peso molecular (75,77). Las fracciones se mantuvieron a -70°C hasta su uso en las pruebas ELISpot y BOVIGAM.

4. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis fue realizada de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (77) en geles verticales de acrilamida, a una concentración del 15 % bajo condiciones reductoras. Las muestras se diluyeron 1:2 en amortiguador de muestra (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2.5 ml de glicerol, 2 ml de SDS al 10%, 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.5% y 0.2 ml de β -mercaptoetanol al 5%) y se calentaron a 95°C durante 5 min. Se utilizó un buffer de corrida Tris-glicina utilizando un equipo Mini-Protein III System (Bio Rad) a un voltaje constante de 150 V hasta concluir la corrida electroforética. Se utilizó un marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards 161-0324, Bio Rad). Una vez realizada la electroforesis, los geles se fijaron en una solución de metanol y ácido acético. Para revelar las bandas, los geles se tiñeron con nitrato de plata de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Silver Stain Plus 161-0449, Bio Rad) y se determinó la distancia relativa de migración (Rf) de los marcadores moleculares y de cada proteína para estimar su peso molecular.

5. Población de estudio

Se seleccionaron bovinos especializados en la producción lechera de raza Holstein Friesian de un hato con antecedentes de tuberculosis. El establo se localiza en el Complejo Agropecuario Industrial Tizayuca ubicado en el municipio de Tizayuca, Hidalgo. De acuerdo a los registros y datos proporcionados por el MVZ responsable, el establo presenta una prevalencia de enfermedad del 50 %. Los bovinos se dividieron en dos grupos, de tal forma que los animales infectados ($n= 21$) y no infectados ($n= 18$) fueran positivos y

negativos tanto en la PCC como en la prueba de IFN- γ (BOVIGAM, Prionics AG). Primero se realizó un muestreo a 12 animales infectados y 6 controles para estandarizar la prueba de ELISpot. Una vez estandarizadas las condiciones, se realizó un segundo muestreo para evaluar diferentes antígenos.

6. Prueba cervical comparativa

La PCC se realizó siguiendo la metodología establecida por la NOM-031-ZOO-1995 (15). Primero se rasuró en dos sitios en la parte central de la tabla del cuello de los animales, a una distancia aproximada de 12 cm cada uno, luego se midió el grosor de la piel con un vernier; posteriormente en el sitio superior se inoculó de manera intradérmica el PPDa (PRONABIVE, México) y en el inferior el PPDb (PRONABIVE, México). Se realizó la medición del engrosamiento de la piel con el vernier a las 72 h y los resultados se determinaron de acuerdo a la gráfica para la interpretación de la PCC de la NOM-031-ZOO-1995 (15).

7. Prueba de IFN- γ

Para el ensayo se tomaron muestras de sangre periférica de vena coccígea en tubos vacutainer con heparina de los animales reactivos y no reactivos a la PCC. Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente durante las primeras 4 h. al laboratorio de inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP CENID-MA, D.F.) y se procesaron dentro las primeras 24 h. Se tomaron 0.5 ml de cada muestra sanguínea para distribuirlas en placas estériles de 48 pozos (Nunclon, Roskilde, Dinamarca) y se estimularon con los antígenos micobacterianos PPDb y aviar (Bovigam, Prionics AG, Schlieren Suiza, 4.5 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$), ESAT-6 (donación del Dr. P. Andersen, Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca), EPFC, las fracciones obtenidas del IEF (ajustando a 5 μg de proteína), se utilizó el mitógeno pokeweed (PKM; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich; L9379) como control positivo y se dejó un pozo sin estimular como control negativo. Se incubaron

durante 24 h a 37°C en 5 % CO₂, luego se colectó el plasma sobrenadante de cada pozo y se mantuvieron a -20°C hasta su uso (**Figura 7**). Para determinar el IFN- γ se siguieron las instrucciones del kit comercial BOVIGAM de primera generación (*Mycobacterium bovis* Gamma interferon test kit for cattle, Prionics AG, Schlieren, Suiza). Para cada muestra, se utilizaron 25 pozos de las microplacas de 96 pozos, sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal (mAb) para IFN- γ bovino, proporcionadas por el kit, incubando por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron seis veces con solución de lavado (BOVIGAM, Prionics AG) y se agregó el conjugado (Peroxidasa de rábano) dejando incubar durante 60 min. Se lavó nuevamente para añadir 100 μ l del sustrato (Tetrametilbenzidina; TMB). Después de 30 min. de incubación en oscuridad, se agregó la solución de paro (0.5M H₂SO₄) y se registró la absorbancia a 450 nm con un lector de ELISA (Benchmark-Plus Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad laboratories, Hercules CA, USA). Los resultados se expresaron en densidades ópticas (DO). Se consideró positivo cuando el valor del PPD_b menos el control fuera ≥ 0.05 DO y la diferencia del PPD_b con el PPD_a fuera > 0 DO, lo contrario en caso negativo (52,58).

8. Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se separaron las PBMC por gradiente de densidades utilizando Lymphoprep (ficoll-diatrizoato). Se diluyeron 10 ml de sangre con 6 ml de PBS estéril. En tubos de 15 ml se colocaron 3 ml de Lymphoprep y se sobrepusieron 10 ml de sangre diluida. Se centrifugaron a 922 x g durante 40 min; al término se recuperó la capa blanca con pipetas Pasteur y se lavaron 2 veces más con PBS estéril centrifugando a 922 x g por 13 min. Al término, la capa celular se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 y se verificó su viabilidad mezclando 10 μ l de la suspensión de células con 10 μ l de azul de tripano. La mezcla se colocó en una cámara de recuento celular (hemocitómetro) y se observó al microscopio para realizar el conteo de las células viables (sin color) y de las células dañadas (teñido de azul) (66).

9. Ensayo inmunoenzimático de puntos (ELISpot)

Las placas de polivinildifluoruro de 96 pozos (Millipore) se cubrieron con 100 μ l el mAb de captura anti IFN- γ bovino (Serotec AbD, MCA2112) a diferentes concentraciones (7.5, 5 y 2.5 μ g/ml) diluido en solución de recubrimiento (carbonato/bicarbonato) por pozo y se mantuvieron a 4°C por 24 h. Se eliminó la solución con el mAb y se lavó la placa 2 veces con PBS estéril. Después se bloqueó con 200 μ l/pozo de RPMI 1640 durante 60 min. a 37°C en CO₂ al 5 %; en seguida, se decantó la solución bloqueadora para agregar 1-3x10⁵/ml de PBMC frescas suspendidas en RPMI 1640 junto con los antígenos ya mencionados en el ensayo de IFN- γ (PPDb y aviar ESAT-6, EPFC y las fracciones obtenidas por IEF); como control positivo se utilizó PKM (Sigma-Aldrich, L9379) dejando un pozo sin estimular como control negativo. Se incubaron por 36 h a 37°C en CO₂ al 5 %. Posteriormente las placas se lavaron 2 veces con agua destilada y 3 veces con PBS con Tween (PBST). Se añadió el mAb de detección biotinilado (Serotec AbD, MCA1783B) diluido en PBST/BSA (0.25 μ g/ml) y se incubó por 2 h. a temperatura ambiente; al término se lavaron 4 veces con PBST y se agregó la enzima estreptavidina fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, S2890) diluida 1:1000 en PBST/BSA incubando durante una hora a temperatura ambiente. Se hicieron 6 lavados con PBST y se adicionó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato/azul de tetrazolio (BCIP/NBT; Sigma-Aldrich, B6404). Una vez que las manchas fueran visibles (10 min) se decantó el sustrato y se detuvo la reacción con agua destilada. Las placas se secaron al aire y se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su lectura con un contador automático ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology, Ltd, Ohio, USA) (**Figura 7**). Una vez hecha la lectura se realizó un control de calidad con el mismo lector para eliminar artefactos que pudieran ser detectados como “puntos falsos” (8,11).

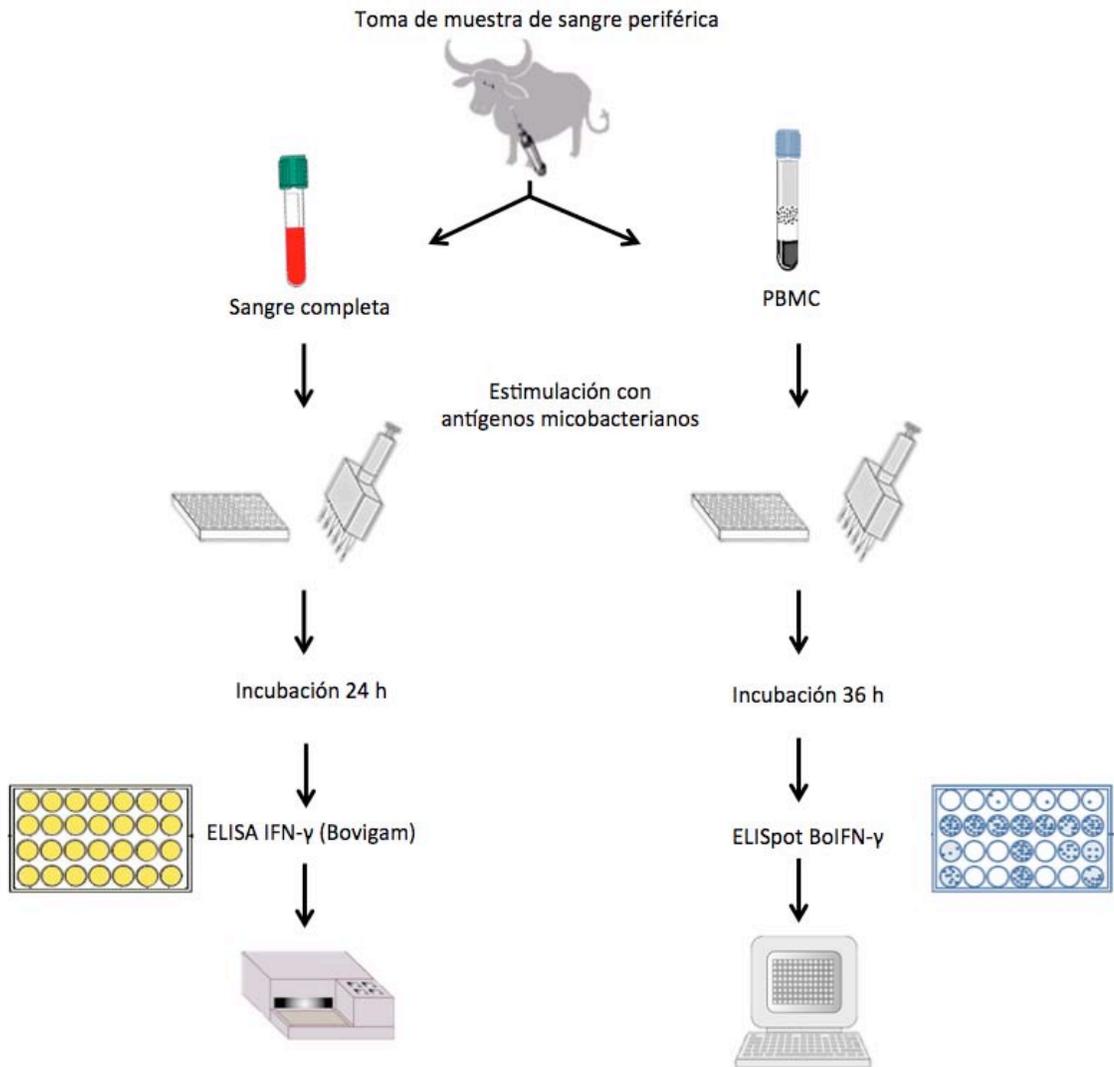


Fig. 7: Diagrama del ensayo de IFN-γ y del ELISpot para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Se toma muestra de sangre periférica en tubos con heparina. Para el ensayo de IFN-γ (izquierdo) se incubó sangre completa con antígenos micobacterianos por 24 h. Las células T de los animales infectados con *M. bovis* secretan IFN-γ al reconocer a los antígenos. Se recolectó el plasma y se determinó el IFN-γ a través de un ELISA con anticuerpos específicos de IFN-γ bovino y se midió la densidad óptica (DO_{450nm}). En ELISpot (derecha) se separaron las PBMC, se verificó su viabilidad con azul de tripano y se ajustó la cantidad necesaria para cada pozo. Se estimularon con antígenos micobacterianos y se dejaron incubar por 36 h. Tras incubar las células con los antígenos, se agrega un mAb de detección, la enzima estreptavidina fosfatasa alcalina y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato/azul de tetrazolio (BCIP/NBT). Se detuvo la reacción con agua y las placas se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su lectura (7,61).

10. Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de student-Welch para examinar los datos obtenidos de los animales infectados con su respectivo negativo, así como para comparar los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de PBMC y de mAb de captura. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se determinó la concordancia entre la PCC y el ensayo de IFN- γ calculando los coeficientes de kappa de Cohen (κ) siguiendo los márgenes establecidos por Landish y Koch (<0.00 sin acuerdo, >0.00-0.20 insignificante, 0.21-0.40 discreto, >0.41-0.60 moderado, 0.61-0.80 sustancial 0.81-1.00 casi perfecto (78). Se realizó una curva de características operativas del receptor (ROC) para determinar el punto de corte para ELISpot, con la máxima sensibilidad y especificidad tomando los valores obtenidos (total de puntos) de los animales infectados y no infectados (79,80). El área bajo la curva (ABC) representa la precisión con la que cada antígeno puede discriminar entre los infectados y los no infectados, esta área debe ser mayor o igual a 0.5 (coincidiendo con la línea de referencia), en caso contrario se considera no discriminativo. De tal forma que si el valor está comprendido entre 0.5 y 0.7 la precisión es baja, si se encuentra entre 0.7 y 0.9 se considera regular y si es superior a 0.9 la discriminación es casi perfecta (81,82).

VII. RESULTADOS

1. Obtención de las fracciones del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 por isoelectroenfoque en fase líquida.

El EPFC se separó por IEF utilizando el sistema Rotofor, obteniendo fracciones de 2.5 a 3 ml aproximadamente, se les determinó su punto isoeléctrico (pI) con tiras reactivas de pH (≈ 3 a 12) y se les calculó la concentración de proteína con el método Bradford obteniendo un rango de 0.12 a 0.38 mg/ml. La concentración más alta se obtuvo en la fracción 10 (F10) con 0.38 mg/ml y con menor cantidad de proteína fueron de la F1 a la F4 (pI ≈ 3 a 3.5) (Figura 8).

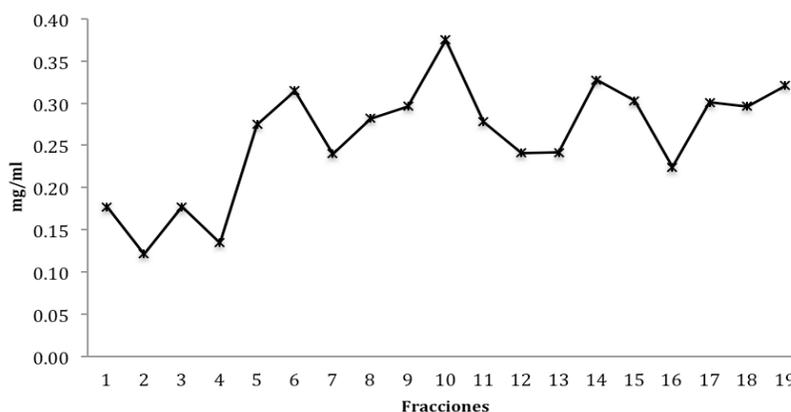


Fig. 8: Concentración de proteína de las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5. Se cuantificó la proteína de cada fracción con el método Bradford. Los resultados se muestran en mg/ml. IEF: isoelectroenfoque, EPFC: extracto proteico de filtrado de cultivo.

El peso estimado de las proteínas con su respectivo pI se presentan en la tabla 5. El mayor número de proteínas (entre 5 y 9) se encontraron localizadas en las fracciones 6 (pI 5), 7 (pI 5.5), 9 (pI 6.5) y 10 (pI 7.6), el resto de las fracciones presentaron de 2 a 4 proteínas. En

la F1 se presentaron tres proteínas de 90, 64 y 19 kDa, mientras que la F2 tuvo dos proteínas de 90 y 19 kDa. La F3, F4 y F5 mostraron tres proteínas del mismo peso molecular (36, 26 y 13 kDa). Las fracciones 6 y 7 presentaron proteínas con un peso molecular de 126, 90, 49, 36, 19, 13 kDa y 90, 90, 64, 49, 36, 36, 26, 25 y 13 kDa respectivamente. En la F8 hubo tres proteínas de 36, 19 y 13 kDa mientras que en F9 se visualizaron cinco proteínas de 64, 49, 48, 36, 26 kDa. La F10 mostró proteínas de 49, 36, 26, 26, 25 y 13 kDa mientras que la F11 presentó proteínas de 49, 26 y 25 kDa. En las fracciones 12, 13 y 14 se evidenciaron proteínas de 90, 36, 26 y 19 kDa, en tanto que la F15 tuvo una menos que las anteriores (90, 26 y 19 kDa). Las fracciones más alcalinas (pH 10 a 12) presentaron solo dos proteínas; en la F16 y F17 fueron de 90 y 19 kDa y las últimas dos fracciones fueron de 90 y 64 kDa. Todas estas fracciones fueron utilizadas para estimular la sangre completa en el ensayo de IFN- γ y las PBMC para la prueba de ELISpot (Tabla 4).

Tabla 4: Punto Isoeléctrico y peso molecular de las proteínas presentes en las fracciones obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5.

Fracción	Punto isoelectrico	Peso molecular (kDa)
F1	≈3	90, 64,19
F2	3.8	90, 19
F3	4	36, 26,13
F4	4.5	36, 26, 13
F5	5	36, 26, 13
F6	5.5	126, 90, 49, 36, 19, 13
F7	6	90, 90, 64, 49, 36, 36, 26, 25, 13
F8	6.5	36, 19, 13
F9	7	64, 49, 48, 36, 26
F10	7.5	49, 36, 26, 26, 25, 13
F11	8	49, 26, 25
F12	8.5	90, 36, 26, 19
F13	9	90, 36, 26, 19
F14	9.5	90, 36, 26, 19
F15	10	90, 26, 19
F16	10.5	90, 19
F17	11	90, 19
F18	11.5	90, 64
F19	12	90, 64

2. Animales de estudio y criterios de selección

En la tabla 5 se muestra el total de animales muestreados ($n= 46$) de los cuales 7 fueron excluidos del estudio por no cumplir con los criterios de inclusión (3 negativos a PCC pero

positivos a IFN- γ y 4 positivos a PCC pero negativos a IFN- γ). La concordancia entre el ensayo de IFN- γ y la PCC fue sustancial con un valor κ de 0.694 (CI 95%) (78).

Tabla 5: Resultados de la prueba cervical comparativa y del ensayo de IFN- γ

Prueba	Tuberculina		Total	
	positivo	negativo		
IFN- γ	positivo	21	3	24
	negativo	4	18	22
Total		25	21	46

Se aplicó la prueba cervical comparativa y se tomó muestra de sangre en tubos con heparina para determinar la concentración del IFN- γ con la prueba de BOVIGAM (Prionics AG) a 46 bovinos de los cuales 21 fueron positivos y 18 negativos en ambas pruebas.

3. Estandarización del ELISpot BoIFN- γ

Para estandarizar el ELISpot se consideraron 18 animales (infectados $n=12$ y no infectados $n=6$), utilizando tres concentraciones de células (1 , 2 y 3×10^5) y tres del mAb de captura (2.5 , 5 y $7.5 \mu\text{g/ml}$). Las células se estimularon con PPD_b ($4.5 \text{ mg}/15 \mu\text{l}$) y se dejó un pozo sin estimular como control negativo; se obtuvo el total de SFC y se compararon los resultados obtenidos con las distintas concentraciones del grupo de infectados y no infectados. En general, los valores con las tres concentraciones de anticuerpo fueron muy similares; el mayor número de células formadoras de puntos (SFC) ($p < 0.05$) se cuantificaron con 3×10^5 de PBMC. No hubo diferencia ($p > 0.05$). La media de SFC obtenidos con 1×10^5 células entre 2.5 , 5 y $7.5 \mu\text{g/ml}$ de mAb fue de; sin embargo, la calidad y cantidad de SFC fue pobre bajo estas condiciones. Al comparar los resultados con 2×10^5 de

PBMC hubo diferencia ($p < 0.05$) en la media de SFC entre 5 y 7.5 de anticuerpo, pero en la media de las células productoras de IFN- γ entre 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ no hubo diferencia estadística ($p > 0.05$). No hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las tres concentraciones de mAb con 3×10^5 de PBMC; sin embargo, la mejor calidad y cantidad de SFC se logró con 5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb de captura (**Figura 10 y 11**). De acuerdo a los resultados obtenidos, en los ensayos posteriores se continuó utilizando una concentración de 3×10^5 de PBMC con 5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb de captura, para optimizar recursos sin el riesgo de afectar los resultados.

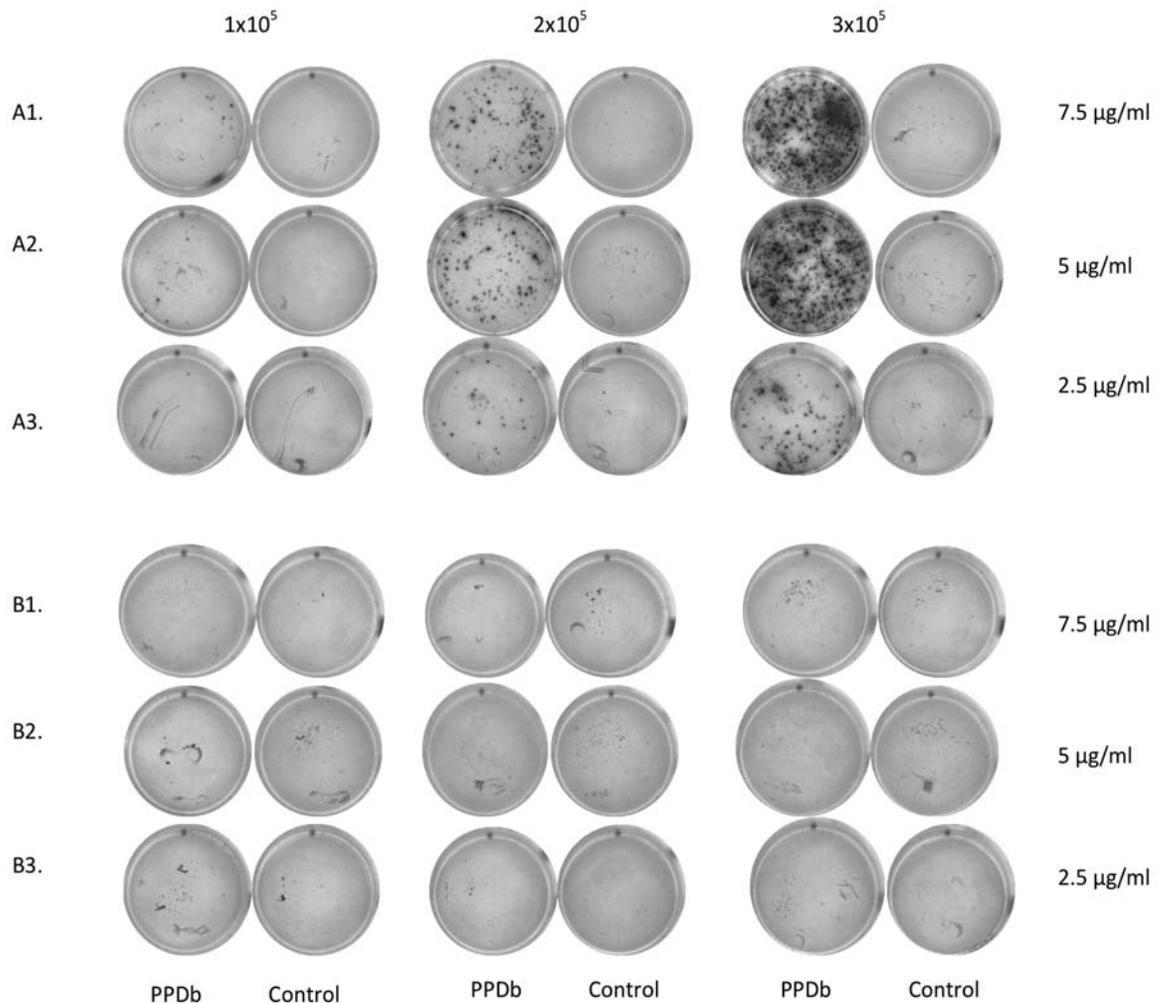


Fig. 9: Determinación de la concentración de células mononucleares de sangre periférica y anticuerpo de captura para la prueba de ELISpot BoIFN- γ . Se colocaron 100 000, 200 00 y 300 000 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos infectado y no infectado en placas de ELISpot sensibilizadas con 2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de captura. Las células fueron estimuladas con PPDb (4.5 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$) y sin estímulo control negativo. Se incubaron por 36 h. en CO_2 al 5%. La lectura se realizó con un contador automático ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology, Ltd, Ohio, USA). Los resultados se expresaron en células formadoras de puntos (SFC). (A) Se ilustra ejemplo de ELISpot de un animal infectado con 1, 2 y 3×10^5 PBMC y con diferente concentración de anticuerpo de captura; A1: concentración de mAb a 7.5 $\mu\text{g/ml}$; A2: concentración de mAb a 5 $\mu\text{g/ml}$; A3: concentración de mAb a 2.5 $\mu\text{g/ml}$. (B) Ejemplo de ELISpot de un animal no infectado con 1, 2 y 3×10^5 de PBMC y diferentes concentraciones de mAb de captura; B1: 7.5 $\mu\text{g/ml}$; B2: 5 $\mu\text{g/ml}$; B3: 2.5 $\mu\text{g/ml}$.

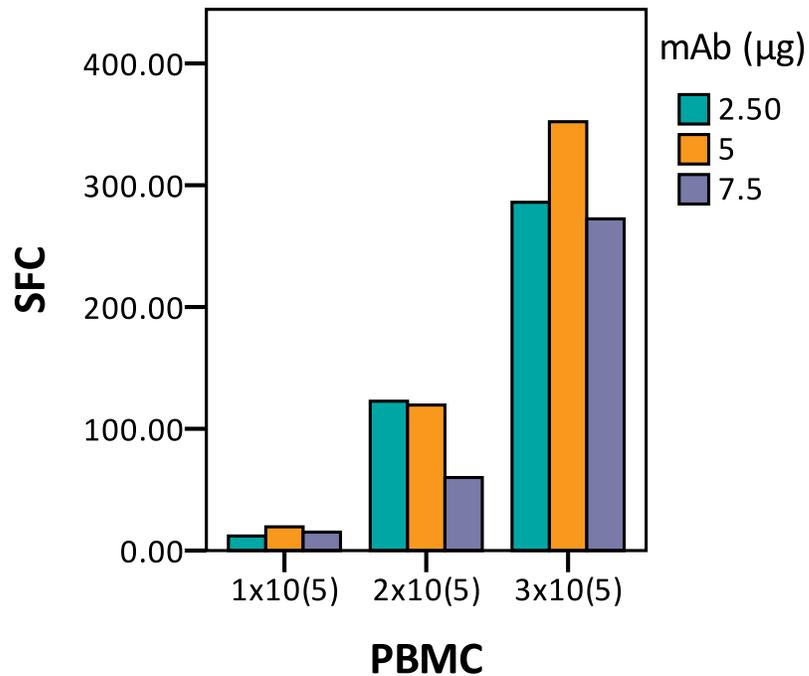


Fig. 10: Determinación de la concentración de células mononucleares de sangre periférica y del anticuerpo de captura anti IFN- γ para el ELISpot BoIFN- γ . Se colocaron 100 000, 200 000 y 300 000 células mononucleares de sangre periférica de bovinos infectados en placas sensibilizadas con 2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo de captura (mAb) anti IFN- γ . Las células fueron estimuladas con PPD_b (4.5 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$) y sin estimular como control negativo. Se muestra la media del total de células formadoras de puntos (SFC) obtenidas con las diferentes concentraciones de células (1×10^5 , 2×10^5 y 3×10^5) y de anticuerpo (2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$). Se comparó la media de cada grupo con una prueba T Student-Welch.

4. Determinación del IFN- γ en respuesta al extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis*, a las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque en fase líquida, al PPD_b y al ESAT-6.

Las muestras sanguíneas de los animales infectados ($n=21$) y no infectados ($n=18$) se sometieron al ensayo de IFN- γ (BOVIGAM) con diferentes antígenos (PPD_b, ESAT-6, EPFC y las fracciones obtenidas por IEF). Con las fracciones 1 a la 9 (pl 3 a 6), el PPD_b, el EPFC y el ESAT-6 se observó una marcada diferencia ($p<0.05$) en la producción de IFN- γ de los animales infectados. Con las demás fracciones (pl 7 a 12) y el PPD_a, la producción de IFN- γ de los animales infectados no fue significativa al comparar la respuesta con el grupo de los no infectados ($p>0.05$).

El PPD_b fue el mayor inductor de IFN- γ presentando una media de 0.811 DO, en segundo lugar fue el EPFC con una media de 0.63 DO. El tercer antígeno que indujo la producción de IFN- γ fue F6 con una media de 0.546 DO. La F5 ocupó el quinto lugar con una media de 0.47 DO, siguió la F4 con un valor de 0.36 DO; la F3 presentó una media de 0.35 DO. Después, la F7 con una media de 0.30 DO; continuó F1 con 0.28 DO, seguida por F2 que mostró una media de 0.23 DO. El ESAT-6 presentó una media de 0.189 DO, mientras que la media de F8 fue de 0.11 DO y por último la F9 con una media de 0.09 DO (**Figura 11**) .

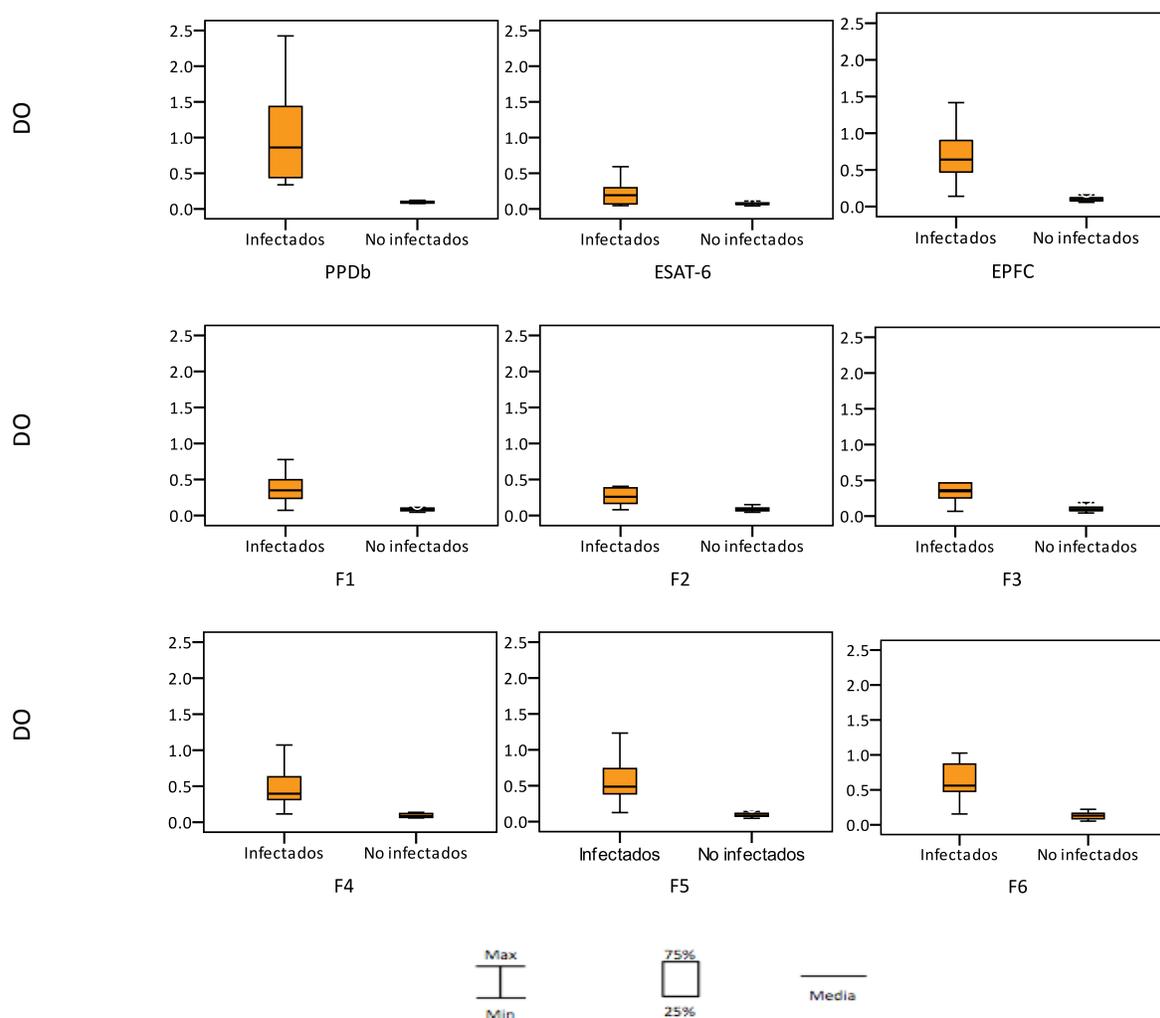


Fig. 11: Comparación del IFN- γ producido en respuesta al estímulo con PPDb, ESAT-6, el extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis* AN5 y las fracciones obtenidas por la separación del EPFC por isoelectroenfoque. Se colocaron 0.5 ml de sangre periférica de bovinos infectados ($n=21$) y no infectados ($n=18$) en presencia del PPDb, ESAT-6, el extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis* AN5 y las fracciones obtenidas por la separación del EPFC por isoelectroenfoque. Se recolecto el plasma sobrenadante y se determinó el IFN- γ producido con un ELISA (Bovigam, Prionics AG). Los resultados se expresaron en densidades ópticas ($DO_{450\text{ nm}}$) y se comparó la media de cada grupo con una prueba T Student-Welch. El PPDb, ESAT-6, el EPFC y las fracciones 1-9 estimularon la producción de IFN- γ ($p<0.05$) en animales infectados. EPFC: extracto proteico de filtrado de cultivo; F1-F9: fracciones obtenidas por isoelectroenfoque; PPDb: derivado proteico purificado bovino.

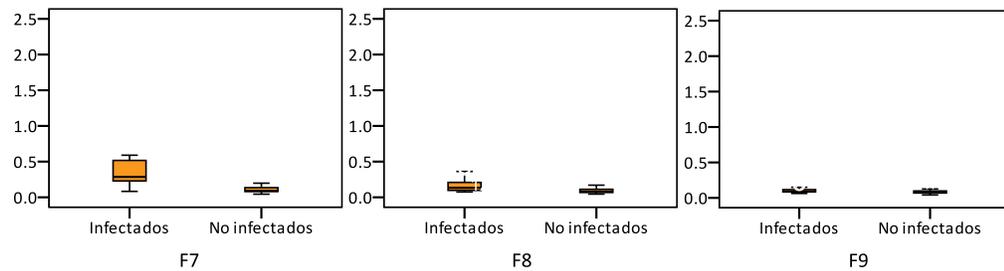


Fig 11: continuación

5. Análisis de la respuesta de las CMSP productoras de IFN- γ por ELISpot frente al estímulo con PPD, ESAT-6, extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis* AN5 y a las fracciones obtenidas por isoelectroenfoque en fase líquida

Para la prueba de ELISpot, se utilizaron células de animales infectados ($n=21$) y no infectados ($n=18$) las cuales fueron estimuladas con diferentes antígenos (PPDs, ESAT-6, EPFC y las fracciones obtenidas por IEF). En los animales infectados, se cuantificaron mayor número de células cuando fueron estimuladas con el PPD_b, y con las fracciones 1 (pI 3), 6 (pI 6) y 15 (pI 9.5) ($p<0.05$). Al igual que en BOVIGAM, el PPD_b fue el mejor inductor de la respuesta en ELISpot pues en el grupo de los infectados permitió identificar una media de 99 SFC. La F1 ocupó el 2° lugar con una media de 17 SFC; seguida por F15 y F6 que obtuvieron un valor en la media de 15 y 13 SFC respectivamente (**Figuras 12 y 13**). En cuanto la respuesta hacia PPD_a, ESAT-6, el EPFC y las fracciones restantes no se observó diferencia significativa en la media de las células productoras IFN- γ que se contabilizaron en infectados y no infectados ($p>0.05$).

De acuerdo a los datos obtenidos, se realizó el análisis de la curva ROC para ELISpot con el PPD_b, F1, F6 y F15, ya que estos fueron los que estimularon a las células mononucleares del grupo de los infectados ($p<0.05$) (**Figura 14**). En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis; el área bajo la curva (ABC) que se estimó para cada uno fue de 0.725, 0.726, 0.598 y 0.609, respectivamente. Con el PPD_b se estimó una sensibilidad de 61% y una especificidad de 78 % considerando un punto de corte de 60 SFC; mientras que para F1

con un punto de corte de 15 SFC se apreció una Se y Sp de 57 % y 83 %. Las la F6 y F15 mostraron baja capacidad para discriminar entre infectados y no infectados, el mejor punto de corte para ambas fracciones fue de 15 SFC estimando una Se y Sp de 52 % y 61 % (ABC: 0.598, p=0.297) para F6 y 60 % de Se y 52 %de Sp (ABC: 0.609, p=0.244) para F15. (Tabla 7).

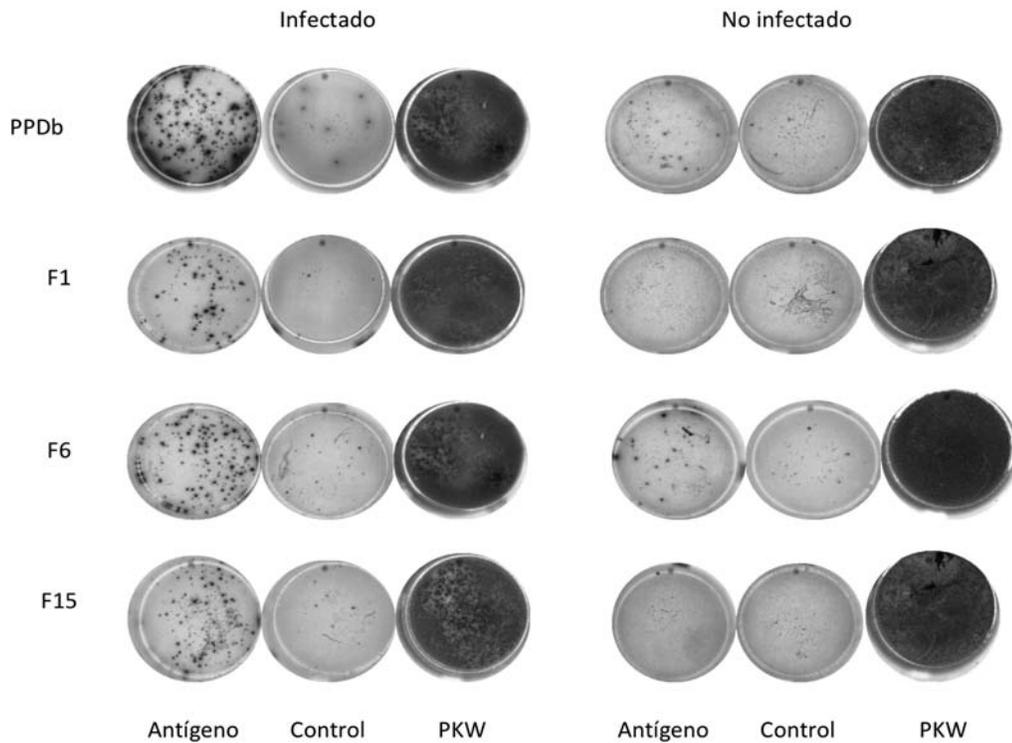


Fig. 12: Evaluación de la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica productoras de IFN- γ frente al estímulo con PPD, y las fracciones del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5. En placas de ELISpot sensibilizadas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de captura se colocaron 300 000 de células monucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos infectados y no infectados en presencia del PPDb y las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M.bovis* AN5. Como control positivo se utilizó el mitógeno pokeweed (PKM) y se dejó un pozo sin estimular como control negativo. Se incubaron por 36 h. en CO_2 al 5%. Las fracciones 1, 6, 15 y el PPDb presentaron mayor número ($p < 0.05$) de SFC en bovinos infectados. La lectura se realizó con un contador automático ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology, Ltd, Ohio, USA) y). Se muestra ELISpot de 4 animales infectados y 4 no infectados.

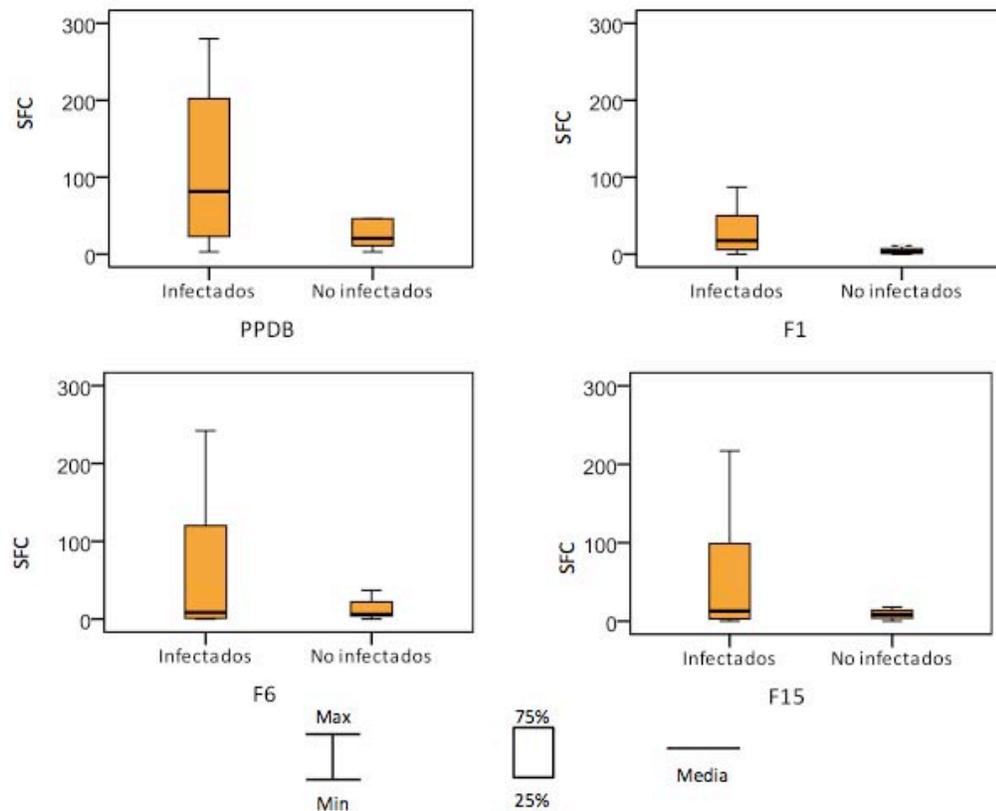


Fig. 13: Comparación del total de células productoras de IFN- γ obtenidos con los diferentes antígenos en bovinos infectados y no infectados. En placas de ELISpot sensibilizadas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de captura se colocaron 300 000 de células monucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos infectados y no infectados en presencia del PPDb y las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M.bovis* AN5. Como control positivo se utilizó el mitógeno pokeweed (PKM) y se dejó un pozo sin estimular como control negativo. Se incubaron por 36 h. en CO_2 al 5%. Los resultados se expresaron en células formadoras de puntos (SFC) y se comparó la media de cada grupo con una prueba T student-Welch. Las fracciones 1, 6, 15 y el PPDb presentaron mayor número ($p < 0.05$) de SFC en bovinos infectados. La lectura se realizó con un contador automático ImmunoSpot 3.2 (Cellular Technology, Ltd, Ohio, USA) y). Se muestra ELISpot de 4 animales infectados y 4 no infectados

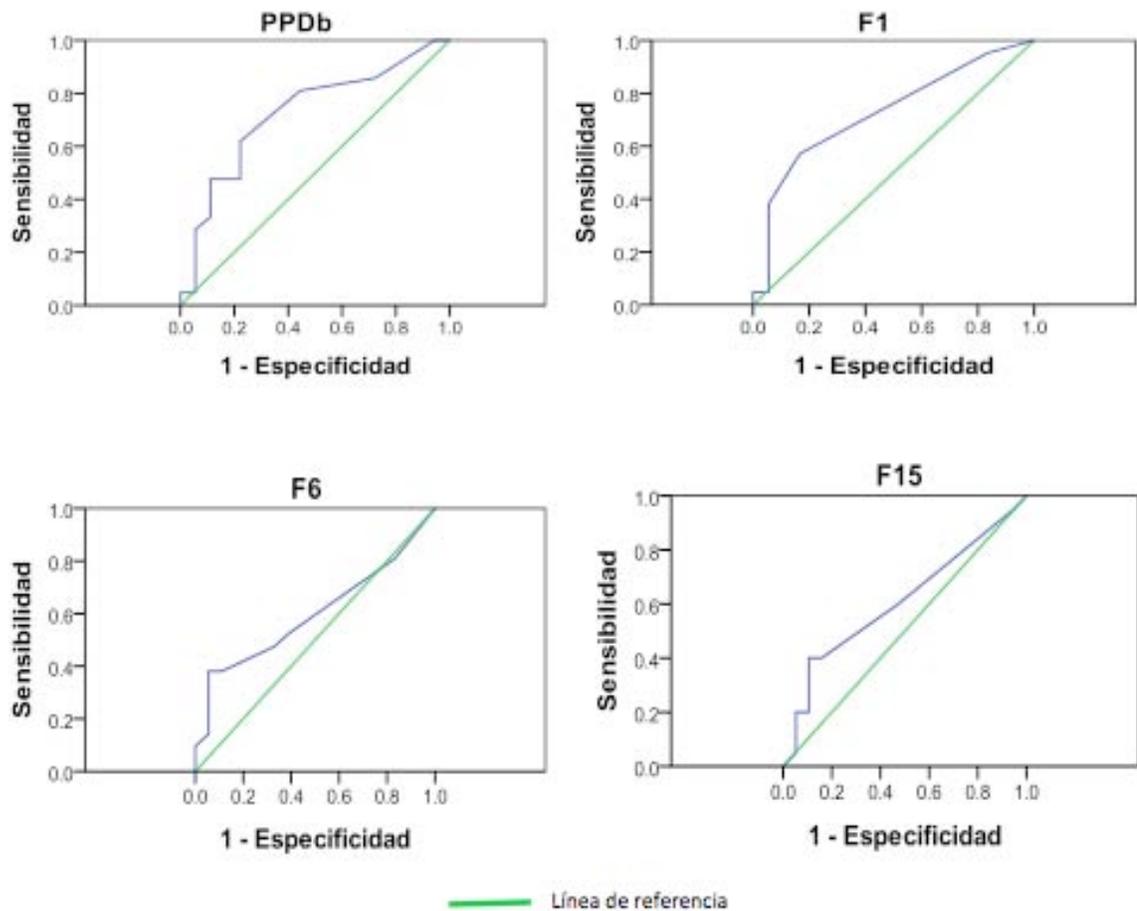


Fig. 14: Gráfico de curva ROC para determinar si el PPD y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 que discriminan bovinos infectados y no infectados. Se consideró el total de células formadoras de puntos (SFC) de los bovinos infectados y no infectados para realizar la curva ROC y determinar el área bajo la curva (ABC). Partiendo de la línea de referencia, los resultados mostraron que el PPDb (ABC: 0.725) y la F1 (ABC: 0.726) tienen una precisión regular para discriminar infectados y no infectados. La F6 y F15 con un ABC: 0.598 y 0.609 respectivamente su precisión es baja.

Tabla 6: Evaluación del área bajo la curva del PPDb y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5.

Antígeno	Área	Error estándar	Significancia	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
PPDb	0.725	0.083	0.017	0.561	0.888
F1	0.726	0.726	0.016	0.565	0.888
F6	0.598	0.092	0.297	0.418	0.778
F15	0.609	0.092	0.244	0.429	0.789

Tabla 7: Determinación de la sensibilidad y especificidad del ELISpot con el PPDb y las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas de la separación por isoelectroenfoque del extracto proteico del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5.

Antígeno	Corte (SFC)*	Se*	Sp*
PPDb	60	61	78
F1	15	57	83
F6	15	52	61
F15	15	60	52

* SFC: células formadoras de puntos; Se: sensibilidad; Sp: especificidad

VIII. DISCUSIÓN

Un punto importante a considerar para el control de la TBb son métodos diagnósticos que permitan la identificación oportuna de los animales infectados con *M. bovis*. Uno de los principios diagnósticos se basa en la respuesta inmunológica de células T bajo el estímulo con antígenos del bacilo tuberculoso para secretar IFN- γ , el cual favorece las propiedades microbidas de la respuesta inmune para el control y eliminación de la micobacteria (2). El ensayo de ELISpot ofrece un método único para enumerar las células productoras de citocinas en respuesta a antígenos específicos (83).

Los parámetros que se consideraron para el uso óptimo del ELISpot como una prueba alternativa y/o complementaria para el diagnóstico de la TBb fueron, la concentración de PBMC y del mAb de captura anti-IFN- γ . La concentración de mAb de captura debe ser costo-efectiva, sin comprometer la calidad y cantidad de las SFC. El recubrimiento de la placa del ELISpot con el anticuerpo es un paso sencillo; sin embargo, algún cambio en esta etapa puede provocar variaciones en los resultados; por ejemplo, utilizando una baja concentración se pueden observar menos SFC y mal definidos, debido a que la citocina no logra ser captada por el anticuerpo (84). Se ha sugerido utilizar el mAb de captura a una concentración de 7.5 $\mu\text{g/ml}$ para el ELISpot BoIFN- γ (8). Así también, en otro estudio utilizaron 7.5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb de captura (11). En los resultados del presente trabajo, no se encontró diferencia estadística en la enumeración de las SFC entre 2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb de captura, pero la mejor calidad y cantidad de SFC, se identificó con la concentración de mAb a 5 $\mu\text{g/ml}$ con 3×10^5 PBMC. Aunque se ha reportado que con una concentración de 2.5×10^5 PBMC es suficiente para realizar el ELISpot en humanos.

El ELISpot muestra la cantidad de células secretoras del IFN- γ , pero el resultado de la prueba debe ser interpretado por el investigador (85). El criterio para definir una respuesta positiva en ELISpot ha sido controversial (86). Se han descrito métodos empíricos y estadísticos para determinar la positividad de la prueba (85). En el presente

trabajo, se determinó una sensibilidad y especificidad del 61 % y 78 % al estimular las células con el PPD_b. Además se comparó la respuesta generada frente a las fracciones obtenidas por isoelectrenfoque del extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5. Los resultados mostraron que la fracción uno (F1) fue la que tuvo mayor especificidad 83 %; sin embargo, la sensibilidad fue de 57 % y para las fracciones 6 y 15 se estimó una Se de 52 % y 60 % y una Sp de 61 % y 52 % respectivamente. A pesar de que la mejor sensibilidad en ELISpot se obtuvo con el PPD_b, se sabe que especies del género *Mycobacterium* comparten muchos antígenos, incluyendo a micobacterias ambientales, lo que puede generar una reacción cruzada. Se ha reportado una sensibilidad y especificidad del 84 y 85 % respectivamente, para ELISpot en humanos con tuberculosis activa utilizando los antígenos ESAT-6 y CFP-10 (67). En otro estudio, evaluaron diferentes antígenos utilizando el antígeno AlaDH en la técnica ELISpot para discriminar entre pacientes en estado de latencia y sanos; obteniendo una sensibilidad y especificidad de 88 y 56% respectivamente (64).

El antígeno ESAT-6, se ha evaluado junto con el CFP-10 en ELISpot BoIFN- γ , donde se ha observado que estos antígenos son específicos y son capaces de diferenciar entre animales positivos y negativos (11). Debido a esto, se esperaba que la respuesta hacia el ESAT-6 fuera significativa hacia los animales infectados; este hecho se observó en el ensayo de IFN- γ . No obstante, en ELISpot no se percibió diferencia estadística entre los dos grupos de estudio; lo cual podría sugerir, que en el grupo de infectados predominaban animales en estado de latencia en donde las células productoras de IFN- γ que responden a ESAT-6 no son tan abundantes como en estados iniciales de la infección o en una enfermedad activa. Dando soporte a esta propuesta, se realizó un estudio para diferenciar entre una tuberculosis activa y una tuberculosis latente en niños, donde utilizaron la técnica ELISpot para IFN- γ e IL-2, en el cual reportaron que el ESAT-6 no logró distinguir con éxito las dos etapas de la enfermedad (87). En otro estudio, se evaluó la capacidad de inducir la liberación de IFN- γ en PBMC con 17 fracciones obtenidas por elución, comprobando que en estados tempranos de infección (5 semanas) se reconocen

antígenos de bajo peso molecular (<14.4 kDa) como el ESAT-6 el cual resultó ser el principal inductor de la respuesta de las células T; mientras que en una infección tardía (16 semanas), antígenos con un mayor peso molecular también pueden estimular la producción de IFN- γ , concluyendo que todas las fracciones pueden ser antigénicas, pero son reconocidas en diferentes etapas de infección (87). Los resultados del presente estudio mostraron que fracciones en un rango de pI de 3 a 6, tuvieron mayor capacidad para estimular la producción de IFN- γ en los animales infectados, coincidiendo con lo reportado por Díaz *et al.* (88). En otro estudio, demostraron que 11 fracciones de las cuales 7 tenían un rango de pI ácido de 4.2 a 5.25 estimularon la producción de IFN- γ (89). Además, se ha observado que las PBMC pueden aumentar o disminuir dependiendo de la etapa del curso de la enfermedad, así como se puede modificar el reconocimiento de los antígenos que estimulan la liberación de IFN- γ (87,90). Como consecuencia a esto, la identificación de antígenos micobacterianos que puedan ser valiosos en el diagnóstico de la tuberculosis, está vinculado no solo con que sean específicos de *M. bovis*, sino que también es importante, la identificación de antígenos que puedan diferenciar entre una enfermedad activa o en estado de latencia (91); teniendo en cuenta que la variación en la respuesta a diferentes proteínas puede ser atribuida a la versatilidad en el patrón de reconocimiento antigénico de cada animal (92). Asimismo no basta un solo antígeno para llegar al diagnóstico de la enfermedad, sino que la mejor opción resulta de la combinación de diversas proteínas (92).

IX. CONCLUSIÓN

- ★ Las condiciones óptimas para realizar el ensayo ELISpot BoIFN- γ son utilizando 5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb de captura con 3×10^5 de PBMC.
- ★ De las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5. Las que presentan un pH ácidos estimulan la producción de IFN- γ en animales infectados.
- ★ Las fracciones 1, 6 y 15 obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 estimulan a las células mononucleares de sangre periférica productoras de IFN- γ en la prueba de ELISpot BoIFN- γ .
- ★ La sensibilidad y especificidad para la prueba de ELISpot BoIFN- γ con PPD_b es de 61 y 78 % respectivamente empleando un punto de corte de 60 SCF.
- ★ De las fracciones obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 la máxima sensibilidad y especificidad en la prueba de ELISpot BoIFN- γ con la fracción 1 fue de 57 y 83 % respectivamente. Para la fracción 6 fue de 52 y 61% , y con la fracción 15 fue de 60 y 52 %.

X. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados del presente trabajo sugieren la identificación de las proteínas presentes en las fracciones 1 (pI 3), 6 (pI 5) y 15 (pI 9.5) obtenidas a partir de la separación por isoelectroenfoque del filtrado de cultivo de *M. bovis* AN5 para su análisis en el diagnóstico de la TB_b.

REFERENCIAS

1. Good M, Duignan A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Vet Med Int.* 2011;12.
2. Pollock JM, Welsh MD, McNair J. Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108(1-2):37-43.
3. Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer M V., Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, et al. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(12):1827-35.
4. Xin T, Jia H, Ding J, Li P, Yang H, Hou S, et al. Assessment of a protein cocktail-based skin test for bovine tuberculosis in a double-blind field test in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(4):482-90.
5. Magee DA, Conlon KM, Nalpas NC, Browne JA, Pirson C, Healy C, et al. Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis.* 2014;94(4):441-50.
6. Rue-Albrecht K, Magee D a., Killick KE, Nalpas NC, Gordon S V., MacHugh DE. Comparative Functional Genomics and the Bovine Macrophage Response to Strains of the *Mycobacterium* Genus. *Front Immunol.* 2014;5(536):14.
7. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(12):761-76.
8. Kalyuzhny AE. *Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols.* 2 ed. Totowa, New Jersey: Human Press Inc. 2012
9. Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, et al. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2014;97(Suppl):44-52.
10. Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer M V., Bannantine JP, Stabel JR, Whipple DL, et al. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for diferenciación on infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subs. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11(4):729-35.

11. Parthasarathy S, Veerasami M, Appana G, Chandran D, Das D, Srinivasan VA. Use of ESAT-6-CFP-10 fusion protein in the bovine interferon-gamma ELISPOT assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J Microbiol Methods. 2012;90(3):298-304.
12. Aagaard C, Govaerts M, Meng Okkels L, Andersen P, Pollock JM. Genomic Approach to Identification of *Mycobacterium bovis* Diagnostic Antigens in Cattle. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3719-28.
13. Van Rhijn I, Godfroid J, Michel A, Rutten V. Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small models. Microbes Infect . 2008;10(7):711-5.
14. Maggioli MF, Palmer M V., Thacker TC, Vordermeier HM, Waters WR. Characterization of effector and memory T cell subsets in the immune response to bovine tuberculosis in cattle. PLoS One. 2015;10(4):20.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Recuperado a partir de: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=725&IdUrl=1251&objeto=Documento&IdObjetoBase=725&down=true>
16. SENASICA. Situación Actual. [citado mayo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>
17. Plan estratégico conjunto entre Estados Unidos-México para la colaboración en tuberculosis bovina 2013-2018.
18. Portillo-Gómez L, Sosa-Iglesias EG. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients. Int J Tuberc Lung Dis. 2011;15(10):1409-14.
19. Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res. 2005;36(3):411-36.
20. Milián-Suazo F, Pérez-Guerrero L, Arriaga-Díaz C, Escartín-Chávez M. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. Prev Vet Med. 2010;97(1):37-44.
21. Abalos P, Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev Sci Tech Off int Epiz. 2004;23(2):583-94.

22. Thoen C, LoBue P, De Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol.* 2006;112(2-4):339-45.
23. Gutiérrez Reyes JA, Casanova LG, Torres CR, Gallegos SLS, Alarcón GJC, Pezzat MM, et al. Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. *Prev Vet Med.* 2012;106(1):1-8.
24. Anteproyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). [citado febrero de 2015]. Recuperado a partir de: [http://207.248.177.30/mir/uploadtests/13553.59.59.2.MODIFICACI%C3%93N NOM031ZO-1995 AP FIRMADO VER-230207 CONAPROZ.doc](http://207.248.177.30/mir/uploadtests/13553.59.59.2.MODIFICACI%C3%93N%20NOM031ZO-1995%20AP%20FIRMADO%20VER-230207%20CONAPROZ.doc)
25. FAO- División de Producción y Sanidad Animal. Tuberculosis. EMPRES Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. [citado septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.fao.org/3/a-i2811s/i2811s01.pdf>
26. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica.* 7ed. Elsevier España; [citado agosto de 2015]. 872 p.
27. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle . *Vet Microbiol .* 1994;40(1-2):41-52.
28. Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle . *Vet Microbiol .* 1991;28:103-9.
29. McCorry T, Whelan AO, Welsh MD, McNair J, Walton E, Bryson DG, et al. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet Rec .* 2005;157(20):613-8.
30. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J .* 2002;163:115-27.
31. Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, et al. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle . *Infect Immun .* 2005;73(10):6467-71.
32. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422.
33. Kao RR, Gravenor MB, Charleston B, Hope JC, Martin M, Howard CJ. Shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection

- with bovine viral diarrhoea virus. *J R Soc Interface*. 2007;4(14):545-51.
34. Flynn RJ, Mulcahy G, Welsh M, Cassidy JP, Corbett D, Milligan C, et al. Co-Infection of cattle with fasciola hepatica and *Mycobacterium bovis* - Immunological consequences. *Transbound Emerg Dis*. 2009;(6-7):269-74.
 35. Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, et al. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(10):1356-61.
 36. Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, et al. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*. 2005;114(1):101-11.
 37. Jiménez M MC, Báez SR, Linares CM, Chávez SR, Lascurain LR, Zenteno GE. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2001;14(1):39-48.
 38. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, Van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010;15:433-50.
 39. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*. 2015;95(5):527-31.
 40. Hope JC, Thom ML, McCormick PA, Howard CJ. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;100(3-4):187-95.
 41. Hossain MM, Norazmi M-N. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection—The Double-Edged Sword? *BioMed Res Int*; 2013;2013(179174):18.
 42. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*. 1996;64(3):683-90.
 43. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis: Review. *Invest Clin*. 2015;46(4):391-412.
 44. Cooper AM. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis . *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422.
 45. de Martino M, Galli L, Chiappini E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? *BMC Infect Dis*. 2014;14(Suppl 1).

46. Zhang Q, Sugawara I. Immunology of tuberculosis. *World J Exp Med.* 2012;2(4):70-4.
47. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis . *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93-129.
48. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(5):297.e1-297 .e20.
49. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. 2^aed. ASM Press, Washington, D.C:2002 .
50. Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, et al. Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;136(1-2):1-11.
51. Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000;356(9235):1099-104.
52. de la Rúa-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 2006;81(2):190-210.
53. Hewinson RG, Vordermeier HM, Smith NH, Gordon S V. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol.* 2006;112(2-4):127-39.
54. Productos biológicos. [citado mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.rr-americas.oie.int/es/proyectos/Camevet/fichas/biologicos/TUBERCULINA_PPDbovina.htm
55. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol.* 2006;112:171-9.
56. Restrepo BI. Nuevas herramientas para la detección de la tuberculosis latente. *Biomed .* 2004;24(Supl.):202-11.
57. Ameni G, Cockle P, Lyashchenko K, Vordermeier M. T-cell and antibody response to mycobacterial antigens in tuberculin skin-test-positivo *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle in Ethiopia. *Vet Med Int.* 2012;2012(457872).
58. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine

- tuberculosis. *Tuberculosis*. 2001;81(1/2):147-55.
59. Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull*. 2010;93:69-84.
 60. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(4):245-52.
 61. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: New tools to tackle an old enemy. *Chest*. 2007;(6):1898-906.
 62. Buddle BM, Livingstone PG, de Lisle GW. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J*. 2009;57(4):173-80.
 63. Ameni G, Miörner H, Roger F, Tibbo M. Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*. 2000;32(5):267-76.
 64. Chiappini E, della Bella C, Bonsignori F, Sollai S, Amedei A, Galli L, et al. Potential Role of *M. tuberculosis* Specific IFN- γ and IL-2 ELISPOT Assays in Discriminating Children with Active or Latent Tuberculosis. *PLoS One*. 2012;7(9):6.
 65. Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer M V., Thacker TC, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(11):1882-8.
 66. Veerasami M, Moorthy L, Das D, Parthasarathy S, Chandran D, Lingala R, et al. Assessment of critical parameters in blood processing for the bovine interferon-gamma ELISPOT assay to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in India. *Vet Ital*. 2011;47(1):25-34.
 67. Wang L, Yu Y, Chen W, Feng J, Wang J, Zhao H, et al. Evaluation of the Characteristics of the Enzyme-Linked Immunospot Assay for Diagnosis of Active Tuberculosis in China. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(5):510-5.
 68. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(4):245-52.
 69. Bekmurzayeva A, Sypabekova M, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2013;93(4):381-8.
 70. Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M,

- Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing eSAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(5):797-803.
71. Mon ML, Moyano RD, Viale MN, Colombatti Olivieri MA, Gamieta IJ, Montenegro VN, et al. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. Biomed Res Int. 2014;2014:12.
 72. Meikle V, Alito A, Llera AS, Gioffre A, Peralta A, Buddle BM, et al. Identificación of novel *Mycobacterium bovis* antigens by disección of crude protein fracciones. Clin vaccine Immunol . 2009;16(9):1352-9.
 73. Gangadharam PRJ, Jenkins PA. Mycobacteria: Basic Aspects. Chapman & Hall Medical Microbiology Series. Springer Science & Business Media; 1998
 74. Alito A, Girvin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, Cataldi A. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by análisis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. Braz J Med Biol Res. 2003;36(11):1523-31.
 75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
 76. Rotofor System Instruction Manual. BioRad laboratories. Recuperado a partir de: <http://www.manuallib.com/file/2525594>
 77. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.
 78. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33(1):159-74.
 79. Espinoza Moreno N. Pruebas diagnósticas: curvas ROC. Med Univ. 2003;5(21):285-7.
 80. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. Revista chilena de infectología. 2012. p. 138-41.
 81. Armesto D. Pruebas diagnósticas: curvas ROC. Recuperado a partir de: <http://biomed.uninet.edu/2011/n1/armesto.html>
 82. Emma D, Alonso D, González Suárez R. Metodología científica análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. Rev Cuba Endocrinol. 2002;13(2):169-76.

83. Power CA, Grand CL, Ismail N, Peters NC, Yurkowski DP, Bretscher PA. A valid ELISPOT assay for enumeration of *ex vivo*, antigen-specific, IFN γ -producing T cells. *J Immunol Methods*. 1999;227(1-2):99-107.
84. Kalyuzhny AE. Handbook of ELISPOT. Methods and Protocols. USA:Human Press. 2005.
85. Moodie Z, Price L, Gouttefangeas C, Mander A, Janetzki S, Löwer M, et al. Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(10):1489-501.
86. Alexander N, Fox A, Lien VTK, Dong T, Lee LYH, Le Khanh Hang N, et al. Defining ELISpot cut-offs from unreplicated test and control wells. *J Immunol Methods*. 2013;(1):57-62.
87. Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun*. 1997;65(7):2587-92.
88. Díaz F, Massó F, Páez A, Varela E, Suárez-Güemes F, Montañó LF. Secretion of IFN-gamma by bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric-focusing. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999;67:203-12.
89. Deenadayalan A, Sundaramurthi JC, Raja A. Immunological and proteomic analysis of preparative isoelectric focusing separated culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(1):156-62.
90. Pollock JM, Pollock DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, et al. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology*. 1996;87(2):236-41.
91. Silva De Araujo L, De B Arbara Moreira Da Silva N, Da Silva RJ, Aparecida J, Leung M, Carvalho F, et al. Profile of interferon-gamma response to latency-associated and novel in vivo expressed antigens in a cohort of subjects recently exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2015;95(6):751-7.
92. Castro CM, Porrás TB, Guerrero MI, León CI, Mojica MA, Lara M, et al. Utilidad de una prueba serológica multiantigénica en el diagnóstico de tuberculosis. *Biomédica*. 2005;25:55-64.