

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**“Identificación de antígenos de *Mycobacterium bovis*  
para su aplicación en el diagnóstico de la tuberculosis  
bovina”**

**AUTOR: Meikle Maria Virginia**

**DIRECTOR: Dr. Cataldi Angel Adrian**

**CODIRECTOR: Dr. Maliandi Florestán**

**LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Biotecnología**

**INTA Castelar**

**MIEMBROS DEL JURADO: - Dr. Pennimpede EFF**

**- Bioq. Bernardelli Amelia**

**-Dra. Jorge Cristina**

**2006**

A Manuela, Oscar, Nona y la Negra

## ***AGRADECIMIENTOS***

Al instituto de Biotecnología de INTA Castelar, por haberme dado la oportunidad de desarrollar la tesis en sus laboratorios.

Al Dr. Angel Cataldi por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio, estar siempre acompañandome y haber confiado en mí ante la magnitud de este trabajo.

A la Dra. Alicia Alito porque fue una persona incondicional, con la que inicié el tema de trabajo y gracias a su elección me pude formar en la investigación.

Al Dr. Maliandi (Penky) por su gran apoyo desde mi comienzo en la Argentina en todo lo académico.

A la Dra. Ana Meikle (la Negra) que además de ser mi prima y amiga es una excelente investigadora y fue la que me ayudó a ordenarme con todos los datos, me asesoró en la parte estadística y fue el motor más fuerte en la concreción de unos de mis objetivos a nivel científico.

A la Dra. Elisa Carrillo (Lela) que además de ayudarme a conseguir la movilidad con la que hoy llego al INTA, confió en mí como Veterinaria del grupo.

A la Dra. Andrea Peralta por haberme guiado en el clonado de los antígenos.

A la Dra. Andrea Llera que me permitió ir a su laboratorio para realizar las 2D.

A mis compañeros del Laboratorio de Tuberculosis, Fabiana, Marisa, Paz, Vero, Laura, Nacho, Valeria, Martín, Andrea, Karina, Fede y Gabi, por los momentos compartidos.

A Jorge Lorenzo por todos los momentos compartidos durante los largos trayectos y días de muestreos.

A mis compañeros del Instituto de Biotecnología, Haydee, Susana M, Teresa, Silvio y Maria, Perla, Vero Nishi, Isa, Vilma, Nilda y Gustavo Ascenzo.

A mis padres porque siempre estuvieron apoyándome a lo largo de todos estos años y transmitiéndome mucha fuerza para seguir.

A mis queridos hermanos y sobrinos que los llevo en el alma.

A mi abuela (nona), fue la que me recibió siempre en su casa, me acompañó con mi postgrado en la facultad de La Plata, nunca dejo de llamarme al INTA o a mi casa para saber como estaba. Siempre será mi ejemplo de vida, su trabajo, su inteligencia, hoy con 92 años sigue al firme acompañándome.

A mi hija Manuela, que es mi principal motor, mi sol, por ser tan buena y responsable.

A mi compañero Oscar, doy gracias a Dios de haberlo conocido.

A Ceci mi amiga de tantos años que siempre me supo apoyar.

A mis amigos Guille y Dani por estar siempre al lado.

A Leti y Javi, mis grandes amigos Argentinos que gracias a ellos, a sus valores humanos hoy puedo terminar este gran objetivo.

A Alicia Ferron un ser maravilloso que logró rescatar todo mi potencial y sobre todo logró que confiara en mi persona.

A Laura y Norberto que me dieron el punta pié inicial para seguir perfeccionándome.

A todos los que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo de tesis.

Manuscritos:

Publicado

- **Optimizing antigens for *Mycobacterium bovis* Diagnosis in Herds with Different Disease Prevalence: ESAT6/CFP10 Mixture has Supreme Specificity and Sensitivity**

C. Aagaard<sup>1</sup>#, M. Govaerts<sup>2</sup>, V. Meikle<sup>3</sup>, A.J. Vallecillo<sup>4</sup>, J.A. Gutierrez-Pabello<sup>4</sup>, F. Suarez-Güemes<sup>4</sup>, J. McNair<sup>5</sup>, A. Cataldi<sup>3</sup>, C. Espitia<sup>4</sup>, P. Andersen<sup>1</sup> and J.M. Pollock<sup>5</sup>

Journal of Clinical Microbiology (JCM).

Enviado a publicar

- **Individual animals of a cattle herd infected with the same *M. bovis* genotype shows important variations in bacteriological, histopathological and immune response parameters.**

Meikle V,<sup>2</sup>; Schneider, M<sup>1</sup>; Azenzo, G<sup>2</sup>; Zumarraga, M<sup>2</sup>; Magnano, G.<sup>1</sup>; Cataldi, A.<sup>2</sup>

Journal of Veterinary Medicine (JVM)

## INDICE DE CONTENIDOS

1. Tuberculosis. Generalidades .....	1
1-1. Antecedentes históricos .....	1
1-2. Situación actual.....	3
2. Características Taxonómicas y Culturales .....	8
2-1. Características generales.....	16
2-2. Características particulares de <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> .....	19
2-2-1. Fisiológicas.....	19
2-2-1-1. <i>Mycobacterium bovis</i> .....	20
2-3. Estructura genómica .....	22
Introducción de la genómica funcional del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
3. Transmisión de <i>M. bovis</i> .....	26
3-1. De la fauna a los bovinos .....	26
3-2. <i>M. bovis</i> en el ganado .....	29
3-3. De ganado a humanos .....	29
3-4. De humanos a humanos .....	30
3-5. De humano a ganado.....	31
4. Naturaleza y estructura de las micobacterias .....	31
5- Patogenicidad.....	34
6- Inmunología de la tuberculosis .....	37
6-1. Interacción huésped-micobacteria .....	39
6-2. Respuesta inmune .....	40
6-3. Principales mediadores y células implicadas en la infección tuberculosa .....	45
6-3-1. Células linfocitarias T.....	45
6-3-2. Células T $\gamma\delta$ .....	50
6-4. Funciones efectoras de las células T y macrófagos en tuberculosis.....	51
6-4-1. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	51
6-4-2. Liberación de Citoquinas en la respuesta inmune.....	52
6-4-3. Células citotóxicas en tuberculosis.....	53
7. Antígenos .....	54

7-1. Metodologías y nomenclaturas empleadas en la identificación de los antígenos proteicos micobacterianos .....	55
7-2. Selección de los antígenos reconocidos por la población T (antígenos T).....	66
7-2-1. A partir de fracciones proteicas de micobacterias .....	66
7-3. Localización de las proteínas .....	69
7-3-1. <i>Proteínas de translocación y secreción</i> .....	70
7-3-2. <i>Antígenos proteicos</i> .....	70
7-3-3. <i>Antígenos polisacáridos</i> .....	71
8. Diagnóstico .....	72
8-1. <i>Examen bacteriológico</i> .....	72
8-2. <i>Examen histopatológico</i> .....	73
8-3. <i>Aspecto Macroscópico de la TBC</i> .....	74
8-4. <i>Estudio de cepa a nivel experimental</i> .....	75
8-5. Inmuno ensayos celulares .....	75
8-5-1. <i>in vivo</i> : Prueba de la tuberculina o cutánea .....	75
8-5-1-1. <i>Vieja tuberculina y PPD</i> .....	76
8-5-1-2. Reacción de tuberculina en el bovino.....	77
8-5-1-3. Test de tuberculina en uso .....	78
8-5-1-3-1. El simple test intradérmico .....	78
8-5-1-3-2. Ventajas y desventajas de su aplicación.....	81
8-5-1-3-3. Reacción de falso negativo en la reacción de tuberculina.....	82
8-5-1-3-4. Reacción de falso positivo al test de tuberculina .....	84
8-5-2. <i>In vitro</i> .....	84
8-5-2-1. Linfoproliferación o <i>lymphocyte transformation assay</i> (LTA) .....	84
8-5-2-2. Dosaje de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	85
8-6. Ensayos humorales .....	89
8-6-1. ELISA .....	89
8-6-2. MAPIA .....	92
8-6-3. Immunocromatografía .....	93
8-7. Breve reseña del diagnóstico directo .....	94
8-8. Diagnóstico y tipificación por técnicas moleculares.....	95
8-8-1. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	95
9. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	99
9-1. <i>Introducción</i> .....	99
9-2. <i>Clonado en un vector plasmídico</i> .....	99
9-3. <i>Expresión de genes mediante promotores inducibles</i> : .....	100

9-3-1. <i>Promotores regulable</i> .....	101
9-4. <i>Regulación de la expresión del gen</i> .....	103
9-5. <i>Purificación de proteínas con el sistema pET de unión a histidina (HIS-tag)</i> .....	105
10. <i>Objetivos</i> .....	108
11. <i>Materiales y Métodos</i> .....	111
11-1. <i>Diseños experimentales</i> .....	111
11-2. <i>Animales</i> .....	115
11-2-1. <i>Animales experimentalmente infectados</i> .....	115
11-2-2. <i>Animales naturalmente infectados</i> .....	116
11-3. <i>Obtención de las fracciones Antigénicas</i> .....	117
11-3-1. <i>Sobrenadante y extracto del cultivo celular</i> . .....	117
11-3-2. <i>Fraccionamiento de las proteínas del medio de cultivo por corrida electroforética (SDS-PAGE)</i> .....	118
11-3-3. <i>Electroforesis en 2 dimensiones</i> .....	118
11-4. <i>Expresión y purificación de M. bovis Rv1636, Rv0138, Rv2524c, EsxV, Rv3740 y HspX</i> .....	119
11-5. <i>Antígenos recombinantes</i> .....	121
11-6. <i>Composición de las diferentes combinaciones de antígenos y sus concentraciones</i> .....	123
11-7. <i>Prueba de IFN<math>\gamma</math></i> .....	123
11-8. <i>Preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)</i> .....	124
11-9. <i>Extracción de ADN</i> .....	125
11-10. <i>Protocolo de PCR</i> .....	126
11-11. <i>Producción de anticuerpos policlonales de las proteínas recombinantes</i> .....	127
11-12. <i>Análisis estadístico</i> .....	128
12. <i>Resultados</i> .....	129
12-1. <i>Obtención e identificación de fracciones antigénicas</i> .....	129
12-2. <i>Diseño experimental I: Selección de fracciones antigénicas</i> .....	131
12-3. <i>Diseño experimental II: Evaluación de la respuesta inmune de 3 fracciones antigénicas de M. bovis en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo</i> .....	133
12-4. <i>Clonado de los antígenos identificados de M. bovis en las fracciones inmunoestimulantes en estudio</i> .....	134
12-5. <i>Diseño experimental III: Evaluación de la respuesta inmune de los nuevos antígenos recombinantes de M. bovis, en animales naturalmente infectados</i> .....	139
12-5-1. <i>Sensibilidad y Especificidad de ensayos basados en las proteínas identificadas</i> . .....	139
12-5-2. <i>Índice de densidad óptica (liberación de IFN<math>\gamma</math>) de los diferentes antígenos</i> .....	140
12-5-3. <i>Resultados de la reacción tuberculínica (PPD) de los animales del corral y del examen post-mortem</i> .....	142



12-6. Diseño experimental IV: Evaluación de la respuesta inmune celular (IFN $\gamma$ , de antígenos recombinantes de <i>M. bovis</i> , ensayados en forma individual y en distintas combinaciones, en animales naturalmente infectados. ....	142
12-7. Diseño experimental V: Evaluación de la respuesta inmune de los antígenos recombinantes de <i>M. bovis</i> en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo.....	144
12-8. Diseño experimental VI: Evaluación de la respuesta inmune de los antígenos recombinantes de <i>M. bovis</i> en animales naturalmente infectados .....	147
12-8-1. <i>Sensibilidad y Especificidad de las diferentes antígenos</i> .....	147
12-8-2. <i>Índice de densidad óptica (liberación de IFN-<math>\gamma</math>) de los diferentes antígenos</i> .....	149
12-9. Diseño experimental VII: Evaluación de la respuesta inmune de un antígeno recombinante y 3 combinaciones en animales naturalmente infectados en diferentes regiones .....	154
<i>Índice de densidad óptica (liberación de IFN-<math>\gamma</math>) de los diferentes combos</i> .....	154
12-10. Diseño experimental VIII: Evaluación de diferentes técnicas diagnósticas en 14 animales naturalmente infectados .....	159
12-11. PCR de muestras de hisopados nasales.....	164
12-12. Obtención de anticuerpos policlonales .....	166
13. Discusión.....	167
14. Conclusiones .....	185
15. Bibliografía .....	187

**ABREVIATURAS**

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato
dNTP	desoxiribonucleósido trifosfato
DTT	ditiotreitól
IDO	índice de densidad óptica
EDTA	Acido Etil diaminotetracético
h	Horas
IEF	isoelectroenfoque
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IPTG	isopropil-b-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltons
LB	medio de Luria-Delbruk
mA	miliamper
mg	miligramos
m	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MPM	marcador de peso molecular
NBT	azul de nitrotetrazolio
ng	nanogramos
ORF	marco abierto de lectura

PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBCM	células mononucleares de sangre periférica
PWM	powenmitogen
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TRIS	hodroximetilaminometano
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrometros
uv	ultravioleta
vol	volumen
IDR	intradermorreacción
DPP	derivado proteico purificado

## **“Identificación de antígenos de *Mycobacterium bovis* para su aplicación en el diagnóstico de la tuberculosis bovina”**

*Mycobacterium bovis*, tuberculosis bovina, antígenos proteicos, Interferón gamma, animales naturalmente y experimentalmente infectados.

### Resumen

El objetivo fundamental del desarrollo de esta tesis es la obtención de nuevas proteínas que mejoren el diagnóstico de la tuberculosis bovina dado que el test intradérmico de tuberculina, como única prueba diagnóstica de esta enfermedad, da reacción cruzada con otras micobacterias no tuberculosas (MNT) o sea baja especificidad además de tener también baja sensibilidad. Se le suma a ello el inconveniente operativo de la necesidad de inmovilizar los animales dos veces en 72 h para la realización de esta prueba.

Se puso a punto la metodología de electroelución que brinda la posibilidad de obtener fracciones antigénicas de *M. bovis*. Se partió de un medio líquido libre de proteínas donde se cultivó *M. bovis*. A partir del mismo se obtuvieron las proteínas totales. Se seleccionaron las fracciones antigénicas estimulantes de la respuesta T en bovinos experimentalmente infectados. Esta selección se basó en la capacidad de las fracciones de estimular la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Con el procedimiento que se plantea en esta tesis, se obtienen proteínas antigénicas de *M. bovis*. Se aislaron los componentes proteicos de dichas fracciones mediante electroforesis en 2D para identificar por Maldi-TOF cada una de las proteínas. El paso siguiente fue la obtención de proteínas recombinantes. Se clonaron los genes respectivos en un plásmido vector multicopia para aumentar la eficiencia de la expresión. Las proteínas recombinantes ya

purificadas se evaluaron para medir su especificidad en animales libres de infección pertenecientes a campos libres de tuberculosis y en animales naturalmente infectados para determinar su sensibilidad. Se evaluó la respuesta inmune celular con las distintas proteínas recombinantes en 291 bovinos. Se observó que la combinación de antígenos ESAT6, CFP10 y tb11.5 aumenta la sensibilidad y especificidad de la técnica de IFN- $\gamma$ . Esta conclusión es de suma importancia para el mejoramiento de las pruebas diagnósticas. El diagnóstico por PCR es un método directo y en esta tesis, éste confirma la efectividad del test de IFN- $\gamma$  y de los antígenos empleados para la detección de animales infectados con *M. bovis*.

## **“Identification of *M. bovis* antigens and their application in bovine tuberculosis”**

*Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, antigenic proteins, gamma interferón, natural and experimentally infected animals.

### Summary

The general aim of the present thesis was to obtain novel proteins for the improvement of the diagnosis of bovine tuberculosis, since the skin test cross-reacts with non-tuberculosis mycobacteria. Moreover, for the skin test reaction there is a need to immobilize the animals two times 72 hs apart- to realize the test.

In order to obtain the antigen fractions of *M. bovis*, the electro-elution methodology was set up. *M. bovis* was cultivated in a protein-free liquid media, from which the total proteins were obtained. Antigen fractions that stimulated the T response in experimentally bovines infected were selected; the selection was based in their capacity to produce interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). The protein components were separated by electrophoresis in 2D, and each of the proteins was identified by Maldi-TOF. Then, the recombinant proteins were obtained. The respective genes were cloned in a vector multicopies plasmid to increase the efficiency of the expression. The recombinant purified proteins were evaluated for their specificity in animals belonging to farms free of tuberculosis, and for their sensitivity in naturally infected animals. The immune cellular response was+ evaluated with different recombinant proteins in 291 bovines. The combination of

the antigens ESAT6, CFP10 and tb11.5 increased the sensitivity and specificity of the IFN- $\gamma$  methodology. This finding is of main importance for the improvement of the diagnosis of bovine tuberculosis. PCR diagnosis is direct method and in this work confirmed the effectiveness of the IFN- $\gamma$  and the antigens used for the detection of *M. bovis* infected animals.

# **Introducción**

A decorative L-shaped line consisting of a vertical line on the right side and a horizontal line at the bottom, both rendered in a double-line style.



## **1. Tuberculosis. Generalidades**

La tuberculosis es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, hay entre 8 y 10 millones de nuevos casos de tuberculosis activa y 3 millones de muertes por año, la mayor parte de la población infectada no desarrolla enfermedad, el patógeno solo persiste. En América Latina entre los años 1953 y 1985, se describió un declive del número de casos. Sin embargo se observó un cambio radical entre los años 1985 y 1992. Este resurgimiento se atribuyó a la epidemia de HIV, el aumento en el número de inmigrantes de países con alta prevalencia de la enfermedad y la poca importancia en los programas de Salud Pública (1).

### **1-1. Antecedentes históricos**

Esta enfermedad, producida por *Mycobacterium tuberculosis*, afecta principalmente al ser humano. En el período paleolítico la gente vivía como nómada y no se congregaban en grandes grupos, era una enfermedad que se daba probablemente en forma esporádica, pero la difusión de la enfermedad fue ocurriendo lentamente junto con el aumento de densidad poblacional. En la historia temprana de la humanidad, en el siglo XVII, XVIII y XIX, la enfermedad comenzó a diseminarse y hacerse epidémica en el oeste de Europa. Como consecuencia de la Revolución Industrial, en algunos países hubo cambios migratorios de comunidades agrarias a urbanas. Coincidiendo con esos cambios se dieron malas condiciones sanitarias y mala nutrición, las cuales diseminaron al bacilo. Durante el siglo XVIII y XIX la tuberculosis pulmonar se conocía como Plaga Blanca siendo causa de muerte en el oeste de Europa y en Estados Unidos. En 1700

y principio del 1800 se dio el pico de prevalencia de la tuberculosis al Oeste Europeo y Estados Unidos, fue la causa más grande de muerte (2) y 100 a 200 años más tarde difundió al Este Europeo, Asia, África y América del Sur. En el pulmón de una momia al sureste del Perú (700 años después de Cristo) fueron observados bacilos ácido alcohol resistente, luego observaron otros casos de tuberculosis en otras momias en Sudamérica (3). En el norte de África fue descrita la tuberculosis en varias figurillas de tribus nómades (3000 años antes de Cristo). También fueron observados cambios típicos de tuberculosis en el esqueleto de momias Egipcias (4). En la primera mitad del siglo XIX la industrialización en India hizo que se diera un incremento de tuberculosis por el aumento de densidad poblacional. En Sudáfrica fue descrita tuberculosis a mediados del siglo XX (5).

A las deformidades que presentaron los esqueletos hallados en Perú (160 AC) afectando la espina dorsal se las denominó enfermedad de Pott. Morse sostiene que la prevalencia de la tuberculosis en los huesos observada en especímenes paleopatológicos es menor que la que uno debería encontrar si la enfermedad hubiese sido común en la América prehistórica (6). La enfermedad de Pott se identifica en el arte primitivo indígena americano con un grado variable de certeza (7). Las representaciones de probables tuberculosis espinales se han encontrado en piezas artísticas en Norte América, Sud América, América Central y el Caribe. La presencia de tuberculosis en las momias de Perú y Chile nos permitiría asumir que la tuberculosis llegó a América con los inmigrantes del primer período y no con los que entraron posteriormente.

## 1-2. Situación actual

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis (Tb.), con aproximadamente 8 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, y que la mayoría de las personas infectadas reside en países en desarrollo tales como Asia, África y América Latina. (8). Para los infectados con HIV y *M. tuberculosis*, la probabilidad de desarrollar enfermedad activa es aproximadamente 10% por año. Los individuos con enfermedad tuberculosa activa, son causa de unos 2 millones de muertes por año (9). La severidad de esta epidemia global es exacerbada por la concomitante epidemia de infección HIV, porque en algunos países del mundo donde la incidencia del HIV es alta, la incidencia de tuberculosis también es alta. El efecto sinérgico de las dos enfermedades ha profundizado las implicancias económicas tan bien como el sufrimiento humano.

La OMS estima que entre los años 2002 y 2020 aproximadamente 1.000 millones de personas se infectarán, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis (10). Es una enfermedad que afecta fuertemente a las clases sociales más bajas, principalmente en los países económicamente deteriorados. En la década del 90 se produjo un aumento de casos de Tb. debido al debilitamiento de los programas de control, al impacto de la epidemia de SIDA que, al generar un estado de inmunodeficiencia, predispone al desarrollo de la Tb. y a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* que resisten a los antibióticos de primera línea. En Argentina, se notificaron 11.464 casos de tuberculosis humana en el año 2001, según lo informado por el Instituto Nacional de Epidemiología de Santa Fe *Emilio Coni* (11, 12). Además,

de casos notificados entre el 1983 y 2001 variaron entre 30 y 60 casos cada 100.000 personas, con una mortalidad estimada de 2,5 a 5,4 cada 100.000 personas, en el año 2001 hubo 936 muertes (13).

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica, zoonótica, causada por *Mycobacterium bovis* cuyo huésped primario es el ganado vacuno. Los países más afectados en América Latina son Argentina y Brasil. Existen tres tipos de situaciones en cuanto a la información acerca de la distribución de la tuberculosis bovina en América (14). En primer término en los países en los que se han aplicado programas de control y erradicación de la infección con métodos de prueba y sacrificio, como Canadá, Estados Unidos y Cuba, o en los que aparentemente no se ha introducido, como algunas islas del Caribe. En segundo término, los países en los que los niveles de infección han sido naturalmente bajos y se han desarrollado programas para mantener o disminuir esa situación, como Panamá, Costa Rica, Jamaica, Trinidad-Tobago, República Dominicana, Venezuela, Uruguay, Paraguay, norte de México y sur de Chile. En tercer término, los países que reconocen que el problema es importante, como Argentina, Brasil, Colombia y Perú, y aquellos sobre los que existe escasa información, como Ecuador, Bolivia, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Honduras. Ventitrés de 34 países de América Latina y el Caribe que enviaron información a la OPS/OMS en 1990-1991 ya se encontraban libres o en etapas cercanas a la erradicación, entre ellos USA, Canadá y otros países de América Central y el Caribe (15). En 1983 se comenzó con programas de saneamiento de carácter voluntario en grandes establecimientos ganaderos. Argentina, con una población estimada de 50 millones de cabezas, presenta actualmente una prevalencia por animal del 4% y un porcentaje de establecimientos infectados de alrededor del 37% (16). La mayor parte de datos disponibles acerca de la situación de la tuberculosis animal en Argentina, proviene de los informes de

decomisos de frigoríficos de bovinos. Estos datos proveen una información parcial, ya que brindan una prevalencia estimada sobre la faena en planta, o para la probable zona de origen de los bovinos, pero no determinan la localización de los rodeos (17). El número de frigoríficos que generan esta clase de información es muy variable, dependiendo de la región. En Argentina, los decomisos realizados en frigoríficos con inspección oficial en los años 1986-96, alcanzó un promedio cercano al 4% sobre aproximadamente 10.000.000 de animales faenados anualmente (18).

En el período 1995-1997, en los frigoríficos con Inspección federal se informó que el 1,35% de los animales faenados examinados, poseían lesiones macroscópicas compatibles con lesiones tuberculosas (18). Gladis Rébak, de la Universidad Nacional del Nordeste trabajó sobre la manifestación de la tuberculosis bovina pos-mortem en un frigorífico de la ciudad de Corrientes, durante los años 2003-2004, ver tabla 1 (19).

**Tabla 1- Manifestación de tuberculosis bovina post mortem.**

<b>Provincia</b>	<b>Total faenados</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Porcentaje</b>
Corrientes	1629	107	6,57%
Catamarca	157	6	3,82%
Entre Ríos	413	23	5,57%
Santa Fe	890	87	9,78%
Formosa	1680	108	6,43%
<b>Total</b>	<b>4769</b>	<b>331</b>	<b>6,94%</b>

Los órganos más afectados fueron: pulmón (35%), ganglios de cabeza (30%), ganglios de hígado y mesenterio (10%).

De la información suministrada por el área estadística de la Dirección de Contralor del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), sobre un promedio de faena de bovinos anual de 10.000.000, las tasas de prevalencia de tuberculosis bovina detectada en faena en el período 1969-2005 fue disminuyendo en el rango de 6,7% a 1,2 % (18).

Es por el futuro de la producción lechera y cárnica que se debe mejorar la calidad de los productos que puedan colocarse en el mercado interno y externo, para lo cual debe producirse leche y carne de calidad higiénica y sanitaria, por esto se destaca la importancia del control tuberculínico del ganado de abasto y de vacas lecheras con eliminación del rodeo de los animales que resulten positivos a dicha prueba.

A partir de marzo de 1999 se aprobó la resolución N<sup>o</sup> 115/99 que establece que el Programa Nacional de lucha contra la Tuberculosis Bovina implemente el control y erradicación de la enfermedad mediante el saneamiento realizado por productores y médicos veterinarios acreditados.

Esta enfermedad es similar a la tuberculosis humana. El contagio suele efectuarse por inhalación o ingestión. Cuando los animales permanecen en establos es más probable la primer ruta, la segunda es más frecuente cuando los animales permanecen en campos, y contaminan los alimentos y el agua común de bebida. Existe también transmisión vertical, de la vaca infectada a su ternero a través de la leche durante el amamantamiento o congénita a través del cordón umbilical durante la preñez (20). Una vía menos común es la infección intrauterina durante el coito, por uso de semen infectado en la inseminación artificial y la infección intramamaria por el empleo de sifones de pezón contaminados.

Con el desarrollo de la industria ganadera, en Europa y en América, a fines del siglo XIX y principios del siglo XX, se pusieron de manifiesto los efectos negativos de esta enfermedad, causante de la baja producción de leche y de carne del ganado infectado. Los deterioros que se ocasionan en la crianza y en la explotación del ganado bovino fueron los principales motivos que indujeron a distintos países del continente americano a desarrollar planes de control y erradicación de la tuberculosis. Las pérdidas indirectas más importantes son la disminución en los valores de comercialización de los animales, sus productos y subproductos dentro y fuera del país. Se estima una pérdida mundial anual económica relacionada con la agricultura, de 3000 millones de dólares (21). La pérdida económica anual que produce la tuberculosis bovina en Argentina es de aproximadamente 64 millones de dólares (15), debidas principalmente a la pérdida de peso de los bovinos (36%), pérdida de producción lechera (13%), y el decomiso en mataderos (10%) (18). La tuberculosis bovina representa una condicionante que limita la comercialización de productos pecuarios. La repercusión económica, va más allá de la simple eliminación de animales reactivos, debido a que los bovinos provenientes de rodeos infectados, y que como consecuencia de ello no cuentan con la acreditación de libre, expedida por el organismo de control (SENASA), tienen problemas en la comercialización. Dentro de ésta limitación, se ven afectados principalmente aquellos animales que son destinados a reproducción (19).

Además, debemos considerar su incidencia en la Salud Pública, debido a que el *M. bovis* infecta al ser humano causando una enfermedad similar a la producida por el *M. tuberculosis*. Las fuentes de contagio son los lácteos no pasteurizados y el contacto de peones, veterinarios, trabajadores de los frigoríficos y carniceros con bovinos tuberculosos y sus derivados, durante la inspección y faena en frigoríficos; y en momentos en que se realiza la extracción de leche en el

tambo. La enfermedad humana por *M. bovis* representa un 0,5% de los casos de confirmación bacteriológica ocurrida en el país, llegando a alcanzar un 6% en la provincia de Santa Fé.

## 2. Características Taxonómicas y Culturales

El género *Mycobacterium* propuesto por Lehmann y Neumann (1896), incluían el bacilo tuberculoso y leproso, organismos que previamente habían sido clasificados como *Bacterium leprae* y *Bacterium tuberculosis* (22). Taxonómicamente, se puede clasificar al género *Mycobacterium* dentro de la familia *Mycobacteriaceae*. Esta familia pertenece al orden *Actinomycetales*, el cual está compuesto por diversas familias, algunas de las cuales contienen organismos patógenos. Asimismo, algunas de estas bacterias presentan características morfológicas y bioquímicas que son compartidas con los hongos (23). El género *Mycobacterium* es ampliamente diverso; cuenta en este momento con 85 especies diferentes identificadas. La primera identificación, fue la de *M. leprae* hecha por Hansen en 1873, especie que aún no se ha podido cultivar *in vitro* (24). Dentro de las micobacterias cultivables se las puede diferenciar en dos grandes grupos: micobacterias que conforman el complejo *M. tuberculosis* y las no tuberculosas que no están incluidas dentro de dicho complejo. A estas últimas se las conoce con distintos nombres: Saprófitas (de origen ambiental), atípicas, oportunistas o Micobacterias No Tuberculosas (MNT) dado que no producen tuberculosis ni se transmiten entre los hospedadores. La gran mayoría de las especies micobacterianas son las ambientales o saprófitas (25). Interfieren en las pruebas diagnósticas que se utilizan para la identificación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* dado que son las responsables de las reacciones cruzadas que se presentan disminuyendo así la especificidad de la prueba. Las micobacterias atípicas exhiben limitada



patogenicidad en el hombre, pero especies particulares tales como: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. ulcerans* tienen la capacidad de causar síndromes semejantes a tuberculosis en pacientes inmunosuprimidos. *M. avium* produce tuberculosis en aves y porcinos. *M. ulcerans* causa la enfermedad de Buruli, es una enfermedad progresiva ulcerativa y necrótica, de tejido subcutáneo y piel. Se la considera como la tercera forma más común de enfermedad de las micobacterias, después de tuberculosis y lepra (26).

Las micobacterias se han adaptado a varias condiciones ambientales y crecen en el suelo (27) y en el agua de varias regiones del mundo (28). Ellas pueden vivir en una gran variedad de aguas naturales tales como agua fresca, salada, tratada (como el agua que contiene las piletas de natación) y en agua bebible en las cuales ellas rápidamente se diseminan a través de aerosoles. Poco se sabe de los requerimientos metabólicos de estas bacterias en los nichos naturales. Por ejemplo, en los sistemas de distribución de agua potable, *M. avium* se aísla de las muestras de agua, mientras que a *M. intracellulare*, especie relacionada en forma cercana a *M. avium*, se la recupera de los biofilms (29). Las especies *M. intracellulare* y *M. avium* comprenden el complejo *M. avium* (MAI). Unas pocas especies micobacterianas, tales como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, fueron identificadas respectivamente en humanos y ganado. Ambas, son capaces de infectar otras especies animales pero nunca han sido identificadas en el medio ambiente (30, 31). Esto sugeriría que estos organismos son parásitos obligados en humanos y animales. Sin embargo, no se pueden dar conclusiones definitivas porque existen aún muchos nichos ambientales inexplorados. Es prueba de esto que *M. ulcerans* fue recientemente identificado en el medio ambiente (32, 33) y un ejemplo más lo ofrece *M. leprae* que se pensaba que su hábitat era estrictamente humano hasta que se encontró infección natural en armadillos de nueve bandas (34, 35).

Lehmann y Neumann, observaron las micobacterias en medio aeróbico, donde no forman cápside, conidios o endosporas, raramente exhiben hifas aeróbicas visibles, son catalasa positiva y negativa, produce ácido de la oxidación de azúcares, lo que las hizo diferenciables de *Corynebacterium difteriae* y *Nocardia asteroides*. *Corynebacterium* no es ácido alcohol resistente y *Nocardia* fue definida como actinomicetal que produce micelio. Estas especies presentan características que permiten su agrupación según diferentes criterios. Entre las más utilizadas se encuentran las clasificaciones de acuerdo a la producción de pigmento, a la velocidad de crecimiento y a la patogenicidad, aunque estos criterios suelen interrelacionarse.

Con excepción de *M. leprae* que no pudo ser cultivada *in vitro*, se clasifican de acuerdo a la velocidad de crecimiento en dos grupos taxonómicos: especies de crecimiento rápido, que crecen con determinada cantidad de nutrientes y temperatura adecuada, donde se visualizan colonias en medio sólido con 7 días de sembrado; y las de crecimiento lento que necesitan semanas para crecer en las mismas condiciones.

Las micobacterias de crecimiento rápido, que son comúnmente saprófitas en hábitat natural, se sabe menos que las de relevancia clínica de lento crecimiento.

En 1950 se estableció un nuevo criterio de clasificación, con la introducción de la aplicación de técnicas quimiotaxonómicas, según la composición de azúcares, aminoácidos y la estructura de peptidoglicanos de la pared.

Las micobacterias se caracterizan por tener una pared celular completamente distinta a las restantes eubacterias. La pared de las micobacterias poseen un alto contenido de lípidos que la hace impermeable a los agentes hidrofílicos, por lo que no se tiñen con los reactivos utilizados en la coloración de Gram. Las micobacterias son teñidas por el método de Ziehl-Neelsen (BAAR), que utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico. Una vez

coloreados, son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denominan Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR). Los microorganismos del género *Mycobacterium* contienen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica, que contiene N-glucolilmurámico. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano se halla unido covalentemente al arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan fijados los ácidos micólicos, éstos son ácidos grasos  $\alpha$ -ramificados y  $\beta$ -hidrolizados de alto peso molecular (cadenas carbonadas largas C60-C90), la diferencia con corinebacterias y nocardias es que son más cortas las cadenas de los ácidos grasos.

La composición de la pared de las micobacterias en ácidos micólicos, lípidos polares y glicolípidos, también aporta datos para la clasificación. El criterio de clasificación según la patogenicidad presenta algún grado de controversia. Clásicamente se ha considerado que las micobacterias deben ser divididas en patógenas, potencialmente patógenas y saprófitas; o en parásitos obligados, saprófitas y formas intermedias (36). Sin embargo, algunos autores consideran que el hecho de incluir a *M. avium* y *M. paratuberculosis* (actualmente, *M.a..subsp. paratuberculosis*) entre las micobacterias potencialmente patógenas y no entre las patógenas, demuestran que dicha clasificación está realizada desde un criterio excesivamente de medicina humana (37). Karlsen (38) las clasifica en especies patógenas para el hombre y los animales; especies parásitas y patógenas para los animales de sangre fría, y especies saprófitas. van Soolingen D et al. (1994) (39) proponen la división en micobacterias patógenas y apatógenas; y establecen una relación entre este tipo de criterio de patogenicidad y velocidad de crecimiento. Estos autores señalan que el 78% de las especies de crecimiento lento se han involucrado en enfermedades humanas y animales, mientras que sólo el 15% de las especies de crecimiento rápido, han sido relacionadas con alguna enfermedad humana o animal. Sin embargo, no puede

obviarse la importancia de las micobacterias llamadas apatógenas, la cual radica en que, aunque no se las ha aislado de lesiones orgánicas naturales, pueden generar sensibilización e inferir con las pruebas diagnósticas.

En 1959, Runyon (40) desarrolló una clasificación fenotípica para las micobacterias, es decir tanto aquellas micobacterias aisladas de enfermedades del hombre y los animales, así como las aisladas del medio, basada en la producción de pigmento y la velocidad de crecimiento. Los llamados grupos de Runyon se observan en la tabla 2.

**Tabla 2- Clasificación de micobacterias atípicas, grupos Runyon.**

Grupo		Producción de pigmento	Velocidad de crecimiento
I	Fotocromógenas	Amarillo	Lento (2-4 semanas)
II	Escotocromógenas	Amarillo-anaranjada	Lento
III	No cromógenas	Incoloro o ligeramente amarillo	Lento
IV	De crecimiento rápido	Incoloras o pigmentadas	Rápido (1-4 días)

Esta fue una clasificación provisional (41) que se fue modificando con el uso de nuevas técnicas diagnósticas. En un relevamiento realizado en la provincia de La Pampa (42) se investigó la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en 40 muestras de suelo pertenecientes a 4 regiones. Se realizaron 27 aislamientos de MNT, *M. phlei* en 18,5% y *M. kansasii* en 11,1% de las muestras. Durante la investigación del poder patógeno de dichas MNT se demostró su capacidad para generar lesiones granulomatosas en ratones. La importancia de las micobacterias atípicas se ha incrementado en los últimos años debido a los aislamientos provenientes de pacientes HIV (+) (43). Una característica del género *Mycobacterium* es que algunas de las

especies presentan un grado de similitud que torna dificultosa la diferenciación por los métodos rutinarios de laboratorio. Esta particularidad es la llamada “complejo” o “complex” y se relaciona con la notable homología de sus genomas.

El complejo *M. tuberculosis* incluye siete miembros:

- *M. tuberculosis*
- *M. africanum*,
- *M. bovis*,
- *M. microti*,
- *M. canettii*,
- *M. caprae*
- *M. pinnipedii*.

*M. tuberculosis*, es el miembro más relevante de este género en función de su importancia clínica. Es la causa común de tuberculosis en humanos. Aproximadamente 8 millones de nuevos casos de tuberculosis se informan anualmente en el mundo dando como resultado 1,9 millones de muertes (44). *M. bovis* infecta a un amplio rango de animales domésticos y salvajes así como también a humanos. La enfermedad que produce en humanos es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*. Las infecciones de *M. bovis* generalmente se transmiten al hombre a través de la leche no pasteurizada o productos lácteos de vacas infectadas. *M. africanum* causa el mismo síndrome en humanos que *M. tuberculosis* y ha sido aislada de humanos y monos de África (45, 46). *M. microti* difiere de las otras cepas del complejo tuberculoso en su morfología, porque el bacilo adopta una forma curva o en S en la tinción de Ziehl-Neelsen, en su crecimiento *in vitro* es muy lento y en los distintos huéspedes en que es patógeno (47, 48, 49). Causa tuberculosis en el ratón campestre europeo, en el ratón de los bosques (*Apodemus sylvaticus*) y en la musaraña

(*Sorex araneus*) que es un mamífero insectívoro parecido a las ratas. Ha mostrado tener muy baja virulencia en cobayos y en humanos. Sin embargo, actualmente se caracterizaron aislamientos de *M. microti* provenientes de distintas fuentes usando nuevos marcadores genéticos (50). Tanto *M. africanum* como *M. microti* tienen propiedades intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Las características tanto bioquímicas como del crecimiento, y la sensibilidad a las drogas, de las varias subespecies del complejo *M. tuberculosis* están en la tabla 3 (51). El tipo de colonia lisa de *M. canettii* puede cambiar al tipo de colonia rugosa, la cual no es reversible aún después del pasaje por cobayo. Es interesante notar que el cambio del tipo de colonia de lisa a rugosa no altera ninguna de las propiedades indicadas en la tabla 3. Tampoco se presentan cambios a nivel de los marcadores genéticos estudiados (52). Es posible que el cambio del tipo de colonia lisa a rugosa esté relacionado con la composición de lípidos de la pared bacteriana como fue demostrado para *M. avium* (53) el cual está asociado con una gran depleción genómica en la que se encuentra un conjunto de genes (*ser2*) que codifican las transferasas (metil transferasas, rhamnosiltransferasas, etc) requeridas para la transferencia de los oligosacáridos al compuesto peptidilípido formándose así el glicopeptidilípido (GPL) (54) o puede además, abarcar los genes que codifican la biosíntesis de los lipopéptidos resultando así en una colonia rugosa exenta de vestigios de antígenos GPL (55). Pero en "*M. canettii*" se desconocen las bases moleculares de la transición de la colonia de tipo liso a la rugosa.

**Tabla 3- Caracterización bioquímica y morfológica y determinación de la sensibilidad de varias subespecies del Complejo *M. tuberculosis* a antibióticos y drogas\***

Subespecies	Morfología de la colonia	Producc. Niacina	Hidrólisis Tween 80	Resultado de las pruebas bioquímicas										Crecimiento en presencia de				Sensibilidad a las drogas				CLR MIC ug/ml
				Presencia de				Ureasa		Aryl sulfatasa		B-glucosidasa		TCH	NAP	TB10	SM	D-CS	PZA			
				Nitrato reductasa	Catalasa 22°C	Catalasa 68°C	Ureasa	Aryl sulfatasa	B-glucosidasa													
<i>M. tuberculosis</i>	Eugónica (rugosa)	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S	S	S	20		
<i>M. bovis</i> BCG	Eugónica (rugosa)	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	0.5		
<i>M. bovis</i>	Disgónica (rugosa)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	10		
<i>M. africanum</i>	Disgónica (rugosa)	X	X	+	-	+	X	-	X	X	-	S	S	S	S	S	S	S	S	10		
<i>M. canettii</i> CIPT140010059	Eugónica (lisa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	S	R	>32		
<i>M. canettii</i> 9600046	Eugónica (lisa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	S	R	>32		
<i>M. canettii</i> 9701549	Eugónica (lisa y rugosa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	S	R	>32		
<i>M. canettii</i> 217/94	Eugónica (lisa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	NH	S	S	S	R	>32		
<i>M. canettii</i> 17727 (So93R)	Eugónica (rugosa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	S	R	NH		
<i>M. canettii</i> 17728 (So93)	Eugónica (lisa)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	R	S	S	R	S	S	S	R	>32		

**Goh KS et al, 2001**

\*Símbolos y abreviaturas: + resultado positivo, - resultado negativo, X resultado variable; R resistente a las drogas, S sensible a las drogas; TCH hidrácida acida carboxílico-2-tiofeno (30µg/mL); NAP p-nitro-α-acetilamino-β-hidroxi profenona (5µg/mL); TB10 tiacetazona (10µg/mL); PZA pirazinamida (50 µg/mL); SM streptomina (2µg/mL); D-CS D-cicloserina (30µg/mL); CLR claritromicina; NH no hecho; otras drogas incluyen isoniazida (0.2µg/mL); rifampicina (1µg/mL); oxofloxacina (1.5µg/mL); kanamicina (6 µg/mL); amikacina (4µg/mL); clofazimina (1µg/mL); rifabutin (1µg/mL); ciprofloxacina (1.5µg/mL); etambutol (2µg/mL). Los resultados de la arilsulfatasa fueron leídos el día 3 mientras que la hidrólisis de Tween 80 fue leída el día 10. Las pruebas de crecimiento en presencia de TB10 y la sensibilidad a D-cicloserina y etambutol fueron realizadas en el medio Löwenstein-Jensen

Las últimas dos cepas incluidas dentro del complejo fueron *M. caprae* (56, 57, 58) aislada de cabras y *M. pinnipedii* (59), aislada de lobos marinos de Uruguay, Argentina y Australia (60, 61, 62, 63).

Se han desarrollado numerosos estudios para diferenciarlos, entre otros, tipificación por fagos, análisis por enzimas de restricción (REA), análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y comparación de secuencias de inserción genómicas (64). De todas formas, aún cuando los métodos moleculares han disminuído el tiempo necesario para la identificación de las micobacterias, los métodos de cultivo y tipificación clásica siguen utilizándose para la caracterización definitiva.

## **2-1. Características generales**

Las especies del género *Mycobacterium* presentan determinadas características esenciales. Morfológicamente son bacilos cortos, que miden 0.2 a 0.6  $\mu$  de diámetro por 1.0 a 10  $\mu$  de longitud. Aunque se observan diferencias en el tamaño de los bacilos entre los géneros, dicho parámetro no puede tomarse como diagnóstico definitivo, ya que pueden ocurrir variaciones entre las cepas. Son rectos o curvados, y ocasionalmente de forma cocobacilar, filamentosa o ramificada, sin micelio aéreo. Las micobacterias no forman esporos, conidios o cápsulas, y son inmóviles. Pueden ser aisladas a partir de esputos, suelo, agua u otras fuentes que contengan flora mixta sólo si se decontamina con agentes que destruyan en forma selectiva los organismos contaminantes de rápido crecimiento, que impedirían el desarrollo de *Mycobacterium*. Sin embargo el tiempo de decontaminación debe ser controlado de forma cuidadosa, ya que la



resistencia de las micobacterias no es absoluta (37). En cuanto a las necesidades de cultivo, por su preferencia por el oxígeno son de tipo aerobio, aunque se encuentran algunos géneros microaerofílicos, como *M. bovis*.

Su afinidad tintorial determina que sean débilmente Gram-positivas, debido a su alto contenido en lípidos. Un rasgo característico de las micobacterias es su resistencia a los decolorantes acidificados, o Acido-Alcohol Resistencia (AAR). Esto es debido a la conformación de la pared, en particular a los ácidos micólicos, que permite que los colorantes básicos como la fucsina, sean retenidos cuando se somete la muestra a la acción de alcohol ácido. La integridad de la pared es fundamental para el mantenimiento de la AAR. Si se aplican tratamientos físicos o químicos que destruyan su estructura, tales como molido, sonicación, radiación ultravioleta, extracción de lípidos, tratamiento con detergentes, infección por fagos, o porque ocurra autólisis, esta propiedad se pierde (15). La AAR es la base de la técnica de Ziehl-Neelsen, y de sus variantes, y permite establecer un diagnóstico presuntivo rápido. Hay que tener en cuenta como diagnóstico diferencial, que la AAR es compartida por otras bacterias como *Rhodococcus*, *Corynebacterium* y *Nocardia*.

La pared de las micobacterias es sumamente compleja y determina alguna de las características más importantes de éste género. A diferencia de las bacterias Gram negativas cuya pared constituye 20% del peso seco, y del resto de las Gram positivas, con 5%, la pared de las micobacterias constituye más del 40% de su peso seco. En forma somera consta de tres capas concéntricas cuyas macromoléculas se unen en forma covalente: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. Unidas a éstas en forma no covalente se encuentran lípidos de relevancia para la antigenicidad y la virulencia, como el lipoarabinomano, la “cera D” o el factor “cuerda” o “cordón” (38). Este factor cuerda que es la trealosa 6-6-dimicolato, determina

el crecimiento *in vitro* en forma de cuerdas, típico de las cepas patógenas, y si es extraído, el microorganismo es avirulento. En las cepas de micobacterias más virulentas, la arabinosa terminal del lipoarabinomanano (LAM) está recubierta con residuos de manosa (manLAM), a diferencia de las cepas no virulentas que no están recubiertas (AraLAM). Además el LAM también podría servir como poro para el pasaje de nutrientes a través de la pared celular. Por otro lado, las ceras, sulfátidos y muramil-dipéptidos presentes en la pared del bacilo, generan una respuesta inmunológica fuerte y previenen la fusión del fagosoma y el lisosoma en el macrófago (65). Las proteínas presentes tienen un importante rol antigénico en el proceso de respuesta inmune. Koch obtuvo filtrados de cultivos concentrados por calor, a la que se le denominó tuberculina. Con el tiempo se fue modificando el modo de obtención de la que hoy es la actual prueba diagnóstica de diferentes micobacteriosis, DPP (derivado proteico purificado).

En forma particular, dentro del género *Mycobacterium*, la especie de interés en este trabajo es *M. bovis*.

## 2-2. Características particulares de *M. bovis* y *M. tuberculosis*

### 2-2-1. Fisiológicas

En el laboratorio *M.bovis* y *M.tuberculosis* se adaptan al cultivo, en simples soluciones salinas, con iones amonio como fuente de nitrógeno, y glucosa como fuente de carbono. La utilización de medios más complejos deriva de la necesidad de obtener crecimientos más voluminosos y aislamientos más tempranos (66). Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de micobacterias, son tanto de tipo sólido como líquido. Entre los primeros predominan aquéllos a base de huevo, como Löwenstein-Jensen, Stonebrink y el de Herrold, debido a que las micobacterias muestran generalmente una sensible preferencia por los lípidos del tipo de los de la yema de huevo. A los medios líquidos como el Dubos se les adiciona algún detergente. Normalmente se utiliza Tween 80, para evitar el crecimiento en forma de película y facilitar los estudios cuantitativos. Además, hay medios especialmente enriquecidos como el Middlebrook 7H10 con biotina y catalasa, que son utilizados para recuperar a los bacilos poco viables. La tasa de crecimiento en medio de cultivo es típicamente lenta, llegando a ser de 15 a 20 horas.

Las características de crecimiento de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, ofrecen ciertas diferencias (67). *M. tuberculosis* utiliza glicerol como fuente de carbono mientras que *M. bovis*, piruvato. Por otro lado, el crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis* es mucho más abundante, formando colonias en grupos que sobresalen de la superficie del medio de cultivo, mientras que

*M. bovis* forma colonias pequeñas y planas (68). Estas dos formas de crecimiento se denominan eugónica y disgónica respectivamente. La necesidad de oxígeno es otra característica diferencial: el bacilo humano es aerobio y el bacilo bovino es microaerófilo de modo que, en un medio de cultivo agar blando, el primero crece como una película en la superficie y el segundo como una banda por debajo de ella. Existen, además, una serie de diferencias a nivel enzimático y de resistencia a diversas sustancias químicas. Estas diferencias son las que han dado origen a las pruebas bioquímicas que se utilizan para la diferenciación de los aislamientos (51, 69).

#### **2-2-1-1. *Mycobacterium bovis***

*M. bovis* es un bacilo relativamente corto, de 1-4  $\mu$  de longitud y 0.3-0.6  $\mu$  de diámetro, aunque en cortes de tejidos y extendidos es ligeramente más largo (68). *M. bovis* es microaerofílico, sin embargo, tras repetidos subcultivos, puede adaptarse al crecimiento aeróbico (36). Esta micobacteria es muy resistente a ciertos agentes físico-químicos, como ácidos, álcalis y detergentes catiónicos. Esta propiedad resulta muy útil. Ya que permite la utilización de técnicas de descontaminación como Petroff y de lauril sulfato de sodio para eliminar a otras bacterias, que si bien son menos resistentes, por su crecimiento más rápido dificultarían el aislamiento de las micobacterias.

Para el diagnóstico definitivo la única prueba "Gold Standard" es el aislamiento de *M. bovis*, crece en medios líquidos y sólidos. Los medios sólidos presentan en su composición yema de huevo (como el de Stonebrink y el de Löwestein-Jensen) con el agregado de piruvato; otros se basan en medio enriquecido con suero y /o sangre (Middlebrook modificado 7H11, sin glicerol y el agregado de 0.4% de piruvato; medio agar sangre tuberculosis o B83). Los medios líquidos

como el Dubos, están adicionados de un detergente a fin de permitir estudios cuantitativos, ya que evitan el crecimiento en forma de película.

*M. bovis*, pertenece al grupo de micobacterias de crecimiento lento, requieren entre 14 y 21 días para que se visualicen las primeras colonias (68). La identificación se realiza a través de las características de las colonias, y de pruebas bioquímicas, tales como las de la nitrataasa, nicotinamidasa y pirazinamidasa, catalasa y peroxidasa, síntesis de niacina (70) e hidracida ácida tiofeno2-carboxílico. Las cepas de *M. bovis* usualmente pierden la actividad catalasa en forma simultánea a la pérdida de virulencia para los cobayos y a la adquisición de resistencia a la isoniazida, como sucede con *M. tuberculosis* (36).

A los efectos de acelerar el diagnóstico se han desarrollado nuevos métodos que permiten obtener resultados a partir de la primera semana de cultivo.

*-Metodo Semiautomatizado:* Es un método radiométrico que utiliza medio de cultivo a base de caldo Middlebrook enriquecido, rico en ácido palmítico marcado con carbono 14 (C14), que es un isótopo radiactivo natural. El sistema BACTEC 460 TB mide cuantitativamente el CO<sub>2</sub> marcado con C14 producido por el metabolismo de las micobacterias presentes en la muestra. El CO<sub>2</sub> marcado presente en la atmósfera del frasco es aspirado y se determina un valor de radiactividad (Índice de crecimiento) que es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento en el medio. Es un método simple que permite hacer el diagnóstico de TBC en menos de una semana en alrededor del 95% de los casos. A partir de la muestra positiva permite realizar una prueba de identificación: prueba del NAP (p-nitro-alfa-acetil-beta-hidroxi-propiofenona) compuesto que permite diferenciar entre *M. tuberculosis* de otras micobacterias no *M. tuberculosis* (MOTT). Una desventaja del método, es el almacenamiento del material radioactivo en gran volumen (aunque la radioactividad de éste material es muy baja).

-*Método Automatizado*: Utilizan medios de cultivo a base de caldo Middelbrook. Están constituidos por estufas de cultivo continuo, con s

ensores capaces de detectar el CO<sub>2</sub> producido por el metabolismo de las micobacterias presentes en la muestra. Los métodos de lectura pueden ser colorimétrico o fluorométrico. Normalmente están conectados a una computadora que detecta la señal positiva, realiza los registros y el análisis de la información. Los sistemas con los que se cuenta actualmente son: BACTEC 9000, BACTEC MGIT 960 y MB/BACT, la principal desventaja es el costo.

Las técnicas de biología molecular han sido utilizadas para estudiar las características genotípicas de este organismo. Estas características han sido investigadas a fin de poder ser utilizadas en diagnóstico y en estudios epidemiológicos. El uso del análisis de los fragmentos de restricción es adecuado para la caracterización de aislamientos de *M bovis* (71). Por otro lado el uso de éstas técnicas ha permitido el desarrollo de la epidemiología molecular, posibilitando la tipificación de cepas (72, 73, 74), el rastreo de focos, la detección de cepas multirresistentes (75), el establecimiento del origen de infección en animales con comparación de las cepas actuantes (72, 76, 77), la determinación de la transmisión de los animales al hombre (74), la determinación del rodeo de origen de leche contaminada (78), la distribución geográfica de la enfermedad (79, 80), la transmisión o no entre las diferentes especies (81).

## **2-3. Estructura genómica**

### **Introducción de la genómica funcional del Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

La secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* (cepa H37Rv) se realizó inicialmente utilizando una combinación de técnicas genéticas moleculares y de bioinformática,

demostrando que el genoma de *M. tuberculosis* está constituido por un cromosoma circular de 4.411.532 pb, con un alto contenido de G+C (65.6%), un parámetro asociado con el estilo de vida aeróbico. Una vez asignadas las ORFs (marcos de lectura abiertos), usando bioinformática, se incluyó el uso de los codones (preferencia de base posicional) y la base de datos. A todas las secuencias codificantes se les dio un número que comienza por Rv, así el primer gen es Rv0001. Las últimas anotaciones identificaron 4.043 genes codificando a 3.993 proteínas y 50 RNA estables. A cada ORF le fue asignada una categoría funcional.

### Distribución de 4.043 genes de *M. tuberculosis* H37Rv según su función

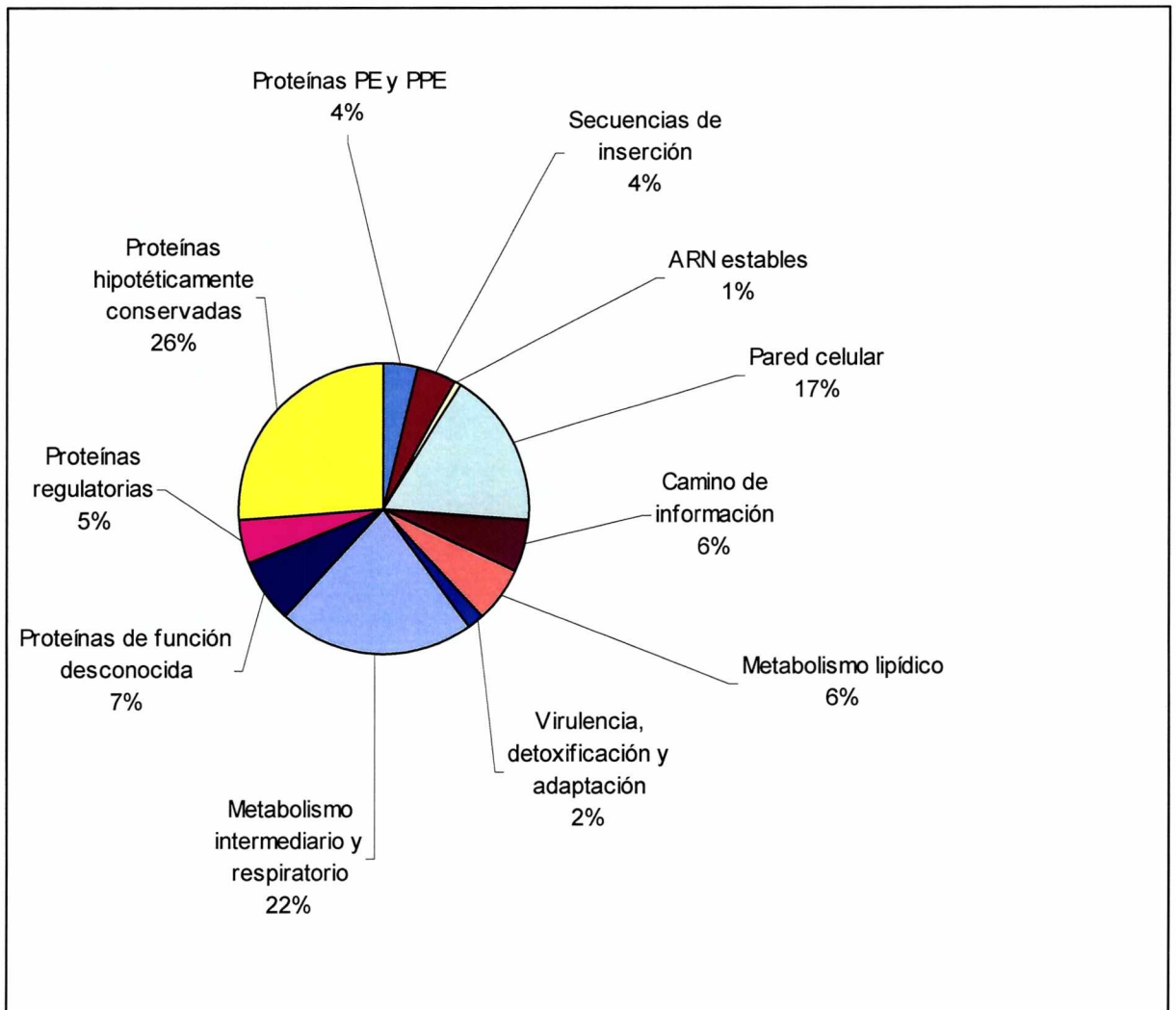


Fig. 1- Distribución de 4.032 genes (Cap. 9 tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Brodin et al., 2005)

La secuencia del gen de *M. bovis* (AF2122/97) tiene 4.345492-pb; y una identidad de secuencias con *M. tuberculosis* del 99.95% (*M. bovis* cuenta con algunas deleciones) (21). La decodificación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv identificó 100 genes que codifican proteínas con alta homología en los primeros 100 aminoácidos. Este dominio tiene secuencias prolina-glutamina (PE) ocupando un lugar conservado en la posición 8 y 9 relacionado al extremo N-terminal. Una subfamilia de 63 genes en *M. tuberculosis* H37Rv codifica productos con un nuevo dominio rico Gly y Ala unido al dominio PE, conteniendo numerosas repeticiones de residuos GGA y GGN. Estas secuencias polimórficas ricas en GC corresponden a la familia PGRS y la subfamilia PE-PGRS (82). Los genes PE-PGRS existen también en *M. bovis*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. kansasii* y probablemente *M. smegmatis* (83, 84), no siendo encontrados en *M. avium* y otras especies de micobacterias. Se ha propuesto que el rol de éstas proteínas PE-PGRS es alterar el perfil antigénico de la bacteria, implicando que estas proteínas están expuestas al sistema inmune del huésped, sugiriendo que se encuentran en la pared celular de la micobacteria. Delogu y Brennan demostraron que una proteína PE-PGRS tenía propiedades inmunogénicas y que los anticuerpos obtenidos tienen reacción cruzada entre las distintas proteínas PE-PGRS, lo que implicaría que estas proteínas tienen epitopes comunes. Se localizaron muchas proteínas PE-PGRS en la pared y en la membrana de *M. tuberculosis*. Además, los autores sugieren que algunas proteínas PE-PGRS son proteínas variables de superficie (85). Investigaciones realizadas con la técnica de *Microarray* observaron la expresión de algunos genes PE-PGRS que parecería que controlan el sistema regulatorio dependiente del hierro (86), de la falta de nutrientes (87) o de stress ácido (88).

Se conoce muy poco respecto a nivel de expresión, localización y función de las proteínas codificadas por los genes PE. El gen Rv3872 de tipo PE, fue encontrado en la región RD1 de *M.*



*tuberculosis* encontrándose ausente en todas las cepas de BCG, por lo que se lo asocia con la virulencia del fenotipo (89). Algunas evidencias hay respecto a la producción de respuesta inmune celular en vacas infectadas con *M. bovis* contra la proteína PE codificada por Rv3872 (90). Las funciones de PE y PPE no se conocen, las 67 proteínas de la familia PPE tienen un dominio conservado diferente en el N-terminal, donde las posiciones características de prolina-prolina-glutamina están en la posición 8 a 10. El dominio C-terminal de los miembros de cada familia es variable, tanto en número de aminoácidos como en secuencia, aunque cada familia puede estar dividida en subfamilias como parte de los elementos en el dominio C-terminal. Recientemente en la expresión de células T se identificaron 2 antígenos PPE, MTB41 y MTB39A, altamente inmunogénicos en animales inoculados con *M. tuberculosis* (91, 92).

Las cepas de *M. bovis* aisladas de animales del zoológico, antílopes, ciervos e incluso reses vacunas en África han demostrado la existencia de polimorfismo (39, 73). Otra secuencia de inserción descrita es la IS1081, perteneciente a la familia IS256 y con un tamaño de 1324 pb. Es propia del complejo de *M. tuberculosis* y de *M. xenopi* donde se repite de 5 a 6 veces en el genoma (93). Sin embargo, su posición en el genoma no varía, careciendo del polimorfismo necesario para estudios epidemiológicos obteniéndose generalmente el mismo patrón en los distintos aislamientos (94).

Cole y Brosch (95) observaron que de las 17 deleciones identificadas dentro de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, podían ser divididas en dos grupos: antiguas y recientes. Ejemplo de las deleciones antiguas son las ocurridas en *M. microti*, *M. bovis* y el genoma de *M. bovis* BCG (Ej.: RD7, RD8, RD9, RD10) pero la secuencia de ADN de esas regiones están presentes en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. canetti*. Esas deleciones ocurren al principio de la evolución de esas subespecies. El estudio geonómico comparativo sugiere que el ancestro común

del complejo de *M. tuberculosis* es parecido a *M. tuberculosis* o *M. canetti* y que puede haber sido un patógeno humano. Datos de deleciones recientes son las regiones RD1, RD2 (codificando para la proteína MPB64) y RD3 en algunas cepas de *M. bovis* BCG. Las deleciones en los genes pueden ser resultado en restricción de rango de huésped, como es el caso con *M. microti*, y comparando las secuencias del genoma de *M. microti* con la de *M. tuberculosis* y *M. bovis* pueden dar deleciones indetectables. Un ejemplo es la deleción de RD2, que está presente en algunas cepas de *M. bovis* BCG y ausentes en otras.

### **3. Transmisión de *M. bovis***

#### **3-1. De la fauna a los bovinos**

Actualmente sabemos que *M. bovis* causa enfermedad en un amplio rango de animales, domésticos y salvajes (Tabla 2). El control de la tuberculosis de origen bovino puede estar comprometido por la existencia de reservorios salvajes de la enfermedad. Tal es el caso en el sudoeste de Inglaterra en el que se ha encontrado una alta prevalencia de infección por *M. bovis* en tejones (*Meles meles*) a los cuales se les atribuyó la preinfección de rebaños bovinos (71). Una asociación similar fue descrita entre una especie de zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) y bovinos de Nueva Zelanda (79).

**Tabla 4- Principales especies animales de las cuales se ha aislado *M. bovis* .**

Bovino	<i>Bos taurus, Bos indicus</i>
Búfalo africano	<i>Syncerus caffer</i>
Mandrill	<i>Papio cynocephalus han bis</i>
Tejón	<i>Meles meles</i>
Visón	<i>Mustela vison</i>
Gato	<i>Felis domesticus</i>
Zarigüeya	<i>Trichosurus vulpecula</i>
Alce	<i>Cervus elaphus</i>
Ciervo	<i>Cervus elaphus</i>
Cabra	<i>Capra hircus</i>
Caballo	<i>Equus sp.</i>
Antílope	<i>Kobus leche kafuensis</i>
Jabalí	<i>Sus scrofa</i>
Cerdo	<i>Sus domesticus</i>
Rock hyrax	<i>Procavia capensis</i>
Lobos marinos	<i>Artocephalus forsteri</i>
Leones marinos	<i>Neophoca cinerea</i>

Datos de Daborn y Grange (1993) (96).

La infección por *M. bovis* demuestra especificidad de huésped, algunos animales son raramente infectados como los equinos y ovinos, pero la infección se manifiesta en ciervos,

llamas domésticas y cerdos, los cuales han desarrollado lesiones con material infeccioso de descarga (97). La prevalencia de infección clínica por *M. bovis* en ciervos de Inglaterra y Gales estudiada en los años 1971 y 1995, fue de 1,1%. La prevalencia de granjas de alces puede llegar a ser hasta de un 40% (98). En Gran Bretaña, los ciervos y los tejones van aumentando en número y distribución, con la posibilidad de que los ciervos puedan convertirse en un huésped intermediario en el futuro y junto a los tejones aumentar la transmisión de la enfermedad al ganado bovino.

En Nueva Zelanda se han encontrado hurones con severas lesiones de *M. bovis* (99). Observaron que la ruta de infección más común fue por vía alimentaria, por ingestión de carroña, (79% de un total de 38 animales), se diagnosticó *M. bovis* en materia fecal (16%), en glándula mamaria (12,5%), por vía urinaria (7 %) y en lavado bronquial (6% de 64 animales). Por cultivo de observó que la ruta más común de excreción es por vía oral. Un trabajo similar fue realizado por Ragg (1998), insinuando ser un riesgo potencial de infección tuberculosa en vacas (100, 101).

En Inglaterra Little et al. (1982), publicaron un trabajo con 200 tejones, determinando una alta prevalencia de infección con *M. bovis*. Aislaron *M. bovis* de nódulos linfáticos en 2 de 90 ratas y en 1 de 7 zorros, aunque no observaron lesiones (102).

Los cerdos son susceptibles a las micobacteriosis, y se pueden infectar si están en contacto con vacas y búfalos (103). En Croacia y en República Checa la mayoría de los cerdos son infectados por *M. avium*, adquirida a través de contaminantes de suciedad, polvo y agua. En Argentina estudios histopatológicos y bacteriológicos realizado en establecimientos de faena de cerdos (104) demostraron, basándose en la frecuencia de los aislamientos de las diferentes micobacterias y en la localización de las lesiones (linfonodos digestivos), la principal vía de infección, estaba constituida por los subproductos bovinos utilizados para alimentarlos.

### **3-2. *M. bovis* en el ganado**

La ruta de infección en el ganado vacuno ha sido extensamente investigada. Nieberle (1931) sugirió que la ruta principal era la aerógena, en algunos casos era por vía digestiva y en pocos casos congénita a través de la vena umbilical. Este autor llegó a esas conclusiones a través del estudio de la localización anatómica de las lesiones primarias encontradas en matadero (105). Francis (1947) establece que el 80-90% del ganado vacuno se infecta por contacto directo, vía aerógena. La cría intensiva facilita el contacto estrecho y el desarrollo de tuberculosis (106). Además, es la ruta más común en los terneros a pesar de que ocasionalmente hay grupos que contraen la infección por la vía digestiva a través de leche contaminada. Es importante aislar los bacilos en leche como medida de detección de rodeos infectados.

Sólo una parte de los individuos infectados tiene capacidad para actuar como diseminadores de la enfermedad y en ellos la eliminación se produce en forma intermitente. La capacidad de diseminar la enfermedad no parece estar relacionada con la presencia de lesiones generalizadas. Individuos infectados con lesiones mínimas pueden ser diseminadores (79). Neil et al. (1988) obtuvieron aislamiento positivo a partir de moco nasal de un ternero infectado experimentalmente con una dosis reducida en la que no se pudo detectar la presencia del proceso tuberculoso, ni por pruebas inmunológicas, ni por la presencia de lesiones (107).

### **3-3. De ganado a humanos**

Es transmitida del ganado al humano por vía aerógena, e indirectamente por consumo de leche y derivados lácteos. La diseminación ha sido a través de la leche, principalmente cuando existen lesiones tuberculosas en la ubre. La pasteurización de la leche junto con los programas de

erradicación de la tuberculosis bovina ha reducido la incidencia de la tuberculosis humana debido a *M. bovis*, en países desarrollados. Históricamente, las formas de tuberculosis más prevalentes eran las extrapulmonares. Los más afectados eran los niños por consumo de leche no pasteurizada. La localización extrapulmonar (adenitis cervical, infecciones genitourinarias, tuberculosis ósea y articular, meningitis) del bacilo bovino no se debía a su afinidad con estos tejidos sino a la vía de transmisión que era la ingestión de leche y de productos lácteos crudos. La tuberculosis pulmonar se transmite por vía aerógena. Las principales vías de exposición actuales son: 1) los aerosoles en galpones a partir de la tos del ganado enfermo (se detectaron bacilos ácido alcohol resistentes en esputos bovinos secos presentes en las paredes y ventanas de los establos (108), los aerosoles generados durante el manejo de carcasas tuberculosas en los frigoríficos, 2) la inoculación traumática en la piel por cortes en las manos durante la faena, esta ruta es especialmente causal de infección en los carniceros, 3) consumo de carne o productos cárneos crudos, leche y/o productos lácteos no pasteurizados.

### **3-4. De humanos a humanos**

La enfermedad primaria en humanos, debido a *M. bovis* es muy rara en países desarrollados donde la tuberculosis bovina ha sido erradicada. Sin embargo, se han informado casos de reactivación o infección post-primaria en personas nacidas antes de que fueran completados los esquemas de erradicación. No está claro si la progresión de la enfermedad ocurre como en *M. tuberculosis*, pero estudios epidemiológicos en personas infectadas con *M. bovis* demuestran que éstas tienen menos probabilidades de desarrollar infección post-primaria que las infectadas con *M. tuberculosis*. (109). Además, existen muy pocas evidencias de transmisión de *M. bovis* entre humanos. Sólo se han informado algunos casos anecdóticos (110,

111, 112) pero, en general, es muy difícil probar una asociación entre ellos dado que generalmente pasan muchos años entre la infección y el desarrollo de la enfermedad. Un factor a considerar en la epidemiología de la tuberculosis debida a *M. bovis* es la pandemia de HIV, la cual favorece la transmisión entre humanos (113). Casos de tuberculosis en enfermos de SIDA debido a *M. bovis* se informaron en muchas regiones, principalmente en EEUU y Méjico (114), en España (115) y en Francia (116, 96).

Por lo tanto, parecería que la transmisión de *M. bovis* de humano a humano es excepcional en ausencia de inmunosupresión.

### **3-5. De humano a ganado**

Los seres humanos con tuberculosis abierta

debido a *M. bovis* pueden infectar el ganado. Existen casos bien documentados de ganado infectado por granjeros (117, 118, 119). La infección ocurre generalmente por la vía respiratoria pero se han informado casos de granjeros con tuberculosis genito-urinaria debido a *M. bovis* que infectaron al ganado por orinar en los establos (120).

También se informaron casos de infección del ganado con tuberculosis proveniente de humanos infectados (121).

## **4. Naturaleza y estructura de las micobacterias**

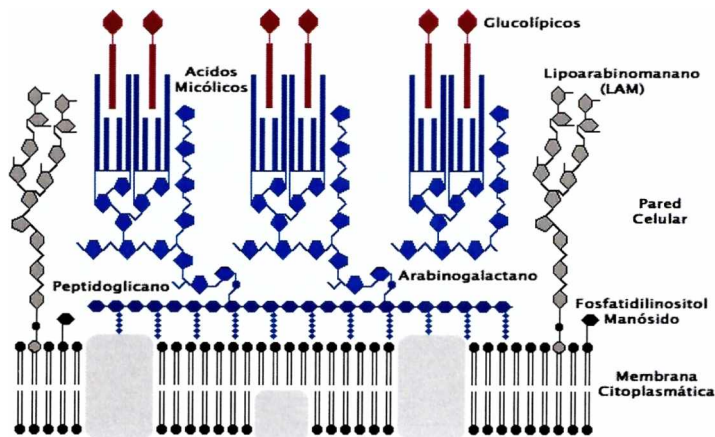
La raíz “myco” del nombre *Mycobacterium* alude a la naturaleza hidrofóbica de las micobacterias la cual les da a ellas la tendencia a crecer en películas como moho en la superficie

del medio líquido. Esta hidrofobicidad es debida a un rasgo característico de las micobacterias que es la gran cantidad de lípidos que conforman su pared celular.

La pared celular está compuesta por cuatro capas que cubren la membrana celular, la que como en las demás bacterias, es una bicapa lipídica (Fig 2). La membrana celular contiene carotenos los cuales varían en cantidad y en estructura entre especies.

La capa interna o primera capa está compuesta por peptidoglicanos, los que se relacionan a los encontrados en otras bacterias. Ésta está cubierta por una segunda capa de arabinogalactano, que es una macromolécula ramificada compuesta por arabinosa y galactosa. La cadena lateral de arabinogalactano se une a la tercera capa que está compuesta por los ácidos micólicos, largas cadenas de ácidos grasos con dos ramas de distinto largo. Una de éstas contiene 50 átomos de carbono y la otra, aproximadamente 30. El ácido micólico es el principal compuesto de la pared micobacteriana contribuyendo a su grosor, siendo el responsable de la característica ácido alcohol resistencia que se observa durante la tinción con colorantes arilmetanos tales como la fucsina básica. En esta propiedad se basa la coloración de Ziehl-Neelsen la que se emplea para la identificación de micobacterias al microscopio. La cuarta capa contiene varios lípidos y compuestos relacionados incluyendo fenol glucósidos, glucolípidos (principalmente trehalosa unidas al ácido micólico) y peptidoglicolípidos denominados micósidos, los cuales recuerdan a los antígenos O de los bacilos Gram negativos. En algunas cepas de micobacterias la capa de micósidos es muy gruesa, dándoles a las colonias una apariencia lisa. Tal es el caso que sucede en *M. canettii*.





**Fig. 2-**Esquema de las envolturas de una eubacteria Ácido-Alcohol Resistente (122).

Otro importante compuesto de la pared es el lípidoarabinomano (LAM). La porción lipídica se encuentra en la membrana celular mientras que la parte polisacárida se extiende hasta la superficie de la pared. Probablemente los LAM anclen la membrana celular a la pared. Los LAM aislados de H37Ra (cepa avirulenta de *M. tuberculosis* H37Rv) se caracterizan por una larga cadena compuesta de arabinosa. Ellos estimulan la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF). Contrastando con esto, los LAM aislados de la cepa virulenta Erdman (que difiere sólo en el hecho que la cadena de arabinosa tiene en su parte final una o más unidades de manosa) es un pobre inductor de la estimulación de TNF. La capacidad de LAM según la capa de *M. tuberculosis*, estimula la secreción de TNF por el macrófago infectado, pudiendo influenciar en la habilidad del microorganismo de sobrevivir y replicar dentro del huésped. Como H37Ra no replica en animales infecados, puede liberarse y manifestarse como en un estado de enfermedad crónica. LAM dispara la liberación de TNF de macrófagos infectados,

generando una infección productiva. Esas células infectadas pueden adquirir actividad bacteriostática, otros fagocitos mononucleares se acumulan y forman el granuloma. La baja potencia del LAM de H37Rv para liberar TNF, puede ser muy importante, por la habilidad del bacilo de proliferar de un modo libre dentro del macrófago del huésped infectado, previo a la generación de inmunidad mediada por linfocitos T (123). El TNF es una potente citoquina proinflamatoria. Es producido principalmente por macrófagos y monocitos activados. Las células T, B y natural killer (NK) también producen TNF. LAM desencadena los efectos inmunosupresores de los macrófagos en los individuos tuberculosos. Suprime la respuesta proliferativa a *M. tuberculosis* quizás induciendo a los macrófagos a liberar citoquinas inmunosupresivas tales como IL-10 (124). LAM inhibe también la liberación de IFN- $\gamma$  bloqueando así uno de los principales caminos para la destrucción de este patógeno intracelular (125).

## **5- Patogenicidad**

Esta enfermedad puede desarrollarse o no, en el hospedador después de que éste haya sido infectado. Si se desarrolla produce, luego de pasar por varias etapas, necrosis de los tejidos con progresión de la enfermedad y si no logra desarrollarse, es porque el hospedador reacciona con una respuesta protectora y puede quedar en forma latente. En el primer caso, se establece una enfermedad activa (primaria o reactivación) en el hospedador; en el segundo caso, implica que el patógeno ha sido eliminado (no infección) o controlado. Es muy controvertido si es eliminado totalmente el bacilo. Si los bacilos permanecen bajo control durante un largo período, contenido dentro de las células del hospedador, se lo considera infección latente. La infección latente nos

está indicando que la respuesta inmune es adecuada para controlar la infección en la mayoría de los hospedadores pero que, generalmente, no es efectiva para destruir al organismo. Los factores que juegan un papel crucial en el desarrollo de la patogenicidad de *M. tuberculosis* son: el sistema inmune y el control del hospedador a la resistencia o susceptibilidad a muchas enfermedades infecciosas, incluyendo tuberculosis (126) por un lado y a la virulencia del bacilo infectante y cantidad de bacilos (127) por el otro. Los macrófagos son los responsables finales de generar la respuesta inmune protectora contra tuberculosis. Es así que los macrófagos actúan directa o indirectamente en la patogénesis de la enfermedad. Cuando encuentra a la micobacteria, el macrófago ingiere el organismo, este primer estadio es de adherencia del organismo al macrófago, seguido por la fagocitosis. La fagocitosis es a través de Fc (factores de complemento) y receptores complementarios sobre el macrófago. La función más importante que tiene el macrófago en la generación de la inmunidad protectora es matar al microorganismo que ha sido fagocitado. Luego de la interacción de la bacteria con la membrana del macrófago y ser fagocitado, la función antibacteriana en el macrófago es activada. Los macrófagos tienen distintos mecanismos para combatir al microorganismo, como la generación de oxígeno intermediario reactivo (ROI), generación de nitrógeno intermediario reactivo (RNI), acidificación del fagosoma, secreción de enzimas lisosomales, limitación del hierro intracelular y producción de defensinas.

El bacilo tuberculoso entra, por inhalación, al espacio alveolar, donde es ingerido por macrófagos alveolares.

La entrada de la micobacteria al macrófago es mediada por un número de interacciones ligando-receptor (128). El sistema complemento sintetizado por el macrófago, juega una función significativa en la entrada del bacilo a esa célula. La opsonización bacteriana es

dependiente de la vía alternativa del complemento, partes del sistema complemento se adhieren a la bacteria, donde son reconocidos por receptores específicos situados en las membranas de las células endocíticas, facilitando la ingestión (129) y de otra vía no convencional, en la formación de C3b que compromete a componentes de la pared de la micobacteria (130). La entrada de *M. tuberculosis* al macrófago está asociada con una serie de señales intracelulares que aparecen en forma temprana. Los fagosomas conteniendo *M. tuberculosis*, y *M. avium* presentan acidificación significativamente reducida (131, 132, 133) comparada con los organismos muertos o los modelos de fagosomas conteniendo objetos inanimados (perlas de látex). Esto ha sido asociado al escape o falta de las bombas  $H^+$ -ATPasa en estas vacuolas (134, 135). Las micobacterias pueden evitar la acidificación de la vacuola mediante la exclusión de la ATPasa de protones, inhibiendo la maduración del fagosoma, impidiendo la fusión del mismo con el lisosoma, confirmando así la supervivencia de *M. tuberculosis*. En trabajos posteriores fue encontrado el intercambiador de  $Na^+/H^+$  en las membranas fagosomales del macrófago (136). La reducida acidificación del fagosoma que contiene a la micobacteria afecta a: I) muerte/sobrevivencia del microorganismo dado que esta disminución de protones le permite sobrevivir; II) procesos de maduración vacuolar, debido a que el restablecimiento de por lo menos algunas componentes de la membrana involucradas en la maquinaria del tráfico, dependen del pH vesicular (137), y III) procesamiento y presentación del antígeno. Por lo tanto, lograr la acidificación de los fagosomas es un punto importante en el combate contra esta enfermedad.

Si la infección progresa, cuando el bacilo escapa del foco caseoso, es ingerido por macrófagos inmaduros no activados, donde vuelve a multiplicarse y nuevamente se genera una respuesta inmune con daño tisular. Si la licuefacción del cuerpo caseoso ocurre, los bacilos

nuevamente encuentran un medio adecuado para multiplicarse en forma extracelular, que frecuentemente alcanza niveles muy elevados llegando a veces al árbol bronquial y dispersando bacilos al medio al toser. Tal número incrementado de bacterias, no puede ser controlado por la respuesta inmune del hospedante y se requiere de agentes terapéuticos para frenar la infección. Sin tratamiento la enfermedad progresa hasta que el tejido pulmonar viable es tan reducido que el hospedante muere. Sólo la inmunidad celular adquirida es capaz de frenar la continua destrucción de los tejidos. En hospedantes que desarrollan una buena respuesta celular adquirida, células T específicas y sus linfoquinas generan la producción de macrófagos activados que ahora sí son capaces de ingerir y destruir los bacilos, las lesiones son encapsuladas y contenidas. Si este paciente o animal pasa por una etapa que conduce a la inmunosupresión (vejez, desnutrición, SIDA, etc.), ocurre una reactivación endógena de TB.

## **6- Inmunología de la tuberculosis**

En 1882, Robert Koch hizo una presentación en la Sociedad de Fisiología de Berlín que cambió el pensamiento sobre la tuberculosis como enfermedad infecciosa. Describió el bacilo tuberculoso, conocido por algunos como el bacilo de Koch, demostrando ser el causante de la tuberculosis (140, 141, 142). Koch como ya se dijo anteriormente, fue el primero en emplear el cultivo en medio sólido, permitiendo aislar colonias individuales. Este organismo causante de la tuberculosis cumplía con los postulados de Koch (1890) (143), especificando que era necesario aislar el bacilo del cuerpo, cultivarlo en cultivo puro, y administrando el bacilo aislado a otros animales debía reproducir las mismas condiciones de enfermedad.

En el 10° Congreso Internacional de Medicina en Berlín en 1890, fue anunciado el efecto curativo del agente tuberculoso. Este agente llamado tuberculina, era un filtrado de caldo de cultivo del bacilo tuberculoso. Rápidamente se vio que no tenía un efecto curativo, pero sí tenía un valor diagnóstico en medicina humana y veterinaria. Roberto Koch en 1891 describió experimentos con cobayos, observando lesiones tempranas y demostrando el desarrollo de inmunidad luego de la primera infección. Koch observó que cobayos inoculados vía subcutánea con el bacilo tuberculoso, producían lesiones en el lugar de inoculación y muerte cuando se diseminaba. Una inoculación secundaria de organismos virulentos producía muy diferente respuesta. Comenzaba a indurarse en uno o dos días y luego se ulceraba, no se diseminaba.

Albert Calmette (físico, con amplia experiencia en enfermedades infecciosas y tropicales), junto a Camille Guérin (veterinario), en conocimiento de los experimentos de Koch y trabajos de Von Pirquet sobre la hipersensibilidad a la tuberculina, comenzaron en 1908 con la cepa atenuada de *M. bovis* por pasaje seriado. En 1919 habían completado los 230 pasajes. Y la cepa vacunal avirulenta fue probada en cobayos, conejos, vacas y caballos. Fue por primera vez probada en el humano en 1921.

Un siglo después del descubrimiento del bacilo tuberculoso y la tuberculina, no está totalmente entendido la naturaleza de la resistencia del huésped contra la tuberculosis. En las causas de la progresión lenta de estos dos conocimientos incluyen: la estructura compleja de estos organismos, el tiempo de generación lento, la naturaleza intracelular y la cronicidad de la enfermedad. En una enfermedad crónica como es la tuberculosis, el estado clínico y la prognosis de la enfermedad depende del balance entre los factores del huésped y la patogenicidad del parásito. *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular facultativo, causa enfermedad por la habilidad de resistir a la muerte intracelular dentro del macrófago, multiplicación dentro del

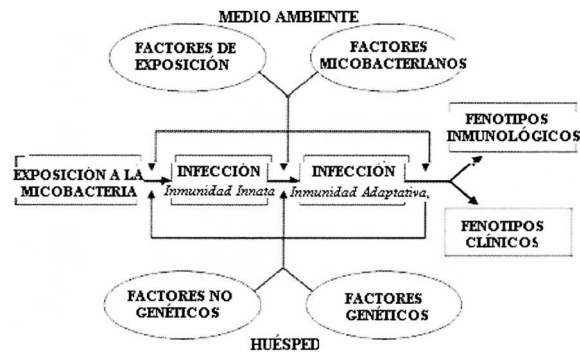
macrófago y destrucción con la liberación del bacilo para ser nuevamente capturado por nuevos macrófagos.

Hasta hace poco tiempo, eran desconocidos los receptores responsables de la inducción de los genes que codifican para proteínas inmunes e inflamatorias. Esta situación cambió drásticamente con el descubrimiento de la función inmune de los receptores Toll de *Drosophila* encontrándose también su homólogo en los mamíferos a los que se lo denominó Toll-like (TLR).

### **6-1. Interacción huésped-micobacteria**

La consecuencia a la exposición de una gran mayoría de micobacterias, probablemente resulte en la infección de sólo unos pocos individuos. La frecuencia de la infección es muchas veces subestimada porque siempre se basa en la detección de los fenotipos inmunológicos, los que reflejan la respuesta de la memoria inmune adaptativa. La inmunidad innata puede llegar a ser suficiente para controlar la infección y, posiblemente, tenga una respuesta de memoria débil, lo que hace difícil identificar al fenotipo de interés. Es sabido que sólo una minoría de los individuos infectados desarrolla la enfermedad. *M. tuberculosis* (138) y *M. leprae* (35) causan enfermedad clínica en menos del 10% de los individuos infectados. Esto es válido también para *M. ulcerans* (32). Una combinación de factores ambientales microbianos y no microbianos, y factores del huésped genético y no genético, determinan el éxito de la exposición a la micobacteria y su consecuente infección. Cualquiera sea la contribución relativa de estos factores, la aparición de esta enfermedad implica que las defensas del huésped fallaron (139). Los factores ambientales pueden ser micobacterianos (factores de virulencia) o estar relacionados al modo de la exposición (inoculación directa). Los factores del huésped pueden

ser genéticos (mutación en un gen implicado en la inmunidad a la micobacteria) y los no genéticos (una lesión en la piel) (Fig. 2).



**Fig. 3-** Factores de influencia para el desarrollo de la infección por micobacterias, Casanova (2002).

## 6-2. Respuesta inmune

La primera línea celular de defensa en el huésped mamífero es la fagocitosis de los organismos invasores por leucocitos polimorfonucleares y macrófagos mononucleares. Así como los macrófagos, las células dendríticas (CD) que son también células presentadoras de antígenos, son responsables de la respuesta inmune primaria. Estas CD se originan en médula ósea y se distribuyen en todos los tejidos. Todas ellas poseen moléculas del CMH de clase II, expresadas constitutivamente en la membrana celular. El número de moléculas del CMH de clase



II depende del estado de activación de la célula. La micobacteria se internaliza mediante receptores de membrana a la CD, y crea un compartimiento intracelular, no hay crecimiento de la micobacteria, quedando en un medio bacteriostático. Tascón R et al., recientemente publicaron un trabajo observando la respuesta de las CD a la infección por *M. tuberculosis*. Encontró que si vacuna ratones utilizando CD previamente infectadas con mutantes auxotróficas de *M. tuberculosis*, la protección conferida era mayor a la obtenida con la BCG, esto se relaciona con un aumento primario de células T CD4+ y CD8+ específicas de antígenos micobacterianos (144). La hipótesis de Orme respecto a los sucesos producidos durante el curso de la respuesta celular primaria, a una infección tuberculosa, formula que un cierto porcentaje de células T CD4 abandonan el sitio de infección y reingresan a la circulación sanguíneo/ linfática. No habiendo ya más antígeno presente, dejan de secretar IFN- $\gamma$  y se convierten en un pool recirculante. Los linfocitos participan constantemente en la inflamación crónica. Su migración implica la interacción de moléculas de adhesión y mediadores químicos (citoquinas), que los atraen. Sin embargo, se diferencian de los linfocitos no activados en que expresan en su superficie las proteínas: LFA-1 ( $\beta 2$  integrina heterodímero de 275kDa) y VLA-4 ( $\alpha V\beta 1$ - integrina dímero de 150kDa). Los macrófagos locales secretan el factor de necrosis tumoral (TNF) que induce la expresión en su superficie de los ligandos, moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 (glicoproteína de 115kDa), moléculas de adhesión vascular VCAM-1 (proteína de 110kDa) los cuales se unen a las proteínas de superficie LFA-1 y VLA-4 de los linfocitos T circulantes permitiendo que pasen al sitio local de inflamación donde ellos reconocen a los péptidos antigénicos específicos. Estas células T comienzan a secretar quemokinas que promueven el

influjo de monocitos desde la sangre. Este proceso de infiltración no es inmediato tarda en completarse de 24 a 48 horas. De ahí el término de reacción de hipersensibilidad tardía (DTH).

Orme aclara que IMC (inmunidad mediada por células) y DTH son dos mecanismos básicos que operan de diferente modo. En IMC, los macrófagos inicialmente intentan controlar la infección y presentar los antígenos. Pero, más tarde se asocian con células T sensibilizadas las cuales activan a estas células con citoquinas capacitándolas para matar los bacilos invasores. En DTH es necesario un pool de células T recirculantes para desencadenar la reacción y atraer los monocitos al sitio. Además, Saunders y colaboradores (145) demuestran experimentalmente que ratones knock-out (ICAM-K/O) en el gen que codifica para la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 tienen una IMC normal, pero no pueden desarrollar DTH. Estos ratones, a pesar de la ausencia de granulomas, controlan el crecimiento bacteriano por lo menos durante 90 días.

En el caso del ingreso de micobacterias por vía respiratoria, la invasión se ve favorecida por la esterilidad del alvéolo, que evita la competencia con otros microorganismos. Luego de ingresar los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares que podrán destruir y /o transportarlos hacia los linfonódulos locales. Los macrófagos una vez infectados, segregan IL-12, la cual induce la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y linfocitos T. La acción de IL12 y IFN- $\gamma$  en los linfonódulos locales estimulan la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia un perfil TH1, previa activación por el reconocimiento del antígeno en una CPA. Las células TH1 efectoras se dirigen hacia el sitio de infección donde se extravasan, guiadas por factores quimiotácticos, y reconocen péptidos antigénicos asociados a moléculas de clase II del CMH en los macrófagos. Este reconocimiento genera la liberación de IFN- $\gamma$ , que activa a los macrófagos transformándolos en células epitelioides. Los macrófagos activados poseen una mayor capacidad de producción de

antimicrobianos potentes como las especies reactivas del oxígeno (ERO) y los intermediarios del óxido nítrico, son más eficientes en la unión del fagosoma y el lisosoma, y aumentan la expresión de moléculas de clase II, aumentando su habilidad para presentar antígenos.

La lesión característica, que contiene a los patógenos se denomina granuloma. En el caso de la tuberculosis se trata de un granuloma de tipo inmune, y consiste en un área central de macrófagos rodeados por linfocitos T. Un cierto número de macrófagos se diferencian en células epitelioides, y algunos se fusionan para generar células gigantes multinucleadas o de Langhans. Los linfocitos son principalmente T CD4<sup>+</sup> TH1; en los granulomas productivos se hallan T CD8<sup>+</sup>. Los granulomas pueden evolucionar de diferentes formas. En algunos individuos se produce la eliminación de las bacterias, con posterior cicatrización. En ocasiones las células centrales del granuloma mueren, probablemente debido a la acción del TNF $\alpha$  y de los linfocitos T citotóxicos; los bacilos permanecen contenidos, pero la función pulmonar se ve afectada por el daño tisular. En otros casos, las células mueren por anoxia y por efecto citotóxico de los macrófagos activados, originando centros de necrosis caseosa (146) Fig. 4 (147).

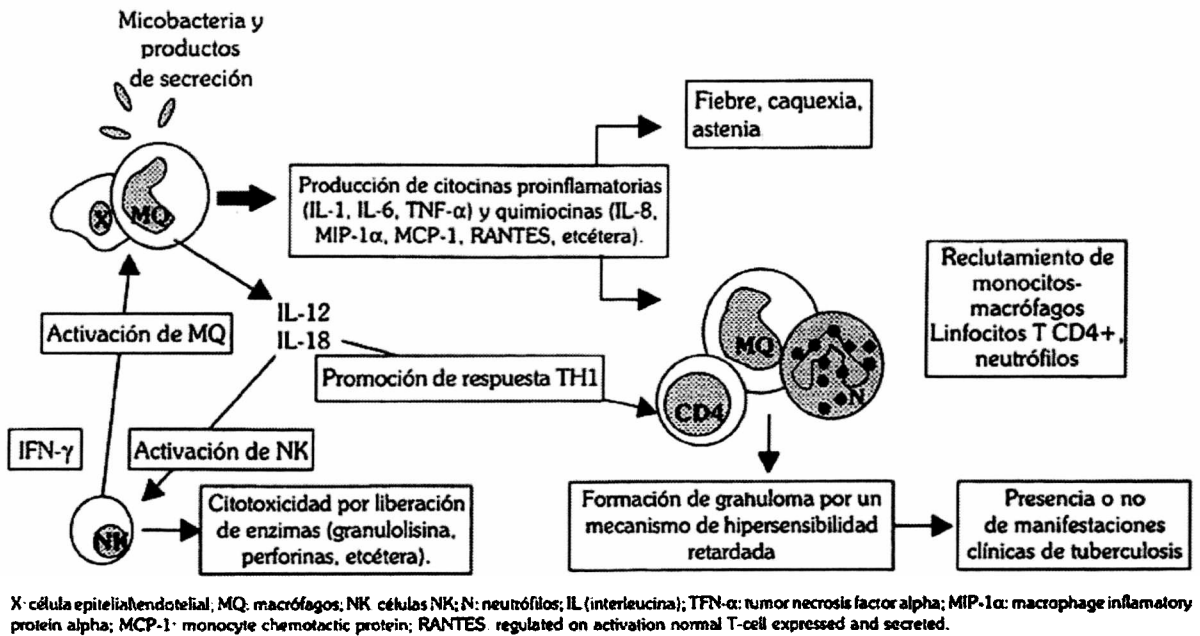


Figura 4. Eventos inmunológicos inespecíficos que ocurren tras la infección por *M. Tuberculosis* en seres humanos.

Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2001; Vol.14(1):39-48

Los organismos invasores son ingeridos y compartimentalizados en los fagosomas. Ellos son eliminados por mecanismos oxidativos y bactericidas y son degradados por la secreción de las enzimas lisosomales. Orme especifica que en ese proceso de defensa los macrófagos generan moléculas inflamatorias. Éstas hacen que los vasos sanguíneos adyacentes se vuelvan más permeables y expresen en su superficie moléculas adhesivas que promueven el egreso de células inflamatorias incluyendo monocitos. Se crea así, una neumonitis intersticial localizada (148).

### 6-3. Principales mediadores y células implicadas en la infección tuberculosa

#### 6-3-1. Células linfocitarias T

La inmunidad adquirida de tuberculosis es mediada por células, y la mayoría de los patrones en la generación de respuesta inmune celular es dependiente de linfocitos (T) dependiente del timo. Los linfocitos T son una generación heterogénea de células presentes en la circulación y en la mayoría de los órganos linfoides. Fig. 4 (320).

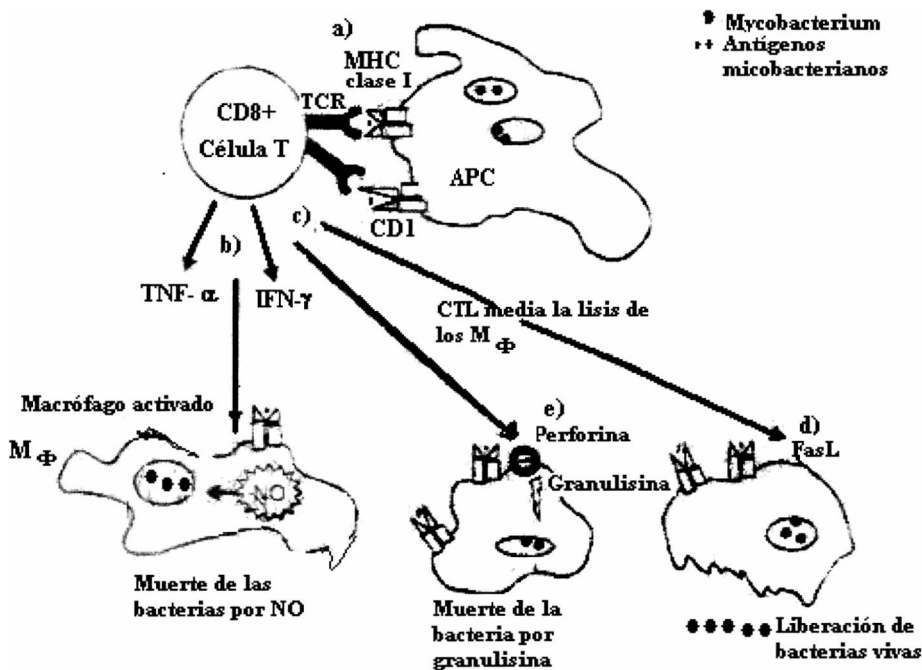


Fig. 5- Esquema de células linfocitarias T activadas por la infección de micobacterias. Flynn JL, Ernst JD., 2000

Es sabido que la población T es esencial para contener las infecciones micobacterianas (150). Las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> son las principales implicadas en la respuesta inmune a las micobacterias, pero está claro, por estudios hechos en ratón, que ninguna de las dos

subpoblaciones puede adecuadamente compensar a la otra en la protección contra la enfermedad (151, 152, 153, 154). Los antígenos de superficie celular han sido usados como marcadores fenotípicos de subtipos de células inmunocompetentes. Esos antígenos, referidos como grupos de antígenos diferenciados (CD), son moléculas glicoproteicas recubiertas de inmunoglobulinas de superficie. El antígeno se une a un receptor de célula T (TCR), es un dímero proteico. La mayoría de las células T poseen en su superficie un glicopéptido heterodímero de 90 kDa, consiste en cadenas alfa y beta unidas por puentes disulfuro. Otro grupo de TCR tiene un heterodímero con cadenas gamma y delta. Los receptores  $T\alpha\beta$  y  $T\gamma\delta$  están asociados al complejo CD3 de superficie. El TCR y el complejo CD3 son esenciales para la función efectiva de las células T.

Los linfocitos T que carecen de receptores  $\alpha\beta$  y contienen receptores  $\gamma\delta$  se localizan especialmente en órganos expuestos en forma directa a los antígenos externos, como pulmón, intestino y piel. Aparentemente se manifiestan en la respuesta temprana a las micobacterias. Estos linfocitos se acumulan en las reacciones granulomatosas cutáneas inducidas por micobacterias (155). Fig. 5 (147).

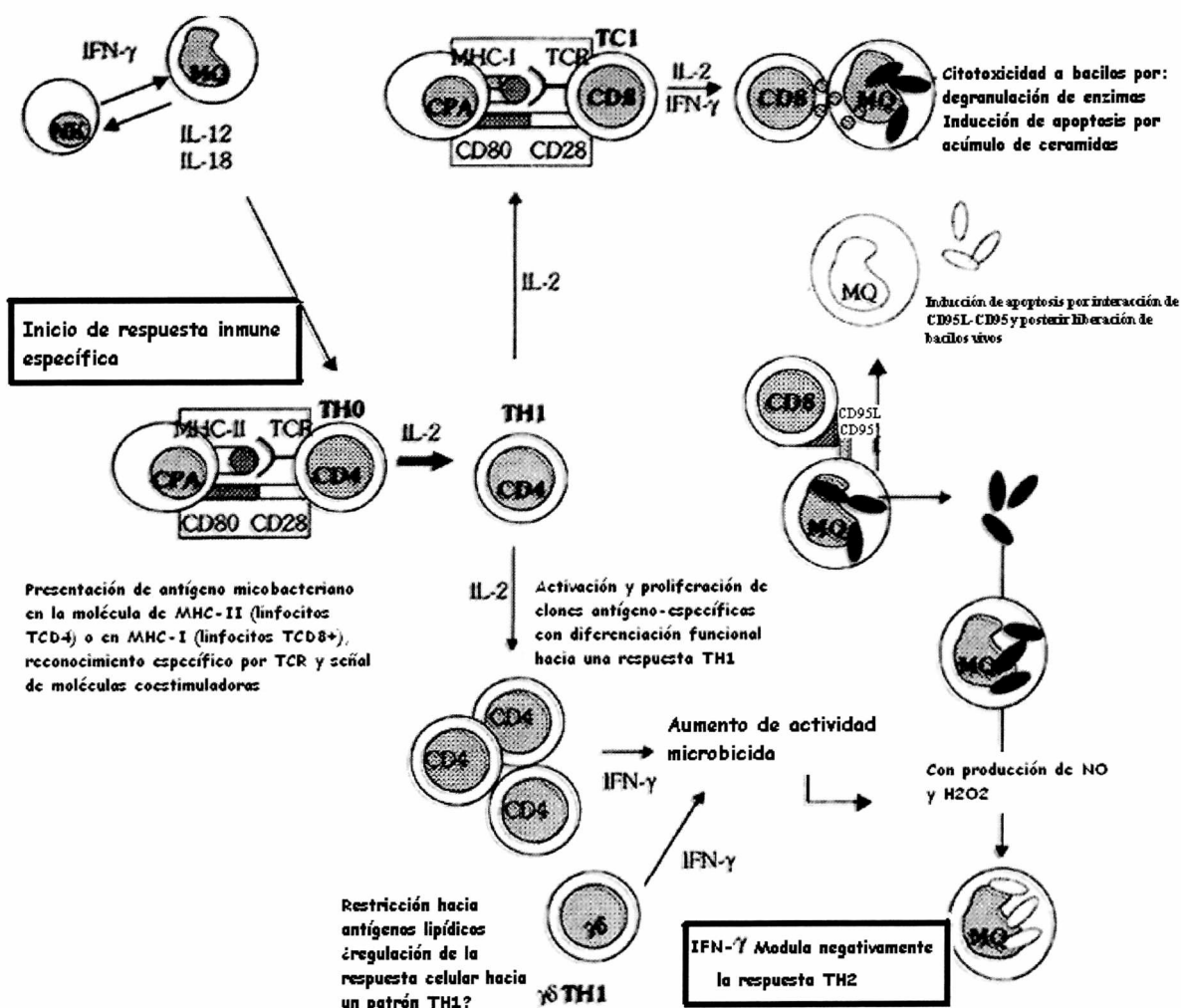


Fig. 6 CPA: célula presentadora de antígeno. MHC: complejo mayor de histocompatibilidad. TCR: receptor de linfocito T. CD4: linfocitos T CD4+. CD8: linfocitos T CD8+. TC1: linfocitos T citotóxico de tipo 1 (clasificación por patrón de citocinas). MQ: macrófago. IL: interleucina. IFN- $\gamma$ : interferón gamma. TH: linfocito T cooperador.  $\gamma\delta$ : linfocito T gamma-delta. NO: óxido nítrico. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2001; Vol.14 (1); 39-48

Las células T reconocen antígenos en conjunto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) expresado en la mayoría de las células. La mayoría de las células expresan moléculas del CMH tipo I, pero sólo un número limitado de células expresan moléculas del CMH tipo II. Estas células que expresan CMH tipo II son macrófagos, células dendríticas, células de Langhans de la piel, células de Kuppfer del hígado, y linfocitos B activados reconocen antígenos nativos, los antígenos necesitan ser procesados antes de presentarse a las células T. Los

macrófagos procesan los antígenos y los presentan en el contexto con moléculas del CMH en superficie. En el caso de la célula presentadora de antígeno (CPA), antígenos endocitados son procesados en un compartimiento ácido, seguida por la fusión de esas vesículas con otras vesículas conteniendo moléculas del CMH clase II, y son expuestas a la superficie de la célula y son presentados a los linfocitos T CD4+ activados. Estos estimulan la liberación de citoquinas, colaboran con los linfocitos B y facilitan su proliferación y diferenciación en linfocitos B de memoria y a células plasmáticas.

Algunos microorganismos viven y se multiplican en el interior de las CPA profesionales y en distintos grupos celulares, en cuyo citosol se encuentra un sistema enzimático que degrada proteínas y origina péptidos cortos (epitopes continuos). Estos se asocian a moléculas de clase I del CMH y son presentados en la superficie celular para su reconocimiento por los TCR (receptores de células T) de los linfocitos T CD8+. *M. tuberculosis* estimula el CMH clase I - células T CD8, dado que éstas participan en la protección, se propone que *M. tuberculosis* ubicado dentro del fagosoma, perfora la membrana fagosomal teniendo acceso a nutrientes citosólicos. Este mecanismo permite que antígenos micobacterianos accedan al camino de CMH clase I.

El reconocimiento de antígenos por las células T CD4+ resulta en la estimulación de funciones efectoras para la producción de linfoquinas. Sin embargo células T CD8+ cuando reconocen antígenos, causan lisis sobre células blanco por contacto directo. Es así en general que los linfocitos T CD4+ median la inmunidad contra bacterias intracelulares por activación de la capacidad microbicida de macrófagos vía linfoquinas, mientras que linfocitos T CD8+ median la inmunidad contra infecciones virales por lisis de células blanco.



Los antígenos micobacterianos, procesados dentro del macrófago en el fagolisosoma, son fragmentos proteicos enviados al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) que se encuentra en la superficie de la membrana del macrófago. Una vez que el péptido se une al MHC II es presentado a las células T CD4<sup>+</sup> o células helper o también llamadas células T restringidas a clase II. Las proteínas CD4 y CD8 sólo se expresan en los linfocitos T y son ambas proteínas de transmembrana cuya función no es sólo estabilizar la unión receptor T con MHC II / MHC I, sino también son necesarias para el desarrollo de las células T. Si los genes que codifican para CD4 o CD8 son inactivados en el ratón entonces las células helper (T CD4<sup>+</sup>) o las células citotóxicas (T CD8<sup>+</sup>) no se desarrollan. Las células T-CD4 funcionan también como receptor del virus HIV permitiéndole que infecte a las células T (156). Existe, por lo tanto, una sinergia entre HIV y la micobacteria. La infección a HIV depleta la población T CD4<sup>+</sup> y esto permite a la micobacteria crecer en forma desenfrenada. Además, los ratones que carecen del MHC II o T CD4 son sensibles a la infección con la cepa avirulenta BCG de *Mycobacterium bovis*. Ambas poblaciones de células T, T CD4<sup>+</sup> (helper) y T CD8<sup>+</sup> (citotóxica), son requeridas en la inmunidad contra una cepa virulenta de *M.tuberculosis*. Los ratones carentes de la población T CD8<sup>+</sup> son muy sensibles a las infecciones tuberculosas (151). Un trabajo realizado con bovinos infectados con *M bovis* mostró la producción y liberación de IFN- $\gamma$  de células T CD8<sup>+</sup> en respuesta a antígenos de *M. bovis*, indicando un posible mecanismo protector de esas células en tuberculosis bovina (157). Turner en el año 2001 publicó un trabajo realizado en ratones knockout de células T CD8 observándose el efecto de protección de las mismas durante la fase crónica de la enfermedad.

### 6-3-2. Células T $\gamma\delta$ .

Existen otros subgrupos de células T no comunes relacionadas con el control de la infección, son las células T $\gamma\delta$ . Las células T $\gamma\delta$  están localizadas principalmente en las mucosas y se piensa que son la primera línea de defensa contra el patógeno. Se ha demostrado que esta población de células se expande en cultivo *in vitro* cuando se lo expone a micobacterias. Hasta el momento se han focalizado con mayor atención las funciones de las células T $\alpha\beta$  pero hay crecientes evidencias de que las células T $\gamma\delta$  humanas y murinas son fuertemente estimuladas por varios antígenos micobacterianos (158, 159), incluyendo las proteínas del choque térmico. En los rumiantes jóvenes, las células T $\gamma\delta$  constituyen hasta el 75% de las células mononucleadas sanguíneas (PBMC) y, en los adultos, hasta un 40%. En contraposición, en humanos es sólo el 7% de los PBMC y en ratón del 2 al 3% de los PBMC expresan el receptor (TCR1) de las células T $\gamma\delta$ . Además, las células T $\gamma\delta$  activas en los rumiantes expresan una molécula de superficie de 215 kDa identificada como WC1 en la mayoría de los PBMC TCR1+ (160). Hasta el momento se han encontrado resultados contradictorios en cuanto a su funcionalidad en experimentos en los que se produce la depleción de T $\gamma\delta$ . Observan una respuesta proliferativa aumentada, lo que estaría indicando un efecto supresivo de esta subpoblación sobre la respuesta de las células T $\alpha\beta$  (161) mientras que otros investigadores demuestran una disminución de la misma (162).

Las funciones de las células T $\gamma\delta$  no están todavía bien definidas. El gran número de estas células encontradas en rumiantes, sugiere la necesidad de una investigación más amplia, para establecer su función en la defensa contra tuberculosis bovina.

## 6-4. Funciones efectoras de las células T y macrófagos en tuberculosis

### 6-4-1. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

La inmunidad a las infecciones causadas por *M. tuberculosis* implica la inducción de una respuesta inmune mediada por células (CMI) por medio de la cual las células TCD4 (+) y TCD8 (+) producen IFN- $\gamma$  que activa los mecanismos de defensa antibacteriana de los macrófagos infectados para que destruya o al menos contenga el crecimiento micobacteriano (163, 164, 165, 166). La consecuencia más importante de esta activación es la producción de óxido nítrico (NO) por el macrófago. Los ratones carentes del gen que codifica para IFN- $\gamma$ , para el receptor de IFN- $\gamma$  ( $\gamma$ R-IFN) y de la enzima responsable de la producción NO (iNOS) son altamente sensibles a las infecciones tuberculosas (166). Los ratones que no secretan IFN- $\gamma$  son altamente sensibles a la infección por cepas de BCG (167, 168). En ratones con una infección latente de *M. tuberculosis* si son tratados con aminoguanidina, un inhibidor de iNOS, se reactiva la enfermedad, proveyendo así evidencia de la función de iNOS y de NO en el control de la misma. Dos señales son requeridas para la producción de NO por el macrófago. La micobacteria viva activa a un receptor Toll-like (TLR2), éste hace que el factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B) se transloque al núcleo del macrófago, mediante la degradación del inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B. El factor de transcripción se une al promotor de iNOs (NOS2). Por otro lado, IFN- $\gamma$  vía STAT1 induce la expresión de IRF-1, un factor de transcripción que se une también a NOS2. En este ejemplo de los requerimientos para la producción de NO se ve cómo los dos sistemas inmunes (SII y SIA) interactúan en forma sinérgica. Estos hechos probablemente estén confinados a un proceso de infección temprana.

Es evidente que el IFN- $\gamma$  es esencial para el control de las infecciones tuberculosas; sin embargo, las células T productoras de IFN- $\gamma$  pueden ser aisladas de muchos individuos infectados, indicando que este mecanismo por si solo es insuficiente para eliminar la infección. Inhibir la respuesta de los macrófagos al IFN- $\gamma$  es un mecanismo que el bacilo posiblemente explote para evadir ser eliminado. Ting y colaboradores informaron que la infección de *M. tuberculosis* parcialmente inhibe la respuesta del macrófago al IFN- $\gamma$ . Esta inhibición es a nivel transcripcional. No se conoce el mecanismo, pero se sabe que el efecto que produce la bacteria, es no permitir la interacción del factor de transcripción STAT1 con sus coactivadores CBP y p300. La inhibición de la respuesta al IFN- $\gamma$  hace que disminuya su eficacia en tuberculosis (169). La interleuquina 12 (IL-12) secretada por el macrófago juega también, una función esencial en la respuesta inmune desarrollada por el huésped hacia la tuberculosis. La principal función de IL-12 es aumentar la secreción de IFN- $\gamma$ . Diferentes resultados confirman que la principal función de IL-12 es aumentar la secreción de IFN- $\gamma$  e influir sobre la respuesta T hacia un fenotipo Th1.

#### **6-4-2. Liberación de Citoquinas en la respuesta inmune**

Las citoquinas son hormonas locales producidas por muchos tipos de células, que regulan en forma positiva o negativa las respuestas inflamatorias específicas o inespecíficas (170). Ejercen diferentes funciones: inducen una respuesta local y sistémica, orientan el curso de la respuesta inmune adaptativa, median el reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación e inducen la proliferación y/o diferenciación de los precursores leucocitarios actuando a nivel de la médula ósea (146).

### 6-4-3. Células citotóxicas en tuberculosis

La actividad citotóxica de las células TCD8 (+) puede contribuir a la protección, por lo menos, de dos maneras:

1. Lisis de los macrófagos, incapaces de ser activados para matar el *M. tuberculosis* intracelular y liberar a la micobacteria, para ser tomada por macrófagos activos.

2. Matar directamente las micobacterias intracelulares lo que contribuye a la protección del huésped (171).

Durante el curso de la infección con micobacterias, además del desarrollo de células T mediante citoquinas, los antígenos micobacterianos estimulan antígenos específicos del CMH I restringido a células T CD8+ citotóxicas, y la cinética de aparición de esas dos clases de células es diferente. Antígenos micobacterianos también estimulan células natural Killer (NK). Las células citotóxicas naturales (NK) representan una población de linfocitos siendo el componente fundamental en la respuesta inmunitaria innata contra una gran variedad de microorganismos patogénicos. Las células NK no son sólo citotóxicas, que tienen la capacidad de secretar citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF. Probablemente juegan un papel importante en la respuesta inespecífica que se produce en la fase temprana de la tuberculosis. Recientes investigaciones de von Andrian, han demostrado que éstas células NK tienen memoria inmunológica y son capaces de generar respuesta inmune contra antígenos específicos, rompiendo el dogma de que la inmunidad adaptativa era limitada solo a linfocitos T y B (172).

Las células NK constituyen el 10-15% de la población de miocitos sanguíneos y proliferan por estímulo de las citoquinas de monocitos y linfocitos T. No presentan receptores CD3 en su superficie. La estimulación de los receptores de superficie del CMH clase I, desactiva sus

funciones de lisis. Los macrófagos que contienen microorganismos intracelulares producen TNF $\alpha$ , IL-12, IFN- $\alpha/\beta$ , IL-15 e IL-18 (factor inductor de IFN- $\gamma$ ) que activan a las células NK. Estas células NK producen IFN- $\gamma$  que activa a los macrófagos en forma inespecífica durante la fase temprana de la inflamación, y favorece la generación de respuesta TH1 por sobre la TH2. También lisan las células que contienen bacilos, induciendo la apoptosis de éstas por activación de una cascada enzimática que lleva a la fragmentación del ADN a través del sistema de las caspasas (146).

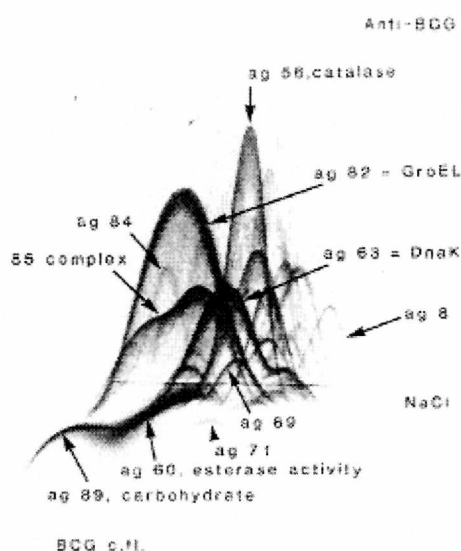
## 7. Antígenos

Uno de los principales temas de investigación desde que Koch identificara a *M. tuberculosis* fue el de detectar y caracterizar los antígenos principalmente proteicos de este organismo. A partir de la década del 40 del siglo pasado, se demuestra que la inmunidad a la tuberculosis es mediada por células (173, 174). Esto conllevó al estudio de la interacción de estos componentes micobacterianos individuales con el sistema inmune de humanos y/o animales.

El objetivo es entonces identificar antígenos micobacterianos implicados en la inducción de inmunidad en el huésped para mejorar los métodos de diagnóstico o poder ser utilizados como futuros componentes en vacunas contra la tuberculosis. Para cumplimentarlo se aplicaron distintas técnicas y estrategias.

### **7-1. Metodologías y nomenclaturas empleadas en la identificación de los antígenos proteicos micobacterianos**

En 1890 Koch informó de un producto al que llamó *old tuberculin* (OT). Una vez obtenido el PPD se utilizó en el diagnóstico de la tuberculosis humana y bovina. PPD no es un reactivo especie-específico y genera una amplia reacción cruzada. Esta es la razón por la cual se comenzó a buscar antígenos micobacterianos que no fuesen mezclas de productos sino proteínas individuales. Los métodos usados fueron fraccionamientos fisicoquímicos que acarrearán muy poco riesgo de desnaturalización. Estos fueron: cromatografía de intercambio iónico, de exclusión molecular, ultra centrifugación con gradiente de densidad, isoelectroenfoque y electroforesis zonal. Se aplicaban sobre sonicated o filtrados de cultivos de *M. tuberculosis*. Se obtenía una compleja cantidad de antígenos y muy pocos de ellos lograron ser caracterizados. Con el desarrollo de la electroforesis en dos dimensiones se llegó a un número de 36 proteínas identificadas (175). Este sistema fue mejorado aplicando electroforesis en dos dimensiones e inmunoelectroforesis cruzada (CIE) (176). CIE se usó para desarrollar un sistema de referencia que clasificara a los antígenos micobacterianos. Se estableció, así, una nomenclatura basada en el sistema de referencia de CIE para antígenos secretados. La utilización de anticuerpos específicos permitió determinar el peso molecular de los antígenos. Con este método se identificaron más de 50 picos de antígenos de *M. bovis* BCG, usando un suero anti BCG. El patrón obtenido era altamente reproducible. Los componentes antigénicos identificados estaban presentes en extractos de BCG preparado por ultrasonificación. Esta técnica también fue aplicada para antígenos de *M. tuberculosis* (177).



**FIG 7.-** CIE de una preparación de antígenos de *M. bovis* BCG conteniendo proteínas secretadas y citoplasmáticas. La parte superior del gel contiene una inmunoglobulina policlonal anti BCG. Los antígenos micobacterianos están indicados con números y, cuando se conoce, sus características funcionales (178).

En este método las proteínas eran analizadas en su configuración nativa y era posible estudiar la relación de los grupos o de las familias de proteínas. La localización de las curvas de precipitación individuales en el patrón de CIE es una de las características más importantes para la identificación de las proteínas (Fig. 6). Pero en un sistema determinado, este patrón puede variar marcadamente cuando se usan distintas preparaciones antigénicas y antisueros. Esto fue la causa de que la técnica no fuese reproducible entre distintos laboratorios. Por lo tanto, se



aconseja que dos preparaciones distintas de antígeno o anticuerpo debe ser comparada mezclándolos en varias proporciones en un set de cuatro placas de CIE. Se considera que las preparaciones de antígeno o anticuerpo son similares cuando las posiciones de los precipitados permanecen invariables. Esta técnica es particularmente valiosa para comparar patrones complejos con un gran número de líneas precipitadas (178). Esta técnica fue utilizada para caracterizar el Ag 84 y el complejo antigénico 85 de *M. tuberculosis* y *M. leprae* (179).

Otro método utilizado para la identificación de proteínas estuvo basado en la movilidad en PAGE no desnaturizante. Sadamu Nagai lo llamó MPT (señal de proteínas purificadas de *M. tuberculosis*) o MPB (proteínas purificadas de *M. bovis*) con un número que hacía referencia a la movilidad relativa de la proteína en un PAGE no desnaturizante (180). Para un número de proteínas, la designación de MPT (Ej.: MPT63, MPT64, y MPT 83).

Otra forma fue mediante el análisis de la secuencia N-terminal y por espectrometría de masa (MS).

Actualmente, la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* (82) ha permitido que se pueda predecir a través de los marcos de lectura abiertos (open reading frames ORFs) las que posiblemente codifiquen proteínas secretorias, dado que las proteínas tienen un péptido señal cuyo motivo N-terminal es conocido (<http://bioweb.pasteur.fr/Genolist/TubercuList>).

La designación de cada gen es con un número específico de Rv, dando lugar a la aplicación del sistema que da la identificación y nomenclatura de las proteínas de *M. tuberculosis*.

**TABLA 5.-** Clasificación de las proteínas de *M. tuberculosis* predecidas por el programa ExProt que poseen secuencias señales estándar y para lipoproteínas que se translocan por el mecanismo Sec-dependiente.

TIPO DE PROTEÍNAS	Nº de orfs identificadas
Proteínas de membrana	98
Proteínas ancladas a la superficie <sup>a</sup>	4
Lipoproteínas <sup>b</sup>	88
Proteínas unidas a penicilina/solutos	15
Hidrolasas <sup>c</sup>	38
Sintetasas/transferasas	54
Oxidoreductasas/dehidrogenasas	44
Proteínas transportadoras de acilos	3
Proteínas involucradas en la división celular	3
Quinasa	8
Proteínas asociadas a la virulencia	5
Familia PE/PPE	30
Otras	8
Desconocidas	317

<sup>a</sup> Se basa en la presencia del hexapéptido LPXTG anclado en la pared celular por el C-terminal (181).

<sup>b</sup> Se basa en la presencia del consenso modificado para lipoproteínas en procariontes [LIVMFWSTAG](2)-[LIVMFYSTAGCQ]-[AGS]-C (182).

<sup>c</sup> Este grupo incluye proteasas, lipasas, glicosil hidrolasas, esterasas y fosfatasas.

Miriam Braunstein and John Belisle. Molecular Genetic of Micobacteria. Chapter 13 (2000). ASM Press, Washington DC.

**Tabla 6.-** Proteínas de *M. tuberculosis* a las que les falta la secuencia señal y se encuentran en el filtrado del cultivo.

Proteína	Gen	Descripción	Referencias
L-alanina deshidrogenasa	<i>ald</i>	Síntesis L-alanina	183-Andersen et al, 1992
	Rv2780		298-Raynaud et al, 1998
			185-Weldingh et al, 1998
Alfa-cristalina	<i>hspX</i>	Chaperona asociada con baja	186-Cunningham et al, 1998; 187-
	Rv2031c	tensión de oxígeno y condiciones de fase estacionaria	Sonnenberg et al, 1997; 188-Yuan et al, 1996
CFP29	Rv0978c	Antígeno	189-Rosenkrands et al, 1998; 199-Weldingh et al, 1998
CFP10	Rv3874	Familia de ESAT-6	190-Berthet et al, 1998
CFP17	Rv1827	Antígeno	185-Weldingh et al, 1998
CFP20	<i>tpx</i>	Tiol peroxidasa antígeno	185-Weldingh et al, 1998
	Rv1932		
CFP22	<i>ppiA</i>	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i>	185-Weldingh et al, 1998
	Rv0009	isomerasa	
DnaK	<i>dnaK</i>	Chaperona	187-Sonnenberg et al, 1997; 185-
	Rv0350		Weldingh et al, 1998
ESAT-6	<i>esat-6</i>	Antígeno	187-Sonnenberg et al, 1997; 191-
	Rv3875	Secretada	Sorensen et al, 1995; 185-Weldingh et al, 1998
Glutamina sintetasa	<i>glnA1</i>	Síntesis de glutamina o	192-Harth et al, 1994
	Rv2220	glutamato	191-Sonnenberg et al, 1997
Hemaglutinina	Rv0475	Adhesina	193-Menozzi et al, 1998

Superóxido dismutasa	<i>sodA</i>	Detoxifica los intermediarios	194-Andersen et al, 1991
	Rv3846	reactivos del oxígeno	191-Sonnenberg et al, 1997; 185-Weldingh et al, 1998
Tioredoxina	<i>trxC</i>	Detoxifica los intermediarios	197-Sonnenberg et al, 1997; 185-
	Rv3914	reactivos del oxígeno	Weldingh et al, 1998; 195-Wieles et al, 1995
Catalasa/peroxidasa	KatG	Detoxifica los intermediarios	184-Raynaud et al, 1998
	Rv1908c	reactivos del oxígeno	197-Sonnenberg et al, 1997
GroES	GroES	Chaperona	197-Sonnenberg et al, 1997; 185 -
	Rv3418c		Weldingh et al, 1998
Ag 85 A, B y C	Rv1886c	Actividad de micolil	196-Wiker, 1990
	Rv0129c	transferasa, ubicadas en la pared celular	
MPT70	Rv 2875	Proteína inmunogénica Secretada	180-Nagai et al, 1981
MPB64	Rv1980c	Proteína inmunogénica Secretada	197-Oettinger et al, 1994

Miriam Braunstein and John Belisle. Molecular Genetic of Micobacteria. Chapter 13 (2000). ASM Press, Washington DC.

Con el desarrollo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales, éstos se comenzaron a producir contra los antígenos de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. leprae*. La caracterización de estos anticuerpos a nivel de sus reactividades antigénicas, especificidades de especie y reacciones cruzadas fueron informadas y analizadas en dos talleres científicos respaldados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) (198, 199). Un interesante descubrimiento fue que la gran mayoría de los anticuerpos monoclonales de *M. tuberculosis* tenían reacción cruzada con los antígenos de *M. bovis*. Algunos de los monoclonales encontrados eran específicos al complejo de *M. tuberculosis* mientras que otros contra *M. leprae* eran especie-

específicos. La mayoría de estos anticuerpos tenía reacción cruzada con un gran número de especies bacterianas (199). El uso de otras cepas de ratones trajo aparejado la obtención de más anticuerpos monoclonales que reaccionaron con nuevos antígenos (194, 200, 201, 202, 203). Gracias a la colaboración de numerosos laboratorios y la coordinación de la Organización Mundial de la Salud (204) se generó un gran panel de anticuerpos contra antígenos de *M. tuberculosis*. Algunos fueron distribuidos al banco de datos (WHO Mab bank). En 1988 se caracterizaron diez anticuerpos monoclonales específicos de *M. bovis* y *M. bovis* BCG que mostraban una reacción cruzada limitada con algunas cepas de *M. tuberculosis*. Todos los monoclonales reconocían una proteína de 22 kDa que había sido denominada previamente MPB70. Estos monoclonales reconocían tres epitopes distintos del antígeno MPB70 (205).

Los anticuerpos monoclonales fueron utilizados:

- \* En el diagnóstico de las infecciones micobacterianas identificando los epitopes específicos del antígeno y poder obtener así información de las características fisicoquímicas de esta proteína tales como: carga, tamaño y complejidad.
- \* En la purificación del antígeno.
- \* En la identificación de los antígenos micobacterianos expresados como proteínas de fusión que provenían de los clones de genotecas de expresión en fagos (lambda gt11, lambda Zap).
- \* Como sistema de referencia cruzada.

Sin embargo, no resolvían el problema básico de la identificación de los antígenos responsables de la protección. Ellos detectaban el grupo de antígenos involucrados en la respuesta B o humoral. A partir de aquí, la mayoría de las investigaciones se enfocaron a detectar antígenos que estimularan la población de las células T que es la que está

directamente relacionada con la protección. Una de las técnicas inmunológicas que permite poder seleccionar el antígeno por su habilidad de inducir *in vitro* la proliferación de linfocitos T es el ensayo de linfoproliferación (LTA) o blastogénesis y la determinación de IFN- $\gamma$  (ver materiales y métodos).

En 1995 fue identificada ESAT-6 (Rv 3875), es una proteína secretada de *M. tuberculosis*, con un peso molecular de 10kDa, altamente inmunogénica, la cual ha sido muy estudiada como candidata para el diagnóstico y/o para vacuna. El gen ESAT-6, está localizado en la región RD1, es una región del cromosoma de *M.tuberculosis* y *M.bovis*, que se encuentra deletado en la cepa atenuada de *M. bovis* BCG. Muchos trabajos han publicado respecto a la virulencia de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Un trabajo realizado por Pollock 1997 estudió la respuesta inmune de ésta proteína, obtenida de un cultivo de poco tiempo, en vacas experimentalmente infectadas con *M. bovis*. La primera señal de respuesta significativa de las células T, la observó a la tercera semana después de la infección, caracterizada por una alta respuesta de IFN- $\gamma$  en la mayoría de los animales testeados con tuberculosis bovina. Vordermeier (2001) a igual que Pinxteren (2000) usaron la combinación de los dos antígenos ESAT-6 y CFP-10 como diagnóstico diferencial de tuberculosis en 10 vacas con confirmación de tuberculosis, observando que la secreción de IFN- $\gamma$  de cada uno por separado es 75% y la unión de ambos es 78% en vacas infectadas utilizando la técnica de placa de Elispot. Buddle et al. (2001) trabajaron con 51 bovinos naturalmente infectados y 85 no infectados, obteniendo una sensibilidad del 88% y una especificidad del 99%. Waters 2004, utilizó ESAT-6 y CFP-10 como proteínas fusionadas para diferenciar vacas infectadas de *M. bovis*, *M. avium subsp. avium* y *M. avium subsp. paratuberculosis*. La secuencia del genoma reveló que *M.*

*tuberculosis* tiene una familia de proteínas como ESAT-6 (22 miembros en *M. tuberculosis*). En la región RD1, se encuentra formando un operón con un gen codificando otro miembro de la familia, *cfp-10* (Rv 3874).

ESAT-6 se la clasifica como una proteína de secreción temprana de un cultivo en crecimiento, y se la ha descrito también asociada a la pared celular. ESAT-6 y CFP-10 no tienen la secuencia señal, por lo que el mecanismo de exportación no se conoce bien. Hay genes identificados necesarios para la secreción de ESAT-6 (estudiados por delección de los mismos en la región RD1 de *M. tuberculosis*). Este análisis mostró que Rv3870, Rv3871 y Rv 3877 son requeridos para la secreción de ESAT-6 y CFP-10. Se observó atenuación de la virulencia, mutando éstas proteínas. Esto implica que debe ser secretada para que tenga función en la patogénesis de la enfermedad. (206)

El antígeno de secreción MPB70 (Rv2875), es una proteína de secreción, tiene una homología de secuencias del 63% con MPB83, ambas son altamente inmunogénicas en ratones infectados (207). Forma parte en un 10% de las proteínas secretadas por *M. bovis* al medio de cultivo. Se estimó un peso molecular de 18kDa por el método de electroforesis. (180). En ese trabajo, la reacción en cobayos sensibilizados con *M. bovis* BCG a la prueba intradérmica, fue específica a MPB70, no reaccionó con animales sensibilizados con *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*, *M. intracellulae* y *M. phlei*. Koo et al. (2005) realizaron un trabajo utilizando los sueros de 300 vacas naturalmente infectadas y 20 vacas infectadas experimentalmente, en pruebas serológicas. Los anticuerpos anti-ESAT-6 fueron detectados al día 27 y 90 posinfección hasta el cuarto mes, y anticuerpos anti-MPB70 al día 137 pos-infección. La sensibilidad y especificidad de las pruebas para ESAT-6 fue 95%, y para MPB70 la sensibilidad fue 83% y la especificidad 90% (208). Pollock et al. (2000) realizó un trabajo con éstos antígenos estudiando

la liberación de IFN- $\gamma$  en 180 vacas positivas a la reacción de tuberculina y 131 de estos fueron confirmados como positivos a tuberculosis. La sensibilidad (S) y especificidad (E) se observan en la tabla 7.

Tabla 7-Sensibilidad y especificidad de los siguientes antígenos ESAT-6, MPB70 y PPDB, en animales con intradermoreacción positiva (IDR+)

	ESAT-6		PPDB		MPB70	
	S	E	S	E	S	E
IDO $\geq$ 2	76,3	99,2	89,3	92,2	38,9	95,3
IDO $\geq$ 1,5	83,2	93,8	90,8	88,3	49,6	91,4

Un trabajo realizado por Buddle et al. (1998), con un grupo de bovinos vacunados con BCG y otro grupo no vacunado, a los cuales se los desafió con una cepa de *M. bovis* observaron que MPB70, a igual que otras dos proteínas MPB64 y MPB59 tuvieron bajos niveles de estimulación de linfocitos T, y más bajos aún en los animales vacunados (209).

El complejo antígeno 85, comprende el Antígeno 85A (Ag 85A) (31kDa), Ag 85B (30kDa) y el Ag 85C (31,5 kDa). Los 3 componentes del complejo, son proteínas antigénicas ubicadas en la membrana celular. Siendo las proteínas de secreción más abundantes del cultivo de *M. tuberculosis*. Se encuentran dentro de los fagocitos mononucleares del hombre. Estas proteínas tienen inmunidad protectora en el modelo animal, siendo atractiva como candidatas a vacunas. Andersen et al. (1991) trabajando con proteínas del cultivo en diferentes momentos, observaron que éste complejo Ag85 se liberaba gradualmente durante el crecimiento de la



micobacteria. Estimula la captación de la micobacteria por el macrófago humano y está implicada en la interacción con el sitio de unión a la gelatina de la fibronectina humana (194). Cada proteína del Ag85 contiene una secuencia unida a la fibronectina localizada en la superficie expuesta. Las proteínas tienen actividad micolil transferasa y cataliza la transferencia del ácido graso micólico de una molécula trealosa monomicolato a otra, resultando en la formación de dimicolato trealosa y trealosa libre, ayudando en la formación de la pared celular bacteriana (213). Son muy conservadas en *M. bovis* BCG, *M. leprae* y *M. tuberculosis*. Se han encontrado homólogos al antígeno 85 en todas las especies de micobacterias (210, 211). Smith (1999) estudió la inducción de reacción de las células T CD8+ infectando con *M. bovis* BCG (212). Estas células reconocieron los antígenos 85A y B, demostrando ser el blanco antigénico en la expresión del Ag 85A y B, protegiendo contra una descarga de *M. tuberculosis*.

El antígeno MPB64, fue descrito por Andersen et al. (1991) como una proteína de 24 kDa, secretada por *M. bovis* en los primeros días del cultivo (8% de las proteínas totales) (194). Haga et al. (1995) realizaron un trabajo en cobayos midiendo el tipo de hipersensibilidad retardada, sensibilizados con *M. bovis* y *M. bovis* BCG, estableciendo que no se encuentra en BCG (214). Lightbody et al. (1998) realizaron un estudio con 14 bovinos infectándolos por instilación intranasal ( $2 \times 10^8$  UFC de *M. bovis*), observando la estimulación de respuesta a las células T (215). Black et al. (2003) observaron baja eficiencia de este antígeno realizando una asociación entre reacción de Mantoux y producción de IFN- $\gamma$ , dado que la respuesta de IFN- $\gamma$  a este antígeno fue tan baja como 2%, a diferencia de ESAT-6 (11%), MPB70 (9%) y Ag85 (29%) (216).

El antígeno MPB83 de *Mycobacterium bovis* tiene un peso molecular de 26kDa. Es una lipoproteína de exportación asociada a la superficie bacteriana. Es un antígeno dominante estimulante de células B en tuberculosis bovina con la correspondiente producción de anticuerpos en bovinos infectados con *M. bovis*. Un estudio de McNair et al. (2001), determinó una sensibilidad y especificidad en ensayos serológicos de 37,5 y 89%, indicando tener potencial para ser desarrollada en ensayos para diagnóstico serológico en tuberculosis bovina (217). Resultados de Jiang 2006, indicaron que tiene actividad antigénica en *M. bovis* y los resultados mostraron expectativas para el estudio de nuevas vacunas a subunidades y vacunas a ADN del gen MPB83 para prevenir contra *M. bovis* (218).

## **7-2. Selección de los antígenos reconocidos por la población T (antígenos T)**

### **7-2-1. A partir de fracciones proteicas de micobacterias**

\* El primer método fue diseñado por Abou-Zeid y colaboradores que consistía en precipitar las proteínas liberadas al medio por un cultivo de *M. tuberculosis*. Luego, se separaban por una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) para ser después transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Ésta se cortaba en fragmentos pequeños que contenían las distintas fracciones separadas por la electroforesis. La mayoría de las proteínas quedaban fijas a la membrana de nitrocelulosa, estos fragmentos se resuspendían por un tratamiento químico. Con cada una de estas suspensiones se medía la respuesta proliferativa en células sanguíneas mononucleadas (PBMC) tanto de individuos con reacción tuberculina positiva como de pacientes con tuberculosis activa. El principal problema de esta

metodología era la imposibilidad de determinar la concentración de proteínas presente en cada una de esas suspensiones. Esta carencia hacía dificultoso estimar con exactitud qué fracción es más antigénica que otra (219).

\* La metodología anterior es perfeccionada por Gulle y colaboradores en 1990 separando las proteínas de *M. tuberculosis* precipitadas del medio de cultivo por electroforesis en dos dimensiones (2D) (220). Las proteínas presentes en el gel de la segunda dimensión son transferidas a un medio líquido. A este proceso se lo denomina electroelución (“blot-elution”). El aparato en que se realiza esta transferencia es diseñado *ad hoc* por estos investigadores y consta de 480 pocillos donde las proteínas eluidas son contenidas. Las proteínas son cuantificadas y utilizadas en los experimentos de linfoproliferación con PBMC de individuos tuberculina positivos. El único inconveniente de esta metodología es la poca cantidad de proteína recolectada.

\* Una tentativa similar desarrollaron Andersen y colaboradores en 1992 quienes diseñaron un método semipreparativo de electroelución de proteínas. Al igual que sus antecesores parten de las proteínas liberadas de un cultivo de *M. tuberculosis*. Primero las concentran y dializan, luego las fraccionan mediante geles preparativos desnaturalizantes (PAGE-SDS) y luego estas fracciones proteicas son electroeluidas en el aparato por ellos diseñado (Ver Materiales y Métodos). A través de esta metodología es posible fraccionar una mezcla de proteínas antigénicas separadas en distintas fracciones las cuales son utilizadas en linfoproliferación. Las PBMC con que se enfrentaban estas fracciones correspondían tanto a individuos con reacción tuberculina positiva como a pacientes con tuberculosis activa. Las fracciones estimulantes de la población T son separadas por electroforesis en 2D y así se aíslan las proteínas individuales.

La presencia de antígenos que estimulan células T como Ag 85B (Rv1886c), MPT64 (Rv1980c), y ESAT6 (Rv3875) en el extracto extracelular de *M. tuberculosis* ha permitido detallar el mapa proteómico del filtrado del cultivo, también como de proteínas celulares. El estudio más extenso utilizó un formato grande de gel y MALDI-MS de alta sensibilidad, e identificó 1800 proteínas celulares (obtenidas de lisado de células totales) y 800 proteínas del filtrado del cultivo (221). La comparación del genoma *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG reveló que 11 regiones (91 ORFs) del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv están ausentes en una o más cepas virulentas de *M. bovis*. Agregando a esto 5 regiones, representando 38 ORFs, que estuvieron presentes en *M. bovis* pero ausentes en algunas o todas las cepas de BCG. Se ha evidenciado esto durante la evolución de la cepa BCG partiendo de la original *M. bovis* (222). Análisis del perfil de proteínas celulares de esos dos organismos caracterizó 32 spot únicos de proteínas de *M. tuberculosis* (223). El primer análisis proteómico de *M. tuberculosis*, fue realizado en un momento de estrés del medio de cultivo, conocido antes de completar la secuencia del genoma y se obtuvieron las proteínas de *heat shock* y de estrés oxidativo (224, 225, 226).

Young y Garbe identificaron 7 genes, DnaK (Rv0350), GroEL (Rv0440), GroES (Rv3418c) y 4 proteínas nuevas de *M. tuberculosis* inducidas en el período de *shock* térmico. La respuesta al estrés oxidativo fue limitada, resultó en un aumento de la producción de KatG (Rv1908c) (225) y un número pequeño de otras proteínas (224). Se vio que en *M. tuberculosis* un gen regulatorio relacionado a la respuesta oxidativa (oxyR) tiene múltiples mutaciones inactivantes (225). Esto sugiere la hipótesis que *M. tuberculosis* puede haber desarrollado una respuesta al estrés oxidativo constitutiva y que la proteína como tioredoxina AhpD (Rv2429), junto con la enzima SucB (Rv2215), Lpd (Rv0462), y AhpC (Rv2428), le sirven a *M. tuberculosis* como defensa antioxidante (227). La respuesta de *M. tuberculosis* a diferentes dadores de oxido nítrico, fue

estudiado por Garbe TR, 1999, usando geles 2D, y fue reportado la inducción de la alfa cristalina (Acr/Nox 16/Rv2031c) y bacterioferritina (Nox19/BfrB/Rv3841).

*M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en estado latente, durante largos períodos de tiempo, bajo condiciones caracterizadas por niveles de bajo oxígeno (dormancia), bajo pH, y sin nutrientes. La proteína que se ha encontrado aumentada en estas condiciones es la proteína alpha cristalina (Acr, Rv2031c) (228).

### **7-3. Localización de las proteínas**

Una de las propiedades más importantes relacionadas con la función específica de la proteína es la localización subcelular. Andersen y col. 1991, observaron las diferencias en el perfil de proteínas secretado en la fase temprana y tardía durante el crecimiento del cultivo, estableciendo la idea de que *M. tuberculosis* generaba proteínas secretadas activamente y otro grupo que liberaba células de la pared durante el proceso de crecimiento. Hoy por medio de métodos bioinformáticos, se pueden diferenciar proteínas exportadas de las no exportadas. El programa signal P tiene la habilidad de identificar la secuencia señal asociada con las proteínas de translocación por medio del sistema dependiente de Sec. Otro programa para predecir la exportación de las proteínas es LocateProtein, aunque este indica la secuencia de exportación conocida y la secuencia de la proteína. Usando éste programa y el programa ExProt, se puede determinar que un cuarto de las proteínas producidas por *M. tuberculosis* pueden ser excretadas o exportadas. Las técnicas proteómicas son ideales para responder estas preguntas y se podría medir cuantitativamente la localización de la proteína. La mayoría de los estudios proteómicos de *M. tuberculosis*, han estudiado las proteínas del sobrenadante de cultivo, del citosol, o del lisado

de la pared celular. Respecto al estudio de la pared celular de *M. tuberculosis*, identificaron 413 *spots* de proteínas por 2D-PAGE, 23 fueron identificadas a nivel molecular. Muchas de esas proteínas fueron también observadas en el sobrenadante de cultivo o en el citosol, también pueden estar en fracciones subcelulares (229). Se analizaron las proteínas de membrana tomadas del SDS-PAGE y la identificación de proteínas múltiples en una banda de SDS-PAGE por microcapilaridad MS cromatografía líquida de alta performance en tandem, y no por técnicas proteómicas convencionales. Se identificaron 739 proteínas en las fracciones de membrana, 85 eran proteínas de transmembrana y 120 proteínas estaban asociadas a membrana basadas en la función bioquímica predictiva.

#### **7-3-1. Proteínas de translocación y secreción**

En bacterias, las proteínas se localizan en el compartimiento extracitoplasmático a través del sistema de exportación, que selectivamente son translocadas. Una cantidad de proteínas de exportación de *M. tuberculosis* son antígenos protectivos, el sistema de proteínas de exportación es importante para la fisiología del bacilo y para la patogénesis de la enfermedad. Dada la estructura de la envoltura de la célula, nuevas proteínas del sistema de exportación pueden ser requeridas para transportar proteínas dentro y a través de esta estructura atípica.

#### **7-3-2. Antígenos proteicos**

Las proteínas de secreción, especialmente las de secreción temprana, juegan un rol importante en la estimulación de la respuesta inmune protectora del huésped. Los antígenos obtenidos en el sobrenadante del cultivo, contienen proteínas de tipo secretorias, citoplasmáticas o provenientes de lisis celular. Un gran número de antígenos proteicos de *M. tuberculosis* se han

identificado usando técnicas inmunoquímicas modernas. Anticuerpos monoclonales han sido producidos contra muchas proteínas secretorias y citoplasmáticas, y se han clonado algunos de esos genes. La mayoría de los péptidos citoplasmáticos y péptidos de la pared celular con peso molecular de 500-10000 kDa son inmunoreactivos, causantes también de la respuesta inmune celular o reacción serológica. Los pequeños péptidos pueden estar asociados con polisacáridos. Un problema encontrado durante la preparación de algunos de los antígenos proteicos es la desnaturalización, que se da en el momento de la purificación.

Otro problema es la presencia de un componente polisacárido en la pared celular. Los antígenos proteicos asociados a la pared celular, pueden estar covalentemente unidos al peptidoglicano. La actividad inmunológica de ribosomas y proteínas ribosomales de micobacterias ha sido determinada por estimulación de la hipersensibilidad retardada, y se ha observado que la respuesta inmune de esos antígenos protegen de la infección.

Las HSP son proteínas que participan en el plegamiento y desplegamiento de las proteínas. Evolutivamente están muy conservadas, hallándose en células animales y vegetales, levaduras y procariotas; por esta razón, se activan tanto en el bacilo ubicado dentro del macrófago, como en el huésped. Dado que los linfocitos T pueden tener reacción cruzada con ellas, pueden destruir las células que las producen, contribuyendo a la generación de la necrosis caseosa y de la licuefacción (173).

### **7-3-3. Antígenos polisacáridos**

Existen en las micobacterias numerosos polisacáridos tales como: arabinogalactano, arabinomanano, manano y glucano. Esos polisacáridos solos o en combinación con péptidos y lípidos son responsables de varias respuestas inmunes. La pared celular de las micobacterias

contienen peptidoglicanos y las preparaciones crudas de peptidoglicanos son inmunológicamente activas. Los arabinogalactanos y arabinomananos, constituyen antígenos específicos determinantes de especies micobacterianas. Los polisacáridos carentes de parte proteica no inducen reacción de hipersensibilidad tipo retardada en piel, pero inducen reacción inmediata de piel y formación de anticuerpos circulantes. Los lipoarabinomananos (LAM) contienen arabinosa, manosa, glicerol y un polifosfato que ha demostrado ser un antígeno inmunodominante en *M. tuberculosis*.

## **8. Diagnóstico**

Del griego *diagnosis*, que significa conocimiento de los signos o señales con que se reconocen las enfermedades. Nos referiremos primero al método “gold estándar”, confirmatorio de micobacterias, que es el aislamiento por medio del cultivo y posterior tipificación de cepa. Luego estudios a nivel inmunológico en el hospedador que nos permiten reconocer la presencia de la enfermedad a través de distintos antígenos micobacterianos empleados en inmunodiagnóstico. Daremos luego una breve reseña de las técnicas moleculares que utilizan como signos los marcadores genéticos presentes en el genoma de la micobacteria y que nos permite identificarlas en forma directa y rápida (Diagnóstico Molecular).

### **8-1. Examen bacteriológico.**

Puede ser por examen directo o por cultivo.

-*Directo*, consiste en realizar un extendido con el material sospechoso para realizar la coloración de Gram y Ziehl-Neelsen (ZN) para ácido alcohol resistentes. El material para realizar este



diagnóstico debe ser tomado de la parte mas joven del tubérculo o sea de la superficie interna de la cápsula, de este modo podrá verse por medio de la coloración de Gram positivo de color azul y por la técnica de Ziehl-Nelsen se verán bacilos delgados ácido alcohol resistentes, de color rosado.

-*Cultivo*, consiste en sembrar el material sospechoso, previamente decontaminado (hidróxido de sodio) y neutralizado (ácido sulfúrico) utilizando el método de Petroff, (OPS-CEPANZO, 1997 <http://www.higiene.edu.uy/Serie2.pdf>). La muestra se siembra en dos tipos de medio: Stonebrink (con el agregado de piruvato) y Löwestein Jensen (con el agregado de glicerol). El primero es específico de *M. bovis* y el segundo es para el crecimiento de micobacterias en general. Se incuba a 37° C por un período máximo de 60 días. Una vez comprobado el desarrollo de colonias ácido-alcohol resistentes, se realizan subcultivos de las mismas en medios de Stonebrink y Löwestein Jensen. Se determinan las características del cultivo y pruebas bioquímicas de identificación: morfología, pigmentación, tiempo de desarrollo, medio de cultivo en el que se desarrollan, desarrollo a temperatura ambiente, pruebas de niacina, reducción de nitrato, catalasa a 68 °C, pirazinamidasa y desarrollo de hidracida del ácido tiofencarboxílico (THC) (230).

Las colonias típicas de *M. tuberculosis* son de color crema, rugosas con aspecto de coliflor y difíciles de desprender del medio; las de *M. avium* son lisas, húmedas y de color blanco grisáceas, las de *M. bovis* son lisas y de color crema.

### **8-2. Examen histopatológico.**

Las muestras obtenidas son fijadas en formol al 10%, y sometidas a un proceso de deshidratación, aclaración e inclusión para la preparación de los cortes histopatológicos, para ser coloreadas con hematoxilina-eosina y por el método de Z-N modificado para tejidos. De la

observación microscópica de los cortes se consideran lesiones compatibles con TBC cuando se observan los siguientes componentes celulares:

1) Células epitelioides también llamados macrófagos modificados (macrófagos acumulados en el foco que han cambiado su aspecto y función), núcleo grande y vesiculoso, citoplasma abundante con aspecto eosinofílico pálido, unión entre las células (por medio de interdigitaciones) que le dan al grupo celular el aspecto de sincitio. La ultraestructura (mayor desarrollo del retículo endoplásmico rugoso, lisosoma y del aparato de Golgi), sugiere que están mejor dotadas, a diferencia de los macrófagos, para la secreción. 2) Las células gigantes de Langhans están compuestas por la fusión de células epitelioides. Son rodeadas de citoplasma eosinófilo, con varios núcleos distribuidos en la periferia en forma de herradura. 3) La aparición de necrosis caseosa, coincide con el desarrollo de hipersensibilidad retardada, frente al agente. Por lo tanto se cree que la hipersensibilidad constituye el mecanismo de la destrucción tisular caseificante de la tuberculosis. El aspecto microscópico es el de una masa homogénea eosinófila clara, sin detalles celulares, que puede encerrar algún resto nuclear. La necrosis caseosa es un rasgo característico de la evolución de la tuberculosis. 4) Forma linfocitaria y en ocasiones la cápsula. En algunas lesiones se observa calcificación.

### **8-3. Aspecto Macroscópico de la TBC.**

El diagnóstico de TBC bovina a partir de una lesión macroscópica, presenta dificultades, ya que su aspecto, tamaño, color, consistencia, distribución, etc., varía en el bovino, dependiendo de la puerta de entrada del bacilo, etapa evolutiva de la lesión (período primario o secundario), edad del animal y la especie de *Mycobacterium bovis*.

Diagnóstico diferencial con otros procesos granulomatosos como actinomicosis, actinobacilosis, granulomas micóticos (coccidioidomicosis), granulomas parasitarios, granulomas a cuerpos extraños (pelos, cristales), incluso carcinomas metastásicos pueden adoptar formas semejantes.

#### **8-4. Estudio de cepa a nivel experimental**

El cobayo es muy sensible a la infección experimental por *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Si se inocula por vía subcutánea, se producen úlceras, lesiones en la pata e infarto del ganglio satélite. Pueden observarse lesiones en los órganos internos para lo cual debe sacrificarse el animal a las 4-6 semanas post-inoculación. En el caso de *M. avium* puede producirse un absceso local y aumento de tamaño de los ganglios satélites, pero no causa enfermedad progresiva.

Antes del sacrificio de los cobayos, se realiza la prueba tuberculínica intradérmica, en la parrilla costal inoculando 0.1 mL conteniendo 50 U.I. de DPP Aviar y Bovino.

#### **8-5. Inmuno ensayos celulares**

Dado que la respuesta inmune a la infección micobacteriana es predominantemente celular (Daniel, 1980), se diseñaron metodologías que *in vivo* e *in vitro* que midieran la respuesta T. También se emplean ensayos serológicos pero, al tener esta baja sensibilidad, se los utiliza como complemento de los ensayos celulares.

##### **8-5-1. *in vivo*: Prueba de la tuberculina o cutánea**

Es la más antigua de las pruebas inmunológicas que aún se continúa utilizando. Robert Koch la describió por primera vez en 1891 y ha sido, desde esa época, el soporte de la inmuno-

diagnóstico de la tuberculosis en humanos y animales. La inyección intradérmica de tuberculina o derivado proteico purificado de tuberculina (DPP) induce, en el individuo infectado, una reacción inflamatoria localizada a causa de una importante infiltración celular en la dermis. Es una respuesta de tipo celular denominada reacción de hipersensibilidad tardía (DTH). También se la conoce en los humanos como reacción de Mantoux. Este método ha sido el “gold standard” para la detección de infecciones nuevas o asintomáticas. Se considera como reactor positivo a todo aquel individuo que presente un incremento en el grosor de la piel a las 72 horas de realizada la tuberculización.

#### ***8-5-1-1. Vieja tuberculina y DPP (231).***

La vieja tuberculina de Koch (1890-1892), fue un extracto crudo de bacilos tuberculosos. Usando esta preparación Koch produjo una lesión exagerada ulcerativa en cobayos sensibilizados con el bacilo tuberculoso. A esto se le llamó el fenómeno de Koch. En 1932, Florence Seibert preparó fracciones químicas de la vieja tuberculina. Esas fracciones fueron derivados proteicos parcialmente purificados, era una mezcla compleja de proteínas y polisacáridos. La heterogeneidad de la preparación contribuyó a la reactividad cruzada y a la no especificidad. Más tarde, Siebert describió fracciones proteicas A, B, C y D, y fracciones de polisacáridos I y II. Las fracciones proteicas contenían algunos polisacáridos. Las proteínas A y B eran efectivas en dar reacción de tuberculina. En 1941 describió la preparación del DPP (derivado proteico purificado) de la vieja tuberculina por precipitación repetida con 50% de sulfato de amonio. Posteriormente fue producida por el crecimiento en medio líquido del bacilo tuberculoso en presencia de glicerol. Separando la bacteria, se reducía 1/10 el volumen líquido por evaporación y se lo pasaba por un filtro estéril. Dado que era una mezcla compleja, existía variación de distintas partidas, una de las

causas era su producción en un medio sintético concentrado por calor (HCSM). El nitrógeno para el crecimiento de la micobacteria estaba dado por la asparagina y resultaba una tuberculina pura, con proteínas del medio de cultivo. Se precipitaba la tuberculina con sulfato de amonio o ácido tricloroacético. Esto fue seguido de un producto más estandarizado y a igual que la tuberculina se describió como derivado proteico purificado (DPP). La tuberculina bovina es producida por *M. bovis* (cepa AN5 o del Valleé) y la tuberculina aviar es producida usando *M. avium* (cepa D4ER o TB56). Para su producción y validar su potencial se miden bajo reglas nacionales e internacionales. El contenido proteico de la tuberculina no predice la actividad biológica, es así que cada partida de tuberculina debe ser testeado en animales y comparado con las referencias estándar. Testeos periódicos de tuberculinas bovinas deberían ser probadas en vacas infectadas naturalmente o artificialmente para validar los ensayos en cobayos (Directiva 80/219/EEC). Aunque la tuberculina está descripta como pura, es una mezcla compleja de proteínas, lípidos, azúcares, incluyendo ácidos nucleicos con una gran variedad de antígenos, algunos de los cuales son comunes a otras especies de micobacterias.

#### **8-5-1-2. Reacción de tuberculina en el bovino**

La reacción de tuberculina en bovinos infectados, es una reacción de hipersensibilidad tipo retardado, con su pico máximo en aproximadamente 72 h, después de la inyección de tuberculina. Esta reacción es mediada por una población de células T sensibilizadas y las mismas son consideradas que tienen componentes específicos y no específicos. Los componentes específicos dependen de la interacción entre células T previamente sensibilizadas expresando el fenotipo CD4, y la presentación de antígenos por macrófagos asociado con moléculas del CMH

de Clase II. Los componentes no específicos son disparados por la liberación de citoquinas, por activación de células T y éstas citoquinas son las responsables del daño tisular como característica de reacción. Estudios histológicos mostraron que la reacción temprana en vacas se caracteriza por la presencia de células mononucleares y neutrófilos, pero que las células mononucleares aparecen de modo progresivo en la reacción.

### **8-5-1-3. Test de tuberculina en uso**

Hay dos tipos de test de tuberculina que se usan hoy, el test simple intradérmico (SIT) usando tuberculina bovina; y el test comparativo tuberculínico intradérmico simple (SICTT) usando tuberculina aviar y tuberculina bovina. El SIT se realiza en la dermis de la tabla cuello en Europa y América. En Australia y Nueva Zelanda se utiliza en el pliegue ano-caudal. La SICTT es usada en Irlanda y en Gran Bretaña como test tamiz, en otros países ayuda a clarificar el estado de las vacas que se vieron con reacción en SIT.

#### **8-5-1-3-1. El simple test intradérmico**

En Argentina se aplica la prueba tuberculínica Ano-Caudal: esta prueba se realiza en el tercio medio del pliegue ano caudal interno, a unos 6 cm. de la base de la cola. Se inyectan 0.1 mL de DPP bovina. Se realiza la lectura del test por palpación en el sitio de inyección a las 72 h (+- 6h) pos inyección.

En la primera prueba, cuando se desconoce si el rebaño está infectado o no, se aplicará el siguiente criterio de clasificación general (Resolución SENASA N° 115/99):

- a) **Positivo**: un engrosamiento de la piel de 5 mm o mayor de 5 mm
- b) **Sospechoso**: un engrosamiento de 3- 5 mm
- e) **Negativo**: menos de 3 mm

En un rodeo pueden presentarse las siguientes situaciones:

En ninguno de los animales del rodeo se observa reacciones mayores de 3 mm. Se considerará al rodeo no infectado.

El profesional comprueba que solamente hay reacciones de 3 mm a 5 mm, se clasificará al rodeo como rodeo sospechoso.

En este último caso se podrá optar por remitir los animales sospechosos a sacrificio y si no se comprobaran lesiones tuberculosas en el examen *pos mortem*, se considerará al rodeo como no-infectado, o se procederá a una segunda prueba anocaudal a los 60-90 días, en todos los animales que acusaron reacción. Para la interpretación se podrá tener los siguientes criterios:

- Si los animales acusaron una pronunciada reducción en el tamaño de la reacción, se los podrá clasificar como negativos, siempre que en el grupo no hubiera ningún animal reaccionante positivo. Si tal fuera el caso, se considerará al rodeo como no-infectado.
- Si los animales presentan el mismo tamaño de la reacción, se mantendrá la clasificación de sospechoso hasta un tercer examen definitivo, pasados los 60-90 días del segundo.
- la tercera prueba será concluyente y todo animal que tuviera una reacción mayor de 3 mm será clasificado como reaccionante y el rodeo como infectado, a menos que los animales sospechosos fueran sacrificados y no se comprueban lesiones tuberculosas.

Cuando en un rodeo se observa animales con reacciones de 5 mm o más, o si existieran antecedentes de infección en el rodeo, se considerará a éste como *infectado* y se aplicará el criterio estricto, clasificando todos los animales con 3 mm o más como positivos, con destino faena.

Se debería retestear usando SICTT (no se realiza en Argentina), a menos de 10 días en áreas donde la prevalencia de la enfermedad es baja.

En la Unión Europea donde se inyecta 0.1mL (2000 Unidades Internacionales) intradérmico en el tercio medio y anterior de la tabla del cuello, la interpretación de reacción se basa en las observaciones clínicas midiendo el incremento de la piel luego de 72 h. Es negativa si la lectura es menor a 2 mm sin signo local. Sospechosa si el tamaño de reacción es entre 2 y 4 mm sin signos clínicos. Es positiva si el tamaño de la reacción es mayor a 4 mm con o sin signos clínicos. En los animales sospechosos, se repite el test no antes de los 42 días y en los positivos se puede realizar el test comparativo luego de 42 días.

Si se realiza el test comparativo, se usa tuberculina aviar (0.1 mL, 2000 Unidades Internacionales) y tuberculina bovina (0.1 mL, 2000 Unidades Internacionales), el sitio de inyección es intradérmica, en la zona del cuello, separadas por 12 cm. El resultado es positivo, cuando la reacción bovina es más de 4 mm que la reacción aviar. Resultado inconcluso cuando la reacción bovina mide entre 1-4 mm más que la reacción aviar. Es negativo cuando la reacción bovina es negativa. En caso de ser inconcluso el resultado se repite luego de los 42 días ([www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg\\_sag\\_biblioteca/bibl\\_sanidad/bibli\\_sananimal/biblio\\_sani\\_manuales/instructivo\\_tecnico\\_1\\_tuberculosis\\_bovina.pdf](http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_sanidad/bibli_sananimal/biblio_sani_manuales/instructivo_tecnico_1_tuberculosis_bovina.pdf)).



### **8-5-1-3-2. Ventajas y desventajas de su aplicación**

Utilizada desde hace más de 100 años, ésta es una prueba sencilla y de bajo costo que mide la respuesta inmune mediada por células. A pesar del amplio uso de esta prueba intradérmica, ella ocasiona muchos problemas. En ciertas circunstancias, la sensibilidad de este ensayo es baja. En un trabajo realizado por Francis et al (1978) se encontró que la sensibilidad del ensayo era moderada (72%). Años después (232) haciendo un estudio semejante, informaron que la sensibilidad era del 65.6%. A pesar de que la especificidad de esta prueba fue del 75.5-98.8%, (233) en algunos rodeos y en particular en algunos países, el problema de los falsos positivos es alto. Esto sucede porque la tuberculina contiene muchos antígenos que se comparten con micobacterias del medio y la sensibilización con estos organismos puede producir una reacción positiva en ausencia de infección tuberculosa.

Las investigaciones en el campo del diagnóstico, se están focalizando en el mejoramiento de esta prueba a través del reemplazo de DPP por nuevos antígenos que no tengan reacción cruzada con las micobacterias del medio. En la tuberculosis humana, varios antígenos recombinantes han sido utilizados para reemplazar DPP en la prueba cutánea, dado que esta prueba tiene un bajo valor diagnóstico en áreas geográficas donde la prevalencia de tuberculosis es baja o en zonas donde las micobacterias no tuberculosas o ambientales son altas. Se utilizaron así antígenos recombinantes MPT64 (234), ESAT-6 en combinación con MPT64, MPT63, MTC28, MPT32, MPT51 y el antígeno de 38kDa solos o mezclados (235). Encontraron que la reactividad de las mezclas con antígenos múltiples era mayor que la de cada antígeno por separado aún cuando se usara la misma cantidad de proteínas en las mezclas que en las proteínas individuales. Además, no tenían reacción cruzada con los animales

control sensibilizados con *M. avium*. Los requerimientos en la prueba cutánea de múltiples antígenos purificados puede deberse a varios factores:

1ero. las formulaciones con multiantígenos pueden presumiblemente reclutar muchas células T específicas de los antígenos en el sitio de inyección y lograrse una respuesta medible.

2do. numerosos antígenos pueden ser necesarios para vencer los problemas referidos a la restricción genética en el reconocimiento antigénico que hace que algunos individuos reaccionen a ciertos antígenos y otros no (236).

#### **8-5-1-3-3. Reacción de falso negativo en la reacción de tuberculina**

Uno de los riesgos, en las campañas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino, es la aparición de falsos negativos. En bovinos con infección tuberculosa, una prueba de tuberculina negativa es el resultado de procesos que interfieren con la respuesta a Th1 tales como: mala nutrición, una terapia con glucocorticoides, la inmunosupresión post-parto y la tuberculosis en sí misma.

Tabla 8- Las potenciales causas de resultados falsos negativos en el test de tuberculina en vacas se pueden observar en la tabla.

<i>Factores relacionados con el test en el animal</i>	Administración repetida del test de tuberculina
	Administración seguida de la infección reciente.*
	Estado de anergia del animal (en la infección generalizada)*
	Coinfección de otras micobacterias ambientales *
	Animales vacunados con <i>M. avium sp. paratuberculosis</i> *
	Infección con virus que deprimen el sistema inmune (Diarrea viral bovina, Virus de la inmunodeficiencia bovina) *
	Drogas (corticoides) *
	Inmunosupresión durante el período posparto *
	Mala nutrición y transporte “stress”.*
	Cepas de <i>M bovis</i> (tipo molecular)*
<i>Factores relacionados al método de administración y lectura del test</i>	Baja dosis de inyección de tuberculina
	Administración subcutánea de tuberculina
	Lugar incorrecto de administración
	Lectura temprana o tardía a las 72 h. ( $\pm 4-6h$ )
	Error de lectura
	Error en la identificación del animal reactor

\* Se aplica también para el test in vitro de IFN- $\gamma$  (244).

#### **8-5-1-3-4. Reacción de falso positivo al test de tuberculina**

Se dan casos de animales reaccionantes al test de tuberculina donde no se observa lesión. En algunos países donde se dan infecciones con *M.a.* subsp. *paratuberculosis* y se vacuna contra la infección se dan grandes dificultades en interpretar la reacción, se puede hacer uso a la prueba comparativa.

*M. avium* se ha encontrado en vacas, con lesiones no expansivas en los nódulos linfáticos mesentéricos (237). La sensibilidad está asociada con la exposición a infecciones de pájaros o la exposición a cerdos infectados con el complex *M. avium*.

La sensibilidad del test de la tuberculina para una dosis de 0,3 mg es de 63,2-72% (233, 232). La baja sensibilidad del test puede ser un factor que contribuya a la falla en algunos países para erradicar la enfermedad. Por esta razón es la necesidad del desarrollo y evaluación de nuevos antígenos específicos de *M. bovis* para aumentar la sensibilidad y especificidad del test.

#### **8-5-2. *In vitro***

##### **8-5-2-1. Linfoproliferación o *lymphocyte transformation assay* (LTA)**

Específicamente cuantifica la transformación y proliferación de linfocitos T previamente sensibilizados al enfrentarse con antígenos micobacterianos, habitualmente DPP. Este tipo de ensayo es casi siempre impracticable para evaluar un gran número de animales debido a que su completa ejecución se compone de muchos pasos los cuales no pueden ser interrumpidos o postergados. Insume mucho tiempo y los períodos de incubación son largos (de tres a cuatro

días). Se le suma a ello que es costoso por la necesidad de tener equipos especiales para el manejo de radioisótopos y por la utilización de material estéril. Es un buen método para laboratorios de investigación pero su uso es improbable en laboratorios cuya finalidad sea el diagnóstico.

Este método no sólo se utiliza con DPP sino también con proteínas recombinantes o fracciones proteicas obtenidas de cultivos de *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Se comparan así los índices de estimulación de dichas fracciones con respecto al de DPP. Es una manera de evaluar la capacidad antigénica de las proteínas recombinantes y seleccionar aquellas fracciones que tengan índices de estimulación igual o mayor que el de DPP para luego poder aislar las proteínas componentes de esas fracciones por electroforesis de una o dos dimensiones.

#### **8-5-2-2. Dosaje de interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

Este ensayo fue descrito para tuberculosis bovina por (238). Se desarrolló como una prueba diagnóstica celular *in vitro* alternativa a la prueba de linfoproliferación o transformación linfocitaria. En lugar de medirse la linfoproliferación, se cuantificó la liberación de el gamma interferón (IFN- $\gamma$ ) por parte de los linfocitos sensibilizados tras su estimulación con antígenos de *M. bovis* (PPD bovina).

Su fundamento es la estimulación de los linfocitos sensibilizados para que se libere IFN- $\gamma$ , este paso se realiza en sangre heparinizada fresca, y posterior cuantificación del IFN- $\gamma$  en el plasma mediante un ELISA-Sandwich. Esta prueba mostró una buena correlación con los resultados obtenidos con el ensayo de linfoproliferación (238). Sin embargo, esa primera

propuesta, si bien efectivamente medía la actividad de la inmunidad mediada por células, era impracticable cuando se tenía gran número de bovinos y los resultados tardaban en obtenerse por lo menos, 4 días. Además, no era específica para IFN- $\gamma$  porque detectaba también  $\alpha$  y  $\beta$  interferón. El ganado utilizado como control libera también IFN- $\alpha$  en respuesta a algunos antígenos no-micobacterianos (239). Para el mejoramiento del ensayo se produjeron anticuerpos monoclonales específicos de IFN- $\gamma$  bovino y desarrolló un inmunoensayo sandwich (EIA) para IFN- $\gamma$ . El EIA detecta menos de 25pg/mL de IFN- $\gamma$  bovino recombinante y es específico del IFN- $\gamma$  bovino biológicamente activo, no detecta IFN- $\alpha$  ni IFN- $\beta$  o IFN- $\gamma$  bovino natural inactivado. Se ha comprobado que este monoclonal presenta reacción cruzada con IFN- $\gamma$  de cabra, de oveja y de búfalo pero no con IFN- $\gamma$  de otras especies como el ciervo, el cerdo o el humano. Es un método sencillo, rápido y sensible para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en el ganado (240).

En un ensayo a campo en Australia, que involucró más de 12.000 bovinos, se comparó el ensayo de interferón con la prueba cutánea. La especificidad obtenida sobre 6000 bovinos pertenecientes a rodeos libres de tuberculosis fue del 96,2 al 98,1% dependiendo del punto de corte elegido. La sensibilidad obtenida en los otros 6.000 animales reactivos fue del 77 al 96% dependiendo del criterio para definir un reactor positivo. Estos valores mostraron ser significativamente más altos que los obtenidos para la intradermoreacción (232). No existe correlación en humanos entre la técnica de la tuberculina y la de IFN- $\gamma$ . A este respecto, se hizo recientemente una comparación sobre ambas técnicas (241). Utilizaron como antígeno DPP y cuatro subfracciones de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. No encontraron correlación entre los valores de IFN- $\gamma$  y la induración producida en la prueba cutánea. El estudio se hizo

sobre 20 individuos sanos con reacción DPP positiva y 20 individuos controles con reacción DPP negativa. Si bien las distintas subfracciones son eficientes en estimular la producción de IFN- $\gamma$  del cultivo de sangre entera, ninguno de estos valores fue mejor que el obtenido con el DPP suplido en el kit de IFN- $\gamma$ . Existe una variabilidad natural en la respuesta del cultivo de sangre entera del huésped debido a las diferentes condiciones del ensayo (tiempo transcurrido de la toma de la muestra, tiempo de incubación) que resultan en diferencias cuantitativas en la medición del mismo mediador inmunológico (242).

Esta técnica tiene ventajas muy importantes con respecto a la prueba cutánea: 1) no compromete el sistema inmune del animal porque no hay inyección de antígeno, por lo tanto, se puede repetir inmediatamente la prueba en los casos que arrojen resultados sospechosos. Se ha visto que la tuberculización provoca una reducción en los niveles de IFN- $\gamma$  en los 7 días posteriores y después, un aumento gradual de los mismos hasta los 60 días. 2) se utiliza DPP aviar como estimulante para diferenciar MAC de infección tuberculosa. 3) se obtienen los resultados entre las 24 y 48 horas. 4) se movilizan los animales una sola vez. 5) se obtienen resultados objetivos y se pueden repetir. Además, al igual que la prueba cutánea, se puede aplicar a gran cantidad de animales. La aplicación de esta prueba no es válida en sangre de animales estresados o recién sacrificados.

Las desventajas de la misma son: el costo y el tiempo de estimulación de la sangre luego de extraída, debe ser menor a 12 h.

Adicionalmente, un problema a resolver es poder vacunar al ganado y tener una prueba diagnóstica que diferencie vacunado de infectado. En Gran Bretaña, Vordermeier y colaboradores desarrollaron un diagnóstico diferencial en 1999. Utilizaron como vacuna viva a BCG Pasteur y como antígenos recombinantes eligieron a: ESAT-6, MBB64, MPB70 y MPB83. Estos antígenos se expresan en *M. bovis* pero no se expresan o se expresan a bajo nivel, en *M. bovis* BCG Pasteur. También prepararon péptidos sintéticos de epitopes de estos antígenos recombinantes. Ellos detectaron más del 70% de los reactores con un pool de siete péptidos. Las pruebas utilizadas fueron LTA y IFN- $\gamma$ . La sensibilidad del IFN- $\gamma$  fue baja comparada con la de LTA. (55% y 68.6%). Ellos predicen que el agregado de más antígenos a la mezcla aumentaría la sensibilidad sin comprometer la especificidad (243). Por otro lado, Johnson et al (1999) evaluaron dos antígenos recombinantes: MPT64 y ESAT-6 en una población de estudiantes antes y después de ser vacunados con *M bovis* BCG y con pacientes tuberculosos. Los resultados obtenidos permitieron diferenciar los infectados con tuberculosis de los controles con una alta especificidad y sensibilidad. Se necesitará más investigación al respecto.

Se ha evaluado el test de IFN- $\gamma$  (Bovigam<sup>R</sup>) de estudios realizados en Australia, Brasil, Etiopia, Gran Bretaña, Irlanda, Italia, Nueva Zelanda, Norte y República de Irlanda, España y en EEUU, con resultados de sensibilidad de 87,6% (73%-100%) y especificidad del 96,6% (85%-99,6%) (244).



## 8-6. Ensayos humorales

La respuesta humoral en tuberculosis ha sido estudiada durante varias décadas con la finalidad de desarrollar ensayos serológicos. La primera descripción de un diagnóstico serológico en tuberculosis fue el test de aglutinación, luego se incorporó la prueba de fijación de complemento y más tarde el ensayo de hemoaglutinación. Thorns y colaboradores (1982) encontraron que todos ellos carecían de valor para el diagnóstico de la tuberculosis. Se observó que existía una correlación entre el título de anticuerpos y la severidad de la infección (245).

### 8-6-1. ELISA

El desarrollo del ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) permitió evaluar los anticuerpos séricos en forma sencilla y rápida. Este sistema es económico y de fácil automatización. Se estandarizaron así métodos de ELISA indirectos para la determinación de anticuerpos dirigidos contra el bacilo.

Se han probado diversos antígenos buscando aquéllos que ofrecieran mejores índices de sensibilidad y especificidad. Se utilizaron primero antígenos no purificados de *M. bovis*, (extractos sónicos) obteniéndose valores de especificidad bajos (52.6%) y de sensibilidad muy variables dependiendo del grupo de animales estudiados (246). Estos resultados no fueron alentadores. La DPP bovina es un antígeno ampliamente ensayado para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado. Hanna y colaboradores (1989) compararon el uso de DPP con

extractos fosfatídicos de *M. bovis* como antígenos utilizado en un ELISA, en 5 bovinos experimentalmente infectados por vía intranasal con  $10^6$  de organismos vivos de una cepa salvaje de *M. bovis*. Catorce días después de la infección, los niveles de anticuerpos de todos los animales llegaban a valores muy altos cuando se utilizaba como antígeno el extracto de fosfatídico, sin embargo usando DPP en uno solo de los cinco animales se detectó respuesta humoral. (247). En una publicación posterior sobre el mismo experimento, estos autores señalaron el desarrollo de respuesta anamnésica al test (248). En la Argentina, el uso de DPP como antígeno en las pruebas de ELISA fue evaluado por Ritacco y colaboradores (249, 250, 251, 252). Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron bastante dispares, posiblemente por la variabilidad en las poblaciones escogidas o bien, debido a una tuberculización previa. Encontraron, al igual que Lepper y colaboradores (1973), una correlación entre el nivel de anticuerpos y el grado de extensión de las lesiones tuberculosas. Se determinó un grado de sensibilidad baja en animales con lesiones localizadas y máxima entre aquéllos con lesiones diseminadas. Si bien los animales infectados fueron altamente reactivos para este test, muchos de ellos (40%) dieron reacción negativa. Esto último cuestiona severamente el uso de esta metodología como sistema único de diagnóstico. En cambio, puede ser apropiada como prueba rápida para la identificación de rodeos infectados o como prueba complementaria a la de DTH.

Estudios basados en la preparación de antígenos crudos, revelaron que individuos sanos poseían anticuerpos producidos por exposición a bacterias comensales, ambientales y vacunación que tenían reacción cruzada con algunos antígenos de *M. tuberculosis* (268, 254, 255, 256). Esto determinó que se comenzaran a desarrollar ELISAs con antígenos mejor definidos tales como proteínas individuales purificadas por procedimientos cromatográficos.

Fifís y colaboradores trabajaron con un total de 12 antígenos de *M. bovis* los cuales fueron enfrentados a tres grupos de animales: infectados con *M. bovis*, no infectados provenientes de rodeos infectados e infectados con microorganismos relacionados. Las proteínas MPB70 y la del choque térmico de 65kDa (hsp65) fueron las más reactivas y el antígeno MPB64 fue bastante sensible pero poco específico (149).

En un trabajo con bovinos experimentalmente infectados se estudió el patrón de producción de anticuerpos anti-MPB70. La cinética comenzó con valores negativos en los sueros, seguido de un marcado incremento a las 18-20 semanas de la infección. A partir de los resultados obtenidos en animales natural y experimentalmente infectados, los autores propusieron el uso de esta proteína como indicador de infección con *M. bovis*. Demostraron también que una tuberculinización previa, incrementaba el título de anticuerpos anti-MPB70. Sin embargo, los valores de sensibilidad eran demasiado bajos para proveer una importante información diagnóstica (257). Luego, desarrollaron esta técnica usando proteína G biotinilada. La proteína G, se une a las IgG de una amplia variedad de especies animales con una gran afinidad permitiendo sustituir a las antiglobulinas específicas al emplearse en la técnica de ELISA. Su aplicación facilita el procedimiento cuando se utilizan conjuntamente diferentes especies animales y cuando se analizan especies exóticas o salvajes de las que no se comercializan antiglobulinas.

Se investigó la respuesta a anticuerpos en ganado experimentalmente infectado con tres proteínas recombinantes micobacterianas: MPB70, MPB64 y MPB59 expresadas en *E. coli* (215). Estas proteínas son consideradas inmunodominantes (258, 259). Los resultados mostraron una clara respuesta humoral dominante dirigida hacia el MPB70 y un incremento significativo de la misma luego de la tuberculinización. Obtuvieron una baja respuesta con los

otros dos antígenos. A pesar de que los resultados indican un significativo potencial para determinar el estado de enfermedad del ganado infectado, se debe recopilar más información sobre la sensibilidad y especificidad del uso de este antígeno en el test de ELISA.

### **8-6-2. MAPIA**

Es un inmunoensayo donde múltiples antígenos están impresos en una fase sólida. Su nombre en inglés es *multiple-antigen print Immunoassay*. Se aplican los antígenos individualmente a una membrana de nitrocelulosa a través de micro aerosoles, seguido por la detección de anticuerpos usando el desarrollo inmunocromogénico estándar. Las mezclas de proteínas antigénicas de *M. tuberculosis* en MAPIA retienen la actividad serológica de cada uno de los componentes en contraste con lo que sucede en los ELISA, mezclas en que la actividad serológica es menor que la suma de las actividades de cada componente. Se compararon ambas técnicas con los mismos antígenos y la sensibilidad fue superior en MAPIA que en ELISA (260). Utilizan en este trabajo 12 proteínas de *M. tuberculosis*, las que previamente mostraron generar respuesta a anticuerpos durante la tuberculosis (260), con sueros de 75 pacientes tuberculosos y 67 de individuos sanos como controles negativos. Cincuenta y ocho sueros de los pacientes tuberculosos (77%) reaccionaban por lo menos con un antígeno en el panel. Esta metodología requiere un análisis de no sólo un mayor número de antígenos sino también de un número mayor de sueros que los usados en este trabajo. Por otro lado, debemos considerar que la capacidad de unión de las proteínas a una fase sólida es mayor en la nitrocelulosa que en el poliestireno. Esto explicaría la mayor sensibilidad de este ensayo con respecto al ELISA. Los resultados pueden ser evaluados visualmente o en forma semicuantitativa por escaneo y densitometría (261). Es un test de bajo costo y de tecnología

muy simple. Se lo podría adaptar con antígenos recombinantes como prueba complementaria al diagnóstico de tuberculosis bovina en los laboratorios de veterinaria. Además, se podría quizá correlacionar el grado de avance de la enfermedad con la reactividad hacia uno o más antígenos.

### **8-6-3. Immunocromatografía**

El fundamento es semejante al del MAPIA pero se evalúa un antígeno o un suero individualmente. El test se realiza en tiras. Cada tira o plantilla contiene una almohadilla para la muestra, una almohadilla para los reactivos, una membrana de nitrocelulosa y una almohadilla absorbente. Los anticuerpos están inmovilizados, por ejemplo MPB64, en la membrana de nitrocelulosa como reactivos de captura en dos zonas: una es la de control y la otra es la de reacción. El segundo anticuerpo reconoce otro epítipo del antígeno y está conjugado con partículas de oro coloidal. Se aplica la muestra en la almohadilla que le corresponde y comienza a correr lateralmente. El anti MPB64 conjugado se une al antígeno MPB64 que está en la muestra. El complejo así formado continúa corriendo y se une al anticuerpo monoclonal que se encuentra en la fase sólida produciendo una delgada línea roja. El líquido continúa migrando a lo largo de la membrana y produce una línea roja en la zona control demostrando que los reactivos funcionan correctamente (262).

También está descrito con un antígeno inmovilizado en la tira y este ensayo permite diagnosticar tuberculosis detectando los anticuerpos contra un antígeno específico de *M. tuberculosis*. Fue realizado por (263) con el antígeno de 38kDa. Sobre esta tira, en la que se ha inmovilizado el antígeno, se aplica el suero del paciente. Éste fluye pasando la línea donde está el antígeno. Si en el suero existen anticuerpos hacia este antígeno, éste se une a la línea.

La unión antígeno-anticuerpo se detecta utilizando como segundo anticuerpo un suero de cabra anti IgG humana conjugado con partículas de oro coloidal. Esta reacción da una línea rosa cuando se une al anticuerpo humano. El proceso se completa en 15 minutos y no requiere ningún equipamiento adicional. El test parece ser altamente específico para diagnosticar tuberculosis activa. Ni los individuos vacunados con BCG, ni los que tienen una infección latente, ni las micobacterias atípicas dan resultados positivos. Si bien la especificidad es alta (100%) la sensibilidad es baja (50%) (264). Recientemente, Reddy y colaboradores desarrollaron un kit inmunocromatográfico con varios antígenos (38, 63, 64, 14 y 59 kDa) de *M. tuberculosis*. Evaluaron el potencial diagnóstico de este kit utilizando como muestras los sueros de pacientes TB positivos y TB negativos de varios hospitales de la India. Los resultados demostraron que la combinación de los antígenos mejoraba la sensibilidad y la especificidad de la prueba. La especificidad del ensayo fue del 99,42% con una sensibilidad del 98,52% (n= 241). En el caso de múltiples infecciones la especificidad fue del 93,15% con una baja sensibilidad del 73,52% (n=140).

Por lo tanto, considerando la alta especificidad de este test, podría ser conveniente que sea utilizado como primera línea de prueba en casos sospechosos pertenecientes a países de bajos recursos donde el acceso a pruebas diagnósticas es limitado.

#### **8-7. Breve reseña del diagnóstico directo (aplicación en veterinaria)**

El diagnóstico de tuberculosis en América Latina generalmente está limitado al examen directo, debido a eso hay muy escasa información epidemiológica del impacto de esta zoonosis en la Salud Pública. Para contar con datos precisos de la ocurrencia de *M. bovis* en la tuberculosis humana se necesitan metodologías sencillas y rápidas que permitan diferenciar *M. bovis* del resto

de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Se cuenta con el cultivo diferencial que es muy importante para identificar y clasificar las micobacterias de crecimiento lento. El inconveniente en su aplicación reside en los largos tiempos de espera para obtener resultados. Los métodos de cultivo rápido mencionados anteriormente (pag. 16), son BACTEC-460 y BACTEC MGIT 960, tienen como desventaja la contaminación, ya que esta compuesto por un medio de cultivo líquido enriquecido y como se mencionó anteriormente el alto costo.

Actualmente se están utilizando técnicas moleculares tales como PCR para obtener una identificación rápida del bacilo. Esta técnica es muy útil a nivel de investigación pero para ser aplicada en diagnóstico tiene que evitar las contaminaciones de los “amplicones” (regiones de ADN amplificadas en los sucesivos usos de esta técnica acumuladas en el medio que interfieren los resultados de las siguientes pruebas). Se han propuesto métodos moleculares utilizando oligonucleótidos iniciadores que amplifican regiones exclusivas del genoma de *M. tuberculosis* o de *M. bovis* utilizando PCR (265, 266, 267, 268 269)

## **8-8. Diagnóstico y tipificación por técnicas moleculares**

### **8-8-1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Esta técnica de PCR consiste en la amplificación de un segmento de ADN (mediante una replicación enzimática “in vitro”), situado entre dos regiones de secuencia conocida, a través de una serie repetitiva de ciclos que involucran la desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN, obteniéndose un incremento exponencial en el número de copias de ADN en cada ciclo. El producto mayoritario de esta reacción exponencial, es un segmento de ADN de doble cadena, en cuyos extremos 5' tienen incorporados la secuencia de los iniciadores. Mediante esta técnica puede lograrse un diagnóstico rápido, con altos valores de sensibilidad y especificidad (270). La

reacción se lleva a cabo en un termociclador, en una serie de ciclos repetitivos, donde cada uno está compuesto por tres etapas:

- A) Desnaturalización: El ADN templado es desnaturalizado (separación de las 2 cadenas) por calentamiento, aproximadamente a 94-96 °C, para que el DNA quede en simple cadena.
- B) Hibridización: la mezcla de reacción es enfriada a una temperatura que permite la hibridación por complementariedad de oligonucleótidos iniciadores (primers), a las hebras opuestas de DNA blanco, flanqueando y delimitando así la región de particular interés (271).
- C) Esta temperatura es inherente a la composición de bases nucleotídicas de los iniciadores. Este paso es considerado como crítico y limitante de la reacción.
- D) Extensión: la enzima ADN polimerasa, incorpora nucleótidos en forma sucesiva al extremo 3' libre de los iniciadores, respetando cada uno la complementariedad de la cadena blanco. De esta manera, la nueva cadena se va sintetizando en dirección 5'→3'. La temperatura óptima para la actividad de esta enzima termorresistente, es de 72 °C.

El paso siguiente consiste en la separación (por aumento de la temperatura) de las nuevas cadenas sintetizadas, iniciándose de esta manera un nuevo ciclo de amplificación. Como los productos de un ciclo de amplificación pueden actuar como templado para el próximo ciclo, se logra un incremento exponencial de un número de secuencias blanco en cada ciclo (272). En condiciones normales la reacción se detiene luego de 25-30 ciclos de amplificación debido a que la enzima pierde actividad en los sucesivos ciclos y también existe una inhibición por producto final, ya que en cada secuencia blanco se obtiene aproximadamente un millón de copias.

Las secuencias de ADN amplificadas son separadas por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa e identificadas mediante la comparación con un patrón de peso



molecular conocido. La detección de dichos productos se logra mediante la tinción con bromuro de etidio, y la observación directa del gel ante una fuente de luz ultravioleta (UV). Este colorante se fija a la estructura de la doble cadena de ADN, y por exposición a la luz UV se excita, generando una fluorescencia rosada característica.

Los controles que deben tenerse en cuenta para la realización de la técnica son:

- a) Control negativo de reactivos de PCR.
- b) Control negativo de extracción de ADN, procesarse junto con las muestras clínicas, en un tubo conteniendo todos los reactivos de PCR utilizados durante la extracción de ADN.
- c) Control positivo de extracción de DNA
- d) Control positivo de PCR
- e) Control de inhibición de la polimerasa, en un tubo con todos los reactivos de la mezcla de reacción de PCR, se le agregó el ADN extraído de la muestra, se le agrega ADN de una muestra positiva en concentración subóptima.

Las dos secuencias blanco más ampliamente utilizadas en la detección de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* son IS6110 y IS1081. (179, 268). En el genoma de *M. bovis*, en la mayoría de los aislamientos de Argentina, la primera se encuentra como única copia, mientras que la segunda está presente en múltiples copias. El tipo de material para hacer la extracción del ADN es muy variado, se ha descrito la extracción de ADN a partir de hisopado nasal, leche y tejidos (273).

Con una modificación en el ciclado se logra un incremento en la sensibilidad de hasta dos órdenes, con respecto al programa convencional, para la secuencia IS6110 y en un orden para IS1081. El empleo de programas de ciclado del tipo *Touch-Down*, con el cual el ciclado

comienza con una temperatura de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores aproximadamente de 10°C por encima de la óptima, y durante los sucesivos ciclos va disminuyendo a razón de 1°C/ciclo hasta alcanzar la temperatura óptima, con la cual se completa el resto del ciclado.

Las *ventajas* de la PCR son: que es una técnica rápida, sensible y específica.

Las *desventajas* son:

- alto riesgo de contaminación, dando falsos positivos
- Sustancias que inhiban la actividad de la *taq* polimerasa
- La falta de estandarización de los protocolos en cada laboratorio, dando bajos resultados de reproducibilidad.

Datos estudiados por Vitale et al. (1998) con muestras de hisopados nasales bovinos obtuvieron una especificidad del 100% y sensibilidad del 58%. Romero et al. (1999) analizaron 271 muestras de mucosa nasal de bovinos tomando como referencia la prueba intradérmica, la sensibilidad de PCR fue de 11.4%, y la especificidad fue del 94.5%.

## 9. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

### 9-1. Introducción

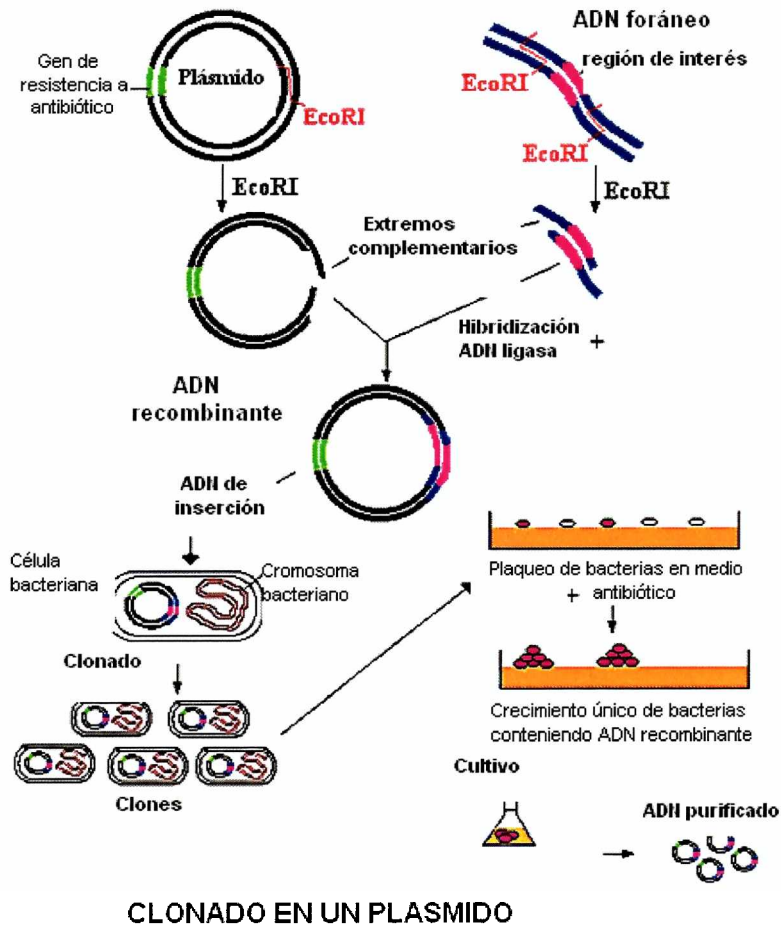
El sistema de expresión de proteínas recombinantes más conocido y utilizado, se basa en la utilización de cepas de *E. coli* para la expresión heteróloga de proteínas. Esta bacteria Gram negativa ofrece numerosas ventajas, dentro de las cuales podemos destacar su corto tiempo de replicación, bajo costo de medios de cultivo y un amplio conocimiento disponible de la fisiología bacteriana, en conjunto con una amplia gama de técnicas de manipulación genética. Una desventaja importante es la carencia de organelas, proteínas y enzimas que permiten modificaciones postraduccionales necesarias para generar proteínas eucarióticas funcionales.

El modelo de expresión de una proteína debe escogerse en base a las características de esta y en base a las aplicaciones que se le quieran dar.

El procedimiento básico para clonar y expresar un gen foráneo en bacterias, consiste en la introducción del gen de interés en vectores que posean un fuerte promotor bacteriano.

**9-2. Clonado en un vector plasmídico:** un fragmento de ADN que contiene el gen de interés se inserta dentro de la secuencia de un vector plasmídico, mediante digestión con enzimas de restricción (tanto el inserto como el plásmido) y posterior ligado molecular con la enzima T4-ADN ligasa. Se transforman bacterias *E. coli* con este vector recombinante y se seleccionan aquellas que incorporan el plásmido por la habilidad de multiplicarse en presencia del antibiótico que actúa como agente de selección (varía con cada vector). Al multiplicar la bacteria

transformada, también replica el vector recombinante obteniéndose así un gran número de copias del fragmento (ver fig. 8).



**Figura 8.** Luego de la transformación del cultivo bacteriano con el ADN recombinante, se plaquea en presencia de antibióticos. Solo crecen las células que contienen el ADN recombinante. ([www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo13.htm](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo13.htm))

**9-3. Expresión de genes mediante promotores inducibles:** Un plásmido de expresión debe tener determinados elementos genéticos siguiendo el orden 5'-3': un promotor eficiente, dotado de

regiones conservadas -35 (TTGACA o parecida) y -10 (TATAAT o parecida). A corta distancia del promotor, una región que al transcribirse suministre el sitio de entrada al ribosoma: la denominada secuencia de Shine-Dalgarno, que es complementaria del extremo 3' del ARNr 16s. A unos 3-11 pb río abajo de Shine-Dalgarno, debería situarse el codón ATG que señala el comienzo de la traducción de ARNm. Este codón lo puede suministrar el gen a clonar, o bien el vector puede disponer de ese codón, seguido de alguna diana que permita la inserción del gen a expresar. Finalmente, en el extremo 3', una secuencia que funcione como terminador de la transcripción (que en su forma de ARN constituye la típica horquilla por emparejamiento intracaternario, donde el ARN polimerasa se desliga del ARN recién formado). Agregado a todos esos elementos que tienen un impacto directo sobre la eficiencia de la expresión del gen, los vectores contienen un gen que confiere resistencia a antibióticos en el huésped, ayudando a la selección del plásmido y propagación (generalmente se utiliza Ampicilina para este propósito), y tienen varios sitios de corte para un número de enzimas de restricción, para facilitar el clonado. El número de copias de plásmidos se determina por el origen de replicación. La cantidad de síntesis de proteína final depende de la dosis de genes, largo del promotor, estabilidad del ARNm y la eficiencia en la iniciación de la traslación.

Como estrategias usadas en la manipulación de la expresión genética en *E. coli* se debe tener en cuenta:

**9-3-1. Promotores regulable:** una estrategia habitual consiste en cultivar la bacteria recombinante hasta lograr grandes densidades, momento en que se suministra la señal para que el promotor se active y transcriba el gen insertado. Estos promotores fuertes bajo ciertas condiciones están

reprimidos por las correspondientes proteínas represoras, lo que suministra la base para inducir o liberar el gen adyacente a voluntad (274).

*Como ejemplo de promotores regulables se pueden citar:*

*Derivados del promotor lac*

El promotor del operón de la lactosa (*lac*) ha servido para diseñar elementos de control de expresión en numerosos vectores. Mientras en el medio no exista lactosa (o un inductor apropiado), el promotor está reprimido por el represor (producto del gen *lacI*). En el laboratorio, la inducción se logra añadiendo al medio un inductor gratuito (que a diferencia de la lactosa, no se metaboliza, pero se une al represor inactivándolo), un ejemplo es el IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido). En los vectores de expresión se suele emplear un promotor *lac* mutante, conocido como *lacUV5* (con una sustitución en la región -10), que es más potente que el promotor silvestre. Esta variante es reprimible por *LacI* e inducible por IPTG.

*Derivados del promotor trp*

El operón *trp* contiene los genes estructurales que determinan las enzimas para la síntesis del triptofano. Su promotor se ve reprimido en presencia del triptofano del medio, por el complejo represor-triptofano. Si no hay triptofano disponible, el represor queda inactivo, y el operón *trp* se transcribe. En los vectores con promotor *trp*, la expresión se logra en medio sin triptofano, mientras que se reprime en presencia del aminoácido, o añadiendo el compuesto ácido 3-indol-acrílico.

### *Promotor híbrido artificial tac*

Este es un promotor artificial combinado de la región -35 del promotor *trp* y la -10 del promotor *lac*. Resulta ser 5 veces más potente que el de *trp* y 10 veces más que el de *lac*. Es inducible por IPTG y reprimible por glucosa. Se llegan a alcanzar niveles de proteína recombinante del 10 -30% de la total.

### *Promotor del fago T7.*

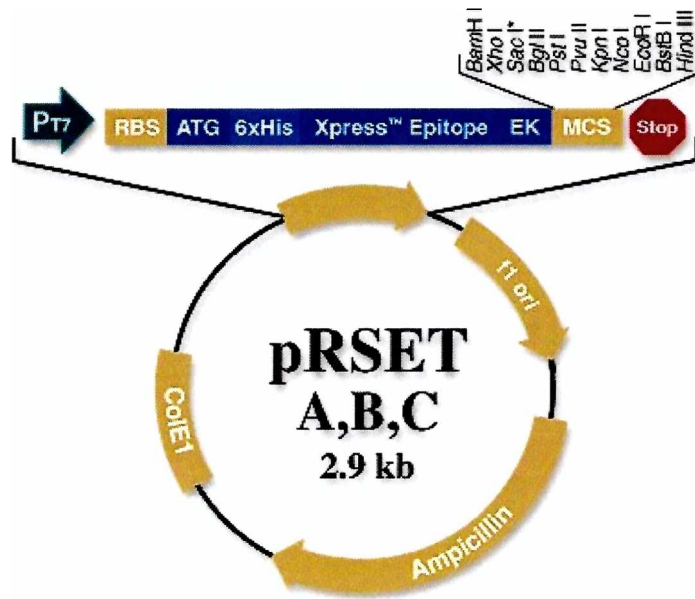
El promotor del fago T7 necesita la ARN polimerasa específica del mismo fago, por lo que si queremos expresar genes bajo ese promotor, hay que clonar simultáneamente el gen de la polimerasa de T7.

Normalmente este gen de la polimerasa se inserta en el cosomo de *E. coli* o en el profago 1 (la versión insertada del cromosoma 1 en las células lisogénicas) y bajo el control del promotor de *lac*. Posteriormente se procede a transformar las células con el vector de expresión que posee el gen de interés río abajo del promotor del T7. Cuando se añade el inductor IPTG, se induce el gen de la polimerasa de T7, enzima que transcribe el gen que hemos clonado.

**9-4. Regulación de la expresión del gen.** El ARNm es traducido por los ribosomas de la célula y sintetizan una proteína recombinante.

El vector pRSET es un derivado de los vectores pUC, fue diseñado para obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante y facilitar la purificación de la proteína de interés, ya que se expresa fusionada a un hexapéptido de His. La expresión de la proteína recombinante en este vector, está regulada por el promotor T7, por lo que se necesita trabajar con cepas de *E. coli* que expresen la ARN polimerasa T7. A continuación se muestra el mapa de pRSET A, B, y C (fig. 9).

Los vectores son clasificados por los sitios de corte para las diferentes enzimas de restricción (275).



**Fig. 9-** Vector *pRSET A, B y C*. (Catalog no. V351-20 Invitrogen)

El gen de interés se inserta río abajo del promotor a modo de crear una fusión N-terminal entre la secuencia que posee el triplete ATG, un motivo de polihistidinas que facilita la purificación de la proteína recombinante y la secuencia de corte para una enteroquinasa.

Luego de la sobreexpresión, le sigue la purificación de la proteína recombinante empleando resinas de afinidad que consisten en átomos  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$  unido por un brazo químico a Sepharosa. El motivo 6x His de la proteína recombinante tiene afinidad por los átomos de  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ , por lo que quedará retenida en la columna mientras que el resto de las proteínas celulares saldrán de la columna en el percolado. Finalmente para eluir la proteína recombinante se puede realizar



competición por el metal, mediante el agregado de imidazol o utilizar la enzima enteroquinasa, cuyo sitio de corte se localiza entre el polipéptido de interés y el motivo de unión al metal.

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3), provee de altos niveles de expresión de la proteína y son células fácilmente inducibles por IPTG. Lleva el bacteriófago lisógeno  $\lambda$  DE3, este lisógeno  $\lambda$  contiene el gen *lacI* y el gen de la ARN polimerasa T7 bajo control del promotor *lac*, dirigiendo la expresión de la misma. Si se agrega IPTG se induce la expresión de ARN polimerasa T7. Las células BL21 (DE3) pLysS son células que sirven para controlar la expresión de proteínas que pueden resultar tóxicas. Si el producto de un gen resulta ser tóxico, al ser clonado río abajo del promotor T7, la expresión basal de este gen puede hacer bajar el crecimiento, matar las células, o desestabilizar el plásmido. La lisozima T7 (producida por la cepa pLysS) se liga a la polimerasa T7 y disminuye la transcripción permitiendo controlar una posible toxicidad.

Las colonias bacterianas transformadas expresan proteínas recombinantes en diferentes niveles. Las condiciones de crecimiento y expresión óptimas para la proteína de interés deberían establecerse en cultivos en pequeña escala, antes de ser producida a gran escala para ser purificada. Hay que monitorear si la expresión de la proteína es tóxica en el crecimiento de las células, antes y después de la inducción. Si el crecimiento de las células expresando la proteína es muy lento, puede sugerir que el gen sea tóxico para *E. coli*.

#### **9-5. Purificación de proteínas con el sistema pET de unión a histidina (HIS-tag)**

Se puede designar un protocolo de purificación basado en afinidad, donde la proteína nunca interactúa directamente con una matriz cromatográfica. El sistema de purificación de proteínas más utilizado es el de unión de 6 histidinas a una resina de afinidad con iones metálicos. Algunos vectores llevan la secuencia de unión a 6 histidinas consecutivas, expresados en el extremo-N o

en el extremo-C de la proteína en estudio. La secuencia HIS-tag se une a los cationes divalentes (Ej.,  $\text{Ni}^{2+}$ ) inmovilizados en la resina quelante metálica. La resina es lavada, y las proteínas son eluidas por el agregado de imidazol (un análogo de histidinas). Las columnas pueden ser regeneradas y rehusadas.

Si la proteína soluble es degradada, una reducción en la temperatura de crecimiento posterior a la inducción, puede solucionar el problema. La temperatura de crecimiento afecta la expresión y a los niveles solubles de las proteínas. Las proteínas recombinantes en *E. coli* pueden ser producidas en forma soluble, pero en algunos casos, especialmente en los que se obtienen altos niveles de expresión hay agregados y forman cuerpos de inclusión insoluble. Si las proteínas recombinantes forman cuerpos de inclusión insolubles pueden ser fácilmente solubilizados con agentes desnaturizantes como 6M-8M de urea, o con diferentes detergentes e igualmente pueden ser purificadas en matrices de Ni-NTA (níquel/agarosa).

Para la reducción de uniones no específicas (contaminantes en condiciones nativas o desnaturizantes) se utiliza bajas concentraciones de Imidazol (10mM) en la lisis y en el buffer de lavado. El anillo de la estructura del Imidazol es igual a la de Histidina por lo que compete fuertemente por el ión de Níquel. Bajas concentraciones de Imidazol previenen la unión de proteínas no específicas a la matriz del Ni, mientras que las proteínas recombinantes con motivos 6x His permanecen fuertemente unidas a la matriz del Ni. La presencia de bajos niveles de  $\beta$ -mercapto-etanol en el buffer de lisis, previene la copurificación de las proteínas del huésped que pueden formar bandas disulfúricas con la proteína de interés durante la lisis celular.

Las proteínas recombinantes pueden ser purificadas en resinas de Ni-NTA empleando columnas empaquetadoras o realizando la mezcla "in batch". Tanto el lavado como la elución se pueden realizar acidificando el pH de la solución o aumentando la concentración de Imidazol. La

pureza de las proteínas purificadas puede observarse mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie o con sales de plata.

# Objetivos

A decorative graphic consisting of a vertical line on the right side and a horizontal line at the bottom, both composed of two parallel black lines. The word 'Objetivos' is positioned in the lower right quadrant, between these lines.

## 10. Objetivos

### Objetivo General I

Identificar y evaluar nuevos antígenos proteicos de *M. bovis* en animales experimental y naturalmente infectados, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).

### Objetivos Específicos

- IA) Obtener e identificar fracciones antigénicas de un cultivo de *M. bovis*. Determinación de las fracciones antigénicas inmunodominantes mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en animales experimentalmente infectados.
- IB) Evaluar la respuesta inmune en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo de 3 fracciones seleccionadas en la fase anterior (obj. IA), utilizando como control antígenos DPPA, DPPB, ESAT6 y CFP10.
- IC) Clonar, expresar y purificar los antígenos identificados de *M. bovis*.
- ID) Evaluar la respuesta inmune celular de los nuevos antígenos recombinantes en animales reaccionantes a la prueba de tuberculina

## **Objetivo General II**

Evaluar la respuesta inmune celular contra antígenos recombinantes de *M. bovis* en animales experimental y naturalmente infectados, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).

## **Objetivos Específicos**

- I(A) Evaluar la respuesta inmune celular a 12 antígenos recombinantes y dos combinaciones (comb.) de antígenos de *Mycobacterium bovis* en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).
  
- I(B) Estudiar la respuesta inmune celular a 14 antígenos recombinantes y dos combinaciones de antígenos de *Mycobacterium bovis* en animales naturalmente infectados con reacción positiva a PPD bovina, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) para su posterior aplicación al diagnóstico de la tuberculosis bovina.
  
- I(C) Investigar la respuesta inmune celular de un antígeno recombinante y 3 combinaciones de antígenos conformados de acuerdo a los resultados del experimento objetivo I(B) y otros experimentos realizados dentro del marco del Proyecto INCO.

### **Objetivo General III**

Detectar la presencia del agente infeccioso mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en animales negativos y positivos a IDR (DPP), experimentalmente y naturalmente infectados.

### **Objetivo Específico**

III) Amplificación de la secuencia *IS6110* indicadora de la presencia de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por PCR en hisopados nasales, de animales negativos a DPP y animales positivos a DPP experimentalmente y naturalmente infectados.

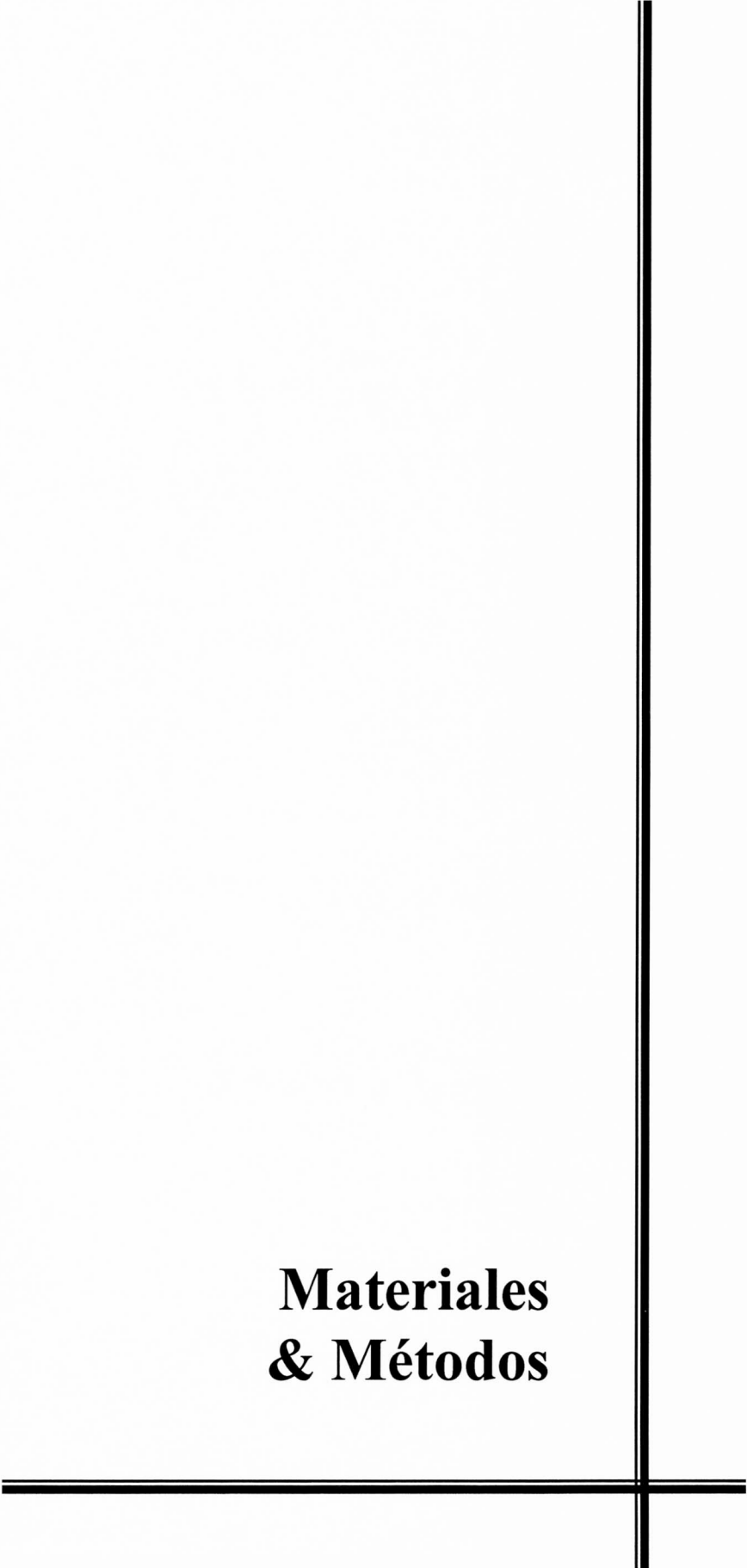
### **Objetivo General IV**

Obtención de anticuerpos policlonales contra antígenos recombinantes, a ser utilizados en etapas posteriores como herramienta en el desarrollo de un ELISA diagnóstico de *M. bovis*.

### **Objetivo Específico**

IV) Obtención de anticuerpos policlonales contra los antígenos recombinantes Rv1636, Rv2524c, EsxV, Rv0138 y Rv3740.

**Materiales  
& Métodos**

A decorative graphic consisting of a vertical line on the right side and a horizontal line at the bottom, meeting at a right angle in the bottom right corner of the page.



## **11. Materiales y Métodos**

### **11-1. Diseños experimentales**

#### *Diseño experimental I*

Este ensayo experimental se realizó para alcanzar el objetivo IA, es decir, identificar fracciones antigénicas inmunodominantes. Para ello, se utilizaron cuatro animales infectados a los que se les extrajo sangre heparinizada 20 y 37 días pos infección, para la determinación de la liberación de IFN- $\gamma$  de las fracciones finales obtenidas del sobrenadante y del extracto del cultivo (ver Tabla II).

#### *Diseño experimental II*

Este ensayo experimental se realizó para alcanzar el objetivo IB, es decir, evaluar la respuesta inmune a 3 fracciones seleccionadas en la fase anterior (obj. IA) a lo largo del tiempo en animales experimentalmente infectados. Se utilizaron cuatro terneros infectados experimentalmente y se estudiaron tres fracciones del extracto obtenidas en el diseño experimental I (fracciones 24E, 27E y 28E) a diferentes tiempos de la infección: previo a la inoculación, 1, 4 y 8 meses pos inoculación.

#### *Diseño experimental III*

Este ensayo experimental se realizó para alcanzar el objetivo ID, consistió en evaluar la respuesta

inmune celular de los antígenos recombinantes Rv1636, EsxV, Rv3740, Rv2524c, Rv0138 de *M. bovis*, junto a DPPA y DPPB, en 85 animales con reacción positiva a la prueba intradérmica DPP bovina y 28 animales negativos a DPP, de un establecimiento libre de la enfermedad, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ).

#### *Diseño experimental IV*

Este ensayo experimental se realizó para completar el objetivo ID, consistió en evaluar la respuesta inmune celular en células mononucleares de sangre periférica (PBCM) de los antígenos recombinantes utilizadas en el diseño experimental anterior, HspX y seis combinaciones integradas por los mismos antígenos recombinantes.

#### *Diseño experimental V*

Para cumplir con el objetivo IIA se utilizaron los mismos animales del corral experimental con el que se cumplieron los objetivos IA y IB. Se evaluó la respuesta inmune de 12 antígenos recombinantes inmunodominantes de *M. bovis* y dos combinaciones de antígenos a lo largo del tiempo en los 4 animales experimentalmente infectados. Se extrajeron muestras de sangre de la vena yugular con jeringas heparinizadas a los tiempos 0, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12 y 13 meses pos infección para la determinación de la liberación de IFN $\gamma$ .

#### *Diseño experimental VI*

El objetivo de este experimento consistió en evaluar la respuesta inmune celular de las proteínas

recombinantes de *M. bovis* (ESAT6, CFP10, PP195,MPB70, TB10.4, TB11.5, TB16.2, TB27.4, PP386, MPB64, MPB59,MPB83 , P38 y TPX), junto a los antígenos DPPA y DPPB en animales naturalmente infectados, mediante la prueba de la liberación de interferón gamma ( $IFN\gamma$ ). Se utilizaron 79 vacas en producción lechera, raza Holando-Argentino de cuatro localidades diferentes: 59 animales eran positivos a DPP (20 vacas pertenecientes a la zona de Bavio, 20 vacas de la zona de Ezeiza, ambas localidades de la Provincia de Bs. As., 19 vacas de Alejo Ledesma, Provincia de Córdoba) y 20 animales negativos a DPP de un establecimiento libre de infección, ubicado en la ciudad de Florida de la ROU.

#### *Diseño experimental VII*

Para alcanzar el objetivo IIC, se utilizaron 291 vacas en producción lechera, raza Holando de 10 localidades diferentes (ver Tabla I): se muestrearon 44 animales negativos pertenecientes a establecimientos libres de infección y 247 animales positivos de diferentes regiones de la Provincia de Buenos Aires.

*TABLA I.* Número de animales positivos y negativos por región utilizados para la prueba de IFN $\gamma$

Localidad	Nº animales	Reacción PPD
La Paz (Entre Ríos)	32	+
Ezeiza 1 (Bs. As)	23	+
Ezeiza 2 (Bs. As)	52	+
Quemú-Quemú (La Pampa)	32	+
Morteros (Córdoba)	38	+
Lincoln (Bs. As)	32	+
Alejo Ledesma (Córdoba)	14	+
Bavio (Bs. As)	24	+
Florida (Uruguay)	20	-
Rafaela (Santa Fe)	24	-

#### *Diseño experimental VIII*

Este ensayo se realizó en 14 animales naturalmente infectados (integrantes del diseño experimental VII), con el objetivo de poder comparar diferentes pruebas diagnósticas (tuberculina, IFN- $\gamma$  y PCR) con la técnica “gold estándar” que es el cultivo bacteriológico, y determinar por *Spoligotyping* los patrones del genotipo de *M. bovis*.

## **11-2. Animales**

La experimentación con los animales para el presente doctorado fue realizada en corrales de aislamiento en INTA Castelar. Cumplió con las normas de regulación del Comité Ético de la Unión Europea.

### **11-2-1. Animales experimentalmente infectados**

Se utilizaron seis machos castrados, raza Holando Argentino de 6 meses de edad, obtenidos de un establecimiento libre de infección de tuberculosis por un período previo de 6 años. Se confirmó el estado negativo de los animales a la infección de tuberculosis, por testeo de respuesta de células T a antígenos micobacterianos, entre ellos *M. avium* y *M. bovis*. Dos animales fueron utilizados como controles negativos, mientras que el resto (n=4) fueron infectados vía intranasal con una dosis de  $1,6 \times 10^8$  UFC de la cepa de laboratorio, *M. bovis* AN5 utilizando un método ya descrito (277). Ocho meses después de inoculados, se realizó la prueba intradérmica (DPP) inoculado 0.1 mL de DPP bovina en concentración de 1 mg/mL, conteniendo 32.500 UI/mL, donada por SENASA (GELAB), transportada y conservada en frío (2-8°C). Se inoculó en el pliegue ano-caudal y se midió la reacción a las 72 horas pos inoculación. Previo a la inoculación o basal, se extrajo sangre de la vena yugular con jeringas heparinizadas a todos los animales para la determinación de la liberación de IFN- $\gamma$ . Se realizó la necropsia de los animales a los 380 días pos infección utilizando para ello el protocolo de la UBA. Una vez derribados los animales, fueron lavados con abundante agua previa revisión de

piel y mucosas.

Se realizó observación macroscópica de los linfonodos de la cabeza: retrofaríngeos, mandibulares, mesentéricos y parotídeos; observación macroscópica de la cavidad torácica y abdominal; toma de muestras de pulmón, ganglios mediastínicos y bronquiales, hígado y bazo, los cuales fueron colocados en envases estériles para bacteriología y para histopatología en envases de boca ancha con formol al 10% tamponado.

Sistema nervioso: observación macroscópica de la masa encefálica.

### **11-2-2. Animales naturalmente infectados**

Los animales correspondientes al *diseño experimental III* fueron 85 vacas lecheras, raza Holando-Argentino de dos establecimientos diferentes de la Provincia de Bs. As, uno en la localidad de Bavio y otro en Venado Tuerto, con reacción positiva a DPP bovina y 28 vacas lecheras, de la misma raza, de un establecimiento libre de la enfermedad, en la localidad de Rafaela (Pcia de Santa Fe), negativos a DPP. Se evaluó la respuesta inmune celular de las proteínas recombinantes obtenidas Rv1636, EsxV, Rv3740, Rv2524c, Rv0138 (ver resultados), de *M. bovis*, junto a los antígenos proteicos DPPA y DPPB del *Kit*.

Los animales correspondientes al *diseño experimental IV* fueron 12 vacas lecheras, raza Holando-Argentino. Seis vacas de un establecimiento de Entre Ríos, DPP positivas, y 6 vacas del campo experimental de INTA Castelar (libre de infección de tuberculosis).

Los animales correspondientes al *diseño experimental VI* fueron 79 vacas raza Holando-Argentino de cuatro localidades diferentes: 59 animales eran positivos a DPP (20 vacas pertenecientes a la zona de Bavio, 20 vacas de la zona de Ezeiza, ambas localidades de la

Provincia de Bs. As., 19 vacas de Alejo Ledesma, Provincia de Córdoba) y 20 animales negativos a DPP de un establecimiento libre de infección, ubicado en la ciudad de Florida de la ROU.

Los animales correspondientes al *diseño experimental VII* fueron 291 vacas en producción lechera, raza Holando de 10 localidades diferentes (ver Tabla I).

### **11-3. Obtención de las fracciones Antigénicas**

#### **11-3-1. Sobrenadante y extracto del cultivo celular.**

La cepa de *M. bovis* AA534, es el genotipo de mayor prevalencia en Argentina (67). Se cultivó en medio líquido Middlebrook 7H9 conteniendo ácido pirúvico y glucosa al 0,4%. Los cultivos crecieron sin agitación a 37° C durante 21 días. Pasado ese período el sobrenadante se separó del extracto por centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos. Por razones de seguridad los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados (filtros de 0.22µm. Millipore- Bedford, MA, USA). Luego se adicionó lentamente en agitación, sulfato de amonio al 50%, para precipitar las proteínas. La agitación continuó durante toda la noche (aproximadamente unas 18h) en cámara de 4°C. Las proteínas precipitadas se obtuvieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 30 m. El precipitado se disolvió en un volumen mínimo de buffer solución salina (PBS) y se dializó en membrana de diálisis con un punto de corte del poro de 6-8 kDa, contra PBS durante 18h a 4°C. La masa de células del cultivo (extracto), separada del sobrenadante, se resuspendió en PBS. Las micobacterias fueron muertas por calor (30 m a 80° C) y sonicadas 5 veces durante 1 m dejando un intervalo de 2 m. Se midió la concentración de proteínas del extracto y sobrenadante por el método del Acido Bicinchoninico (276).

### **11-3-2. Fraccionamiento de las proteínas del medio de cultivo por corrida electroforética (SDS-PAGE)**

Las proteínas del sobrenadante y del extracto fueron sembradas por separado (concentración de 500 mg) en geles de poliacrilamida 12.5 % (30×15cm). Se realizó la corrida electroforética (SDS-PAGE) durante toda la noche, separando las proteínas de diferente peso molecular (PM) (Pollock and Andersen 1997). Se colocó el gel de poliacrilamida sobre una base de acrílico con 30 canaletas (*blott-elutor*), se realizó la transferencia (200mA durante 20 m) en buffer (5 mM TrisHCl, pH=7,5), recogidas sobre una membrana de nylon. Luego de cosechar aproximadamente 2 mL de cada fracción de sobrenadante y de extracto, fueron guardadas a -20°C. Para determinar con precisión la separación de las diferentes fracciones y que no hubiera pasaje de proteínas de una canaleta a la otra (en el momento de la corrida en el *blot elutor*), se sembraron las 30 fracciones en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y fueron teñidas con nitrato de plata (fig. 1). Se ajustó su isotonía dializando contra PBS1×. Luego se determinó la concentración de las diferentes fracciones proteicas mediante el *Kit* de determinación de proteínas (276). Algunas de las fracciones fueron unidas (tabla 1), teniendo un total de 15 fracciones de extracto y 13 fracciones de sobrenadante. Todas las fracciones se guardaron a -80°C, para mantener la integridad de las fracciones y ser usadas posteriormente.

### **11-3-3. Electroforesis en 2 dimensiones**

La electroforesis en 2 dimensiones fue realizada con algunas modificaciones (278). Las



siguientes fracciones: 4S (15µg), 17S (0.15µg), 24E (6µg), 25E (10.5µg) fueron diluídas en una solución (urea 7M, thiourea 2M, CHAPS2%, buffer IPG 0.5% rango de pH 3-10, DTT 50 mM) con un volumen de rehidratación apropiado, e incubado por 1 h en agitación a temperatura ambiente. La muestra fue aplicada sobre una tira de anfolitos inmovilizados de 11 cm, con un rango de pH 3-10 IPG (GE Healthcare, Piscataway, NJ) previamente hidratada sobre una cuba. Se realizó el isoelectroenfoque (IEF) en el sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare, Piscataway, NJ) según las instrucciones del fabricante. Después del IEF, se incubaron las tiras durante 20 m en buffer de equilibrio (Tris-HCl 50mM, urea 6M, 30% v/v glicerol, SDS 2%, azul de bromofenol0.005%), conteniendo DTT 1%, seguido de unos 20 min. de incubación con iodoacetamida 4% en buffer de equilibrio. La segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizó en geles de poliacrilamida 12,5% usando el sistema Mini Protean 3 (BioRad, Hercules, CA), donde se coloca la tira marcada sobre el gel de 8 × 7,3 cm de SDS-poliacrilamida. Después de la corrida se detectaron las proteínas al teñirlas con nitrato de plata. Las manchas de las fracciones obtenidas fueron enviadas al Laboratorio de la Facultad de Química en la Universidad de Barcelona, para su identificación por el método de Maldi-tof.

#### **11-4. Expresión y purificación de *M. bovis* Rv1636, Rv0138, Rv2524c, EsxV, Rv3740 y**

##### **HspX**

Los datos de espectrometría de masa, fueron comparados con la base de datos genómica (<http://genolist.pasterur.fr/tubercuList/>), empleando el programa MS-fit ([www.prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm](http://www.prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm)). Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores

para amplificar por PCR los genes correspondientes (ver tabla II). Se realizó un clonado dirigido introduciendo sitios de restricción, para facilitar el siguiente clonado, en el vector de expresión multicopia pRSET-A (Invitrogen) que codifica para 6 histidinas. Los productos de PCR, primero se ligaron a pGEM-T y posteriormente fueron ligados a pRSET-A, (Rv1636 por digestión BamH1/EcoR1 y Rv0138, Rv2524, EsxV, Rv3740 y HspX por digestión Bamh1/HindIII) y transformados en *E. coli* XL1Blue. Las construcciones en pRSET, fueron introducidas en *E. coli* BL21 (DE3, pLys) y los clones resultantes cultivados en medio sólido LB-ampí. Se sembró una colonia (de cada construcción) en 3mL de medio de cultivo líquido LB-ampí, creciendo durante 16h a 37° C. De éste, se realizó una dilución 1:100 en 50mL de medio LB-ampicilina, creciendo durante 3-4 h a 37° C en agitación, hasta alcanzar una  $OD_{600} \sim 0.4$ , se tomó una muestra de 200  $\mu$ l y al resto se lo indujo con 1mM de IPTG, durante otras 3 h. Luego se cosecharon las células por centrifugación y congelaron a -20° C hasta posterior uso. El pellet de células de todas las transformaciones, se lisó en 1mL de buffer (1M Tris/HCl pH 7.5, con el agregado de 10mM de Imidazol) con sonicador. Las proteínas recombinantes del extracto de células de *E. coli* se purificaron, usando columnas de afinidad de níquel-agarosa (Invitrogen) y se eluyeron con concentraciones crecientes de Imidazol de 250mM a 1M (Sigma). La expresión fue confirmada por Western-blot usando un anticuerpo monoclonal antihistidina conjugado a fosfatasa alcalina, que da una señal colorimétrica cuando se incuba con los sustratos BCIP y NBT. Se comprobó el grado de purificación de cada fracción mediante la tinción de Coomassie blue.

TABLA II. PCR primers (oligonucleótidos iniciadores) usados para el análisis de *Rv1636*, *Rv0138*, *Rv2524*, *EsxV*, *Rv3740* y *HspX*.

Primers	Secuencias	
Rv1636Up	*ggatccGGATCCATGAGCGCCTATAAGACCGTGG	BamH1
Rv1636low	*gaattcGAATTCCTAGGTGGTGTGCACGATCAGCA	Eco R1
Rv3740up	*ggatccGGATCCATGTCACCGATCGATGCGCT	BamH1
Rv3740low	*aagcttAAGCTTTCATAGCCCGACCGCGCGCT	HindIII
EsxVup	*ggatccGGATCCATGACCATCAACTATCAATT	BamH1
Esxlow	*aagcttAAGCTTTTAGGCCAGCTGGAGCCGA	HindIII
Rv0138up	*ggatccGGATCCGTGAGCGCTTCGGAGTTCTCC	BamH1
Rv0138low	*aagcttAAGCTTTTAAGGACCTCCATGCCGGCG	HindIII
Rv2524up	*ggatccGGATCCGTGCGCGGCCAGATCCCGAC	BamH1
Rv2524low	*aagcttAAGCTTTCACAGTTGAGCCTTGCCCAACCGGA	HindIII
HspXup	*ggatccGGATCCATGGCCACCACCCTTCCCGTTC	BamH1
HspX low	*aagcttAAGCTTTCAGTTGGTGGACCGGATCTGA	HindIII

\*En minúscula se indica el sitio de corte de cada enzima.

### 11-5. Antígenos recombinantes

Los antígenos recombinantes de *M. bovis*: ESAT6, CFP10, PP195, MPB70, TB10.4, TB11.5, TB16.2, TB27.4, PP386, MPB64, MPB59, MPB83 fueron enviados en viales liofilizados, Staten Serum Institut-Copenhague-Dinamarca (grupo del Dr. P. Andersen), P38 enviada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM (Dra. Clara Espitia), a excepción de TPX que fue

clonado, expresado y purificado en el laboratorio de INTA Castelar por la Dra. Alicia Alito. Los combos surgen de mezclar dos antígenos, en el caso de ESAT6 y CFP10 son los dos antígenos más estudiados por su alta capacidad de respuesta inmune en animales infectados con tuberculosis y son los que conforman el combo1. El combo 2, está formado por CFP10 y pp195. La clasificación de las proteínas con su gen correspondiente son obtenidas de la secuencia del genoma de *M. bovis* se lista a continuación en tabla III:

*Tabla III-* Nombre de proteínas utilizadas con su gen correspondiente

Nombre de Proteínas	Nombre del gen
ESAT-6	Rv3875
CFP-10	Rv3874
PP195	Rv1195
PP386	Rv1386
TB10.4	Rv0288
TB27.4	Rv3878
TB 11.5	Rv0285
CFP20	Rv1932( <i>tpx</i> )
MPB70	Rv2875
MPB59	Rv1886c
MPB83	Rv2873
P38	Rv0934
TB16.2	Rv2031

### 11-6. Composición de las diferentes combinaciones de antígenos y sus concentraciones

La formación de los diferentes combos y las concentraciones respectivas fueron acordadas por los investigadores del proyecto INCO de los cuatro países que lo formaron (México, Irlanda, Dinamarca y Argentina). A continuación se detalla la composición de cada combo y la concentración de cada uno de ellos (tabla IV).

*TABLA IV.* Composición de las combinaciones (comb.) y concentración de antígenos por celda.

Antígenos	Concentración por antígeno ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración por celda ( $\mu\text{g/mL}$ )
DPPA	20	20
DPPB	20	20
ESAT-6+CFP10 (Comb. 1)	2	4
ESAT-6, CFP10, pp195, tb10.4+tb11.5 (Comb. 2)	4	18
pp195+tb10.4 (Comb. 3)	2	4
tb11.5	2	2

### 11-7. Prueba de IFN $\gamma$

El ensayo se basó en la liberación de IFN $\gamma$  de los linfocitos T, extrayendo sangre de la vena yugular con una jeringa conteniendo heparina (15unidades/mL), colocando 200 $\mu\text{l}$  de sangre

entera en cada pozo de la placa de 96 pozos, sensibilizados con PPD-A, PPD-B (4 ug/mL), fracciones peptídicas (4 ug/mL), proteínas recombinantes enviadas por el proyecto en colaboración por Irlanda y las obtenidas en el laboratorio: Rv1636, Rv0138, Rv2524, EsxV, Rv3740, HspX, un mitógeno control de liberación de IFN $\gamma$  estimulante de células T (PWM de Sigma) (4 ug/mL) y control de PBS. El ensayo fue descrito por Lightbody et al. (279). Las placas se incubaron en estufa a 37° C con 5% CO<sub>2</sub> durante 16 hs. Con el plasma recolectado por centrifugación a 2300rpm durante 20 m, se realizó la prueba de IFN $\gamma$  medido por un ELISA *sandwich* (inmunoensayo) utilizando el Kit Bovigam CSL Veterinary, siguiendo el protocolo del fabricante.

Los resultados fueron expresados en Índice de Densidad Optica, la lectura se realizó con OD<sub>450</sub> (IDO= medida de densidad óptica de incubaciones en presencia de antígenos/ medida de densidad óptica de incubaciones con PBS).

#### **11-8. Preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

El ensayo se basó en la liberación de IFN $\gamma$  de los linfocitos T, extrayendo sangre de vena yugular con una jeringa conteniendo heparina (15unidades/mL). Se diluyó la sangre a la mitad y se la trasvasó a un tubo conteniendo Ficoll- Histopaque (Pharmacia). Se separaron las células mononucleares por centrifugación 1500 rpm durante 25 minutos y se lavaron 3 veces con PBS1X, posteriormente se resuspendieron en medio RPMI 1640(Gibco), con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB), 500mg/mL de Gentamicina, 100.000UI/mL de Penicilina G-sódica y 700mg/mL de Estreptomina.

El recuento de la viabilidad celular fue realizada con Tripan blue y ajustado a 300.000 células en 200ul de medio RPMI, por pozo (placas de 96 pozos). Estas, fueron agregadas a las proteínas recombinantes obtenidas y a las siguientes combinaciones: Rv0138+Rv1636, Rv1636+HspX, EsxV+RV2524, EsxV+Rv1636+Rv2524, EsxV+Rv3740, ESAT6 +CFP10; PPD-A, PPD-B (4 ug/ml), PWM (Sigma) (4 ug/ml) y control de PBS. Las placas se incubaron en estufa a 37° C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Con el plasma, recolectado por centrifugación a 2300rpm durante 20 min., se realizó la prueba de IFN $\gamma$  descrita anteriormente.

#### **11-9. Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN, se tomaron muestras de fosas nasales con hisopos estériles (alambre de 50 cm. de largo con un algodón y gasa en la punta, envueltos en papel de aluminio y papel madera). Se resuspendió el material del hisopo en 10mL de PBS estéril en tubos de 50mL. Las muestras se centrifugaron durante 20m a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante: el pellet se resuspendió en 500ul de buffer Tris-EDTA (TE) 1X inactivándolo con calor a 80° C durante 50 minutos. Al día siguiente, la suspensión se incubó con 50  $\mu$ l de lisozima (10 mg/mL) durante una hora a 37° C, agregando 75  $\mu$ l de SDS (10%) y 10  $\mu$ l de proteinasa K (10mg/mL) e incubando a 65° C durante 10 minutos. Se agregó 100  $\mu$ l de Na Cl 5M, 100  $\mu$ l de N-cetyl-N,N,N trimethyl ammonium bromide (CTAB), se agitó en vortex hasta tomar una coloración lechosa, y luego se incubó a 65° C durante 10 minutos. Se procedió al agregado de 750  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó y centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa (superior) se transfirió a otro tubo agregando 450  $\mu$ l (0.6 volúmenes) de alcohol isopropílico, e incubándolo a -20° C durante 12 h. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a temperatura

ambiente y se descartó el sobrenadante, agregando 1 mL de etanol 70%. Se centrifugo y el pellet se lo dejó secar por evaporación a temperatura ambiente. Se resuspendió en 20 µl de buffer TE 0.1X. Una vez disuelto el ADN, se conservó a  $-20^{\circ}$  C.

### 11-10. Protocolo de PCR

La mezcla para la secuencia de amplificación IS6110 (secuencia específica repetida) consistió en buffer Taq (tris-HCl 10mM, pH 9,0; KCl 50mM, y Tritón X-100 al 0.1%), MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µl de cada iniciador (INS1-INS2), 2 µl de templado y 1,25 U de Taq Polimerasa, en un volumen final de 50 µL. Cada tubo de reacción se cubrió con una gota de aceite mineral. A la mezcla se le agregó por último 2 µl del ADN.

Las secuencias de oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación de las micobacterias que integran el complejo *Mycpbacterium tuberculosis* fueron 5'-cgtgagggcatcgaggtggc-3' y 5'-gcgtaggcgtcggtgacaaa-3', específicas para 245 pares de bases del amplicón IS6110 (280).

Las condiciones de temperatura para la amplificación por *touchdown* se realizaron de acuerdo a lo descrito por Zumárraga et al., (286) y se describen en la siguiente tabla V:



*Tabla V-* Condiciones de amplificación del oligonucleótido iniciador IS6110

	temperatura	tiempo	nº de ciclos
Paso 1	96°	3'	-
Paso 2	96°	1'	8 ciclos
Paso 3	72°	1' (-1° c/ciclo)	
Paso 4	72°	2'	
Paso 5	96°	1'	30 ciclos
Paso 6	65°	1'	
Paso 7	72°	2'	
Paso 8	72°	10'	-

Una vez finalizada la PCR, las muestras se conservaron a 4° C. El producto de PCR puede ser identificado a través del método de electroforesis en geles agarosa (2%)/TBE, mediante corrida electroforética (100V) en buffer TAE (Tris-EDTA) y teñidos con bromuro de etidio 500 µg/mL (1000X). La presencia de bandas se observan por visualización directa del gel sobre una fuente de luz ultravioleta.

### **11-11. Producción de anticuerpos policlonales de las proteínas recombinantes**

#### *Animales de laboratorio*

Para la obtención de anticuerpos policlonales de las proteínas recombinantes obtenidas RV 1636, Rv0138, Rv3740, Rv2524c y EsxV, se inmunizaron diez ratones BALB/C (dos ratones por proteína recombinante) vía intraperitoneal, en dos inoculaciones con un intervalo de 15 días. Se administraron 4 µg de proteína purificada por ratón diluída en adyuvante incompleto de Freund's y 1% Tween 40 concentración final. Posteriormente se realizó Western-blot confirmatorio de éstas proteínas, con los sueros de los ratones inoculados y con el anticuerpo anti-histidina.

## 11-12. Análisis estadístico

El índice de densidad óptica fue analizado por el procedimiento mixto (mixed procedure Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 2000). El modelo estadístico para el diseño experimental 2 incluyó el efecto de tratamiento (inoculado vs. control), tiempo respecto a la inoculación (0 y meses 1, 4 y 8 pos inoculación), antígenos y fracciones e interacciones. El modelo estadístico para el diseño experimental 3 incluyó el efecto de animales reaccionantes a la prueba tuberculínica (positivos vs. negativos), antígenos e interacciones. Se analizaron las diferencias entre grupos por las diferencias mínimas cuadradas. Se realizaron test de correlación para ver asociaciones entre variables (Proc Corr, SAS). Se consideró significativo si  $P < 0.05$ .

Se determinaron la sensibilidad y especificidad de cada antígeno, analizadas por el método estadístico del software MedCalc (Microsoft, USA) <http://www.medcalc.be>. Este método diferencia dos poblaciones diferentes (enfermos de sanos), usando el análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) determina valores de punto de corte (valor de predicción) y sugiere uno como óptimo. El área bajo la curva ROC calcula el tamaño de muestra requerido para comparar el área bajo la curva con un valor de hipótesis nula (0.5). Determina valores bajo la curva de 0.5 a 1.

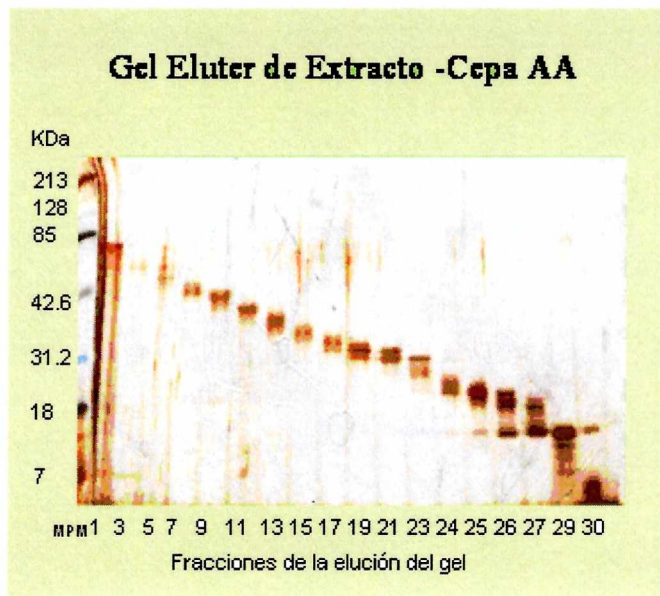
# Resultados

A decorative L-shaped line consisting of two parallel black lines. One line is vertical and runs along the right edge of the page, while the other is horizontal and runs along the bottom edge. They meet at a right angle in the bottom right corner.

## 12. Resultados

### 12-1. Obtención e identificación de fracciones antigénicas

Se obtuvieron 30 fracciones en un rango de concentración de 17 a 80  $\mu\text{g/mL}$  y con un peso molecular de 7 a 208 kDa (Figura I). Con el objetivo de incrementar la concentración de las fracciones antigénicas para su posterior uso, se unieron fracciones de proteína de similar peso molecular de varias corridas electroforéticas.



*Figura I. SDS-Page teñido con nitrato de plata de las fracciones proteicas obtenidas luego de la electroelución.*

En la Tabla VI se describen las fracciones obtenidas y como fueron guardadas para su posterior utilización en las siguientes etapas de este trabajo de doctorado.

*TABLA VI.* Agrupación de fracciones por cantidad y concentración

Fracción original de <b>sobrenadante</b>	Fracción final unidas de <b>sobrenadante</b>	Fracción original de extracto	Fracción final unidas de extracto
1,2,3,4,5	1s	1	1E
6,7	2s	2,3	2E
8,9	3s	4	3E
10,11	<b>4s</b>	5,6	4E
12,13	5s	7,8	5E
14,15	6s	9,10	6E
16,17	<b>7s</b>	11,12	7E
18,19	8s	13,14	8E
20,21	9s	15,16	9E
22,23	10s	17	10E
24,25	11s	18,19	11E
26,27	12s	20,21	12E
28,29,30	13s	22,23	13E
		<b>24,25</b>	<b>14E</b>
		<b>26,27,28,29,30</b>	15E

En negrita se muestran las fracciones que fueron utilizadas en etapas posteriores en este doctorado.

## 12-2. Diseño experimental I: Selección de fracciones antigénicas

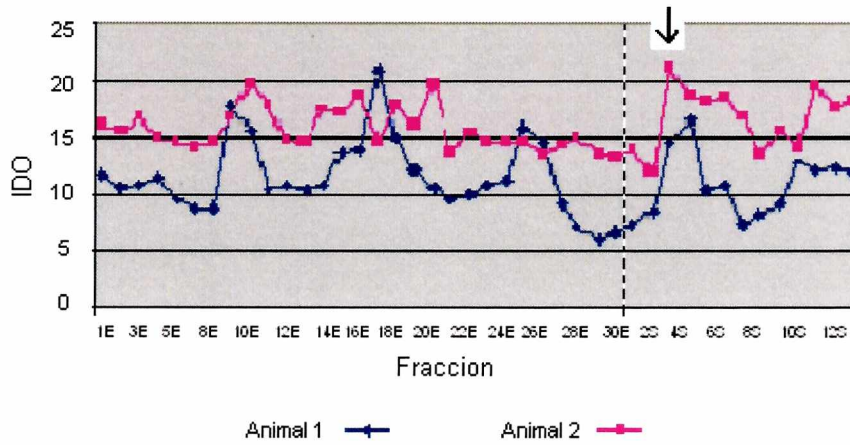
La liberación de IFN $\gamma$  pre-inoculación de los animales infectados se utilizó como línea de base para calcular el aumento porcentual de las diferentes fracciones a los 20 y 37 días pos inoculación. El promedio (%) de aumento de liberación de IFN $\gamma$  de todas las fracciones, fue de (X  $\pm$  SD) 339  $\pm$  180; quedando 20 fracciones por debajo del promedio y 12 por encima. DPPA quedó por debajo de este promedio (302 %) mientras que DPPB quedó por encima (797 %). Las fracciones seleccionadas para el diseño experimental 2 tuvieron los siguientes resultados que se observan en la tabla VII.

*Tabla VII-* Promedios del IDO (liberación de IFN $\gamma$ ) de las fracciones seleccionadas

Antígenos y fracciones	Promedio en aumento de (%)
DPPA	302
DPPB	797
4S	254
7S	256
14E	629

Además de tener en cuenta la disponibilidad en cantidad suficiente de la fracción original, el criterio de selección de las fracciones antigénicas a ser utilizadas posteriormente (diseño 3) se basó en: 1) la selección de una fracción antigénica (14E) con un porcentaje de aumento similar a

la DPPB (por encima del promedio de todas las fracciones, 2) la selección de una fracción antigénica (7S) con un porcentaje de aumento similar a la DPPA (por debajo del promedio de todas las fracciones) y 3) los resultados obtenidos en un experimento de índole similar realizado en cooperación con el Laboratorio of Veterinary Sciences Division (VSD) at Queén, Belfast, del cual surgió la selección de la fracción (4S) (fig. II)



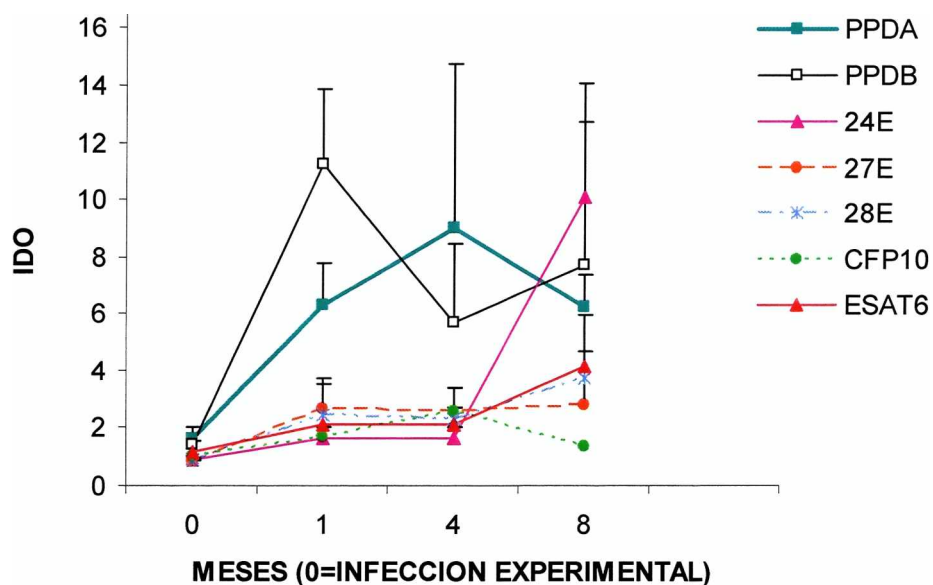
**Figura II.** Liberación de  $IFN\gamma$  de sangre total, en dos animales del Laboratorio VSD, Belfast.

*La línea punteada separa valores de IDO de fracciones del extracto de las del sobrenadante.*

### **12-3. Diseño experimental II: Evaluación de la respuesta inmune de 3 fracciones antigénicas de *M.bovis* en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo**

En la infección experimental de los cuatro animales, la antigenicidad de las tres fracciones originales del extracto (24E, 27E y 28E) a lo largo del tiempo fue comparada con la de dos de los antígenos más estudiados (CFP10 y ESAT6) y con la de DPPA y DPPB. Se observó que hay un efecto significativo de las fracciones y del tiempo de infección ( $P < 0.0001$  para ambos). La elección de las tres fracciones (24E, 27E y 28E) se estableció bajo los parámetros determinados por el alto IDO (24E) en el diseño experimental anterior, y por tener cantidad suficiente de muestra para la realización del estudio y comparar la respuesta con otras fracciones (27E, 28E). Mientras que el IDO de DPPB y DPPA aumentan al mes y a los 4 meses respectivamente, la fracción 24E aumenta significativamente a los 8 meses pos-inoculación. El resto de las fracciones no presentaron aumentos de IDO significativos. El IDO de DPPB fue mayor significativamente al mes pos inoculación que la de todas las fracciones antigénicas a excepción de DPPA. Al mismo período de tiempo, el IDO de DPPA es mayor que la de las fracciones 24E, 27E y 28E. A los 8 meses pos inoculación, la fracción 24E presenta una mayor densidad óptica que las fracciones 27E, 28E y CFP10. Al mismo tiempo, el IDO de ESAT6 tiende a ser mayor que las fracciones 27E, 28E y CFP10 (Fig. III). Como se observa en el gráfico hay una gran variación individual, que resultó en grandes errores estándar.





**Figura III.** Índice de Densidad Óptica de las fracciones 24E, 27E, 28E, CFP10, ESAT6, DPPA, DPPB de *M.bovis* a lo largo del tiempo.

#### 12-4. Clonado de los antígenos identificados de *M.bovis* en las fracciones inmunoestimulantes en estudio

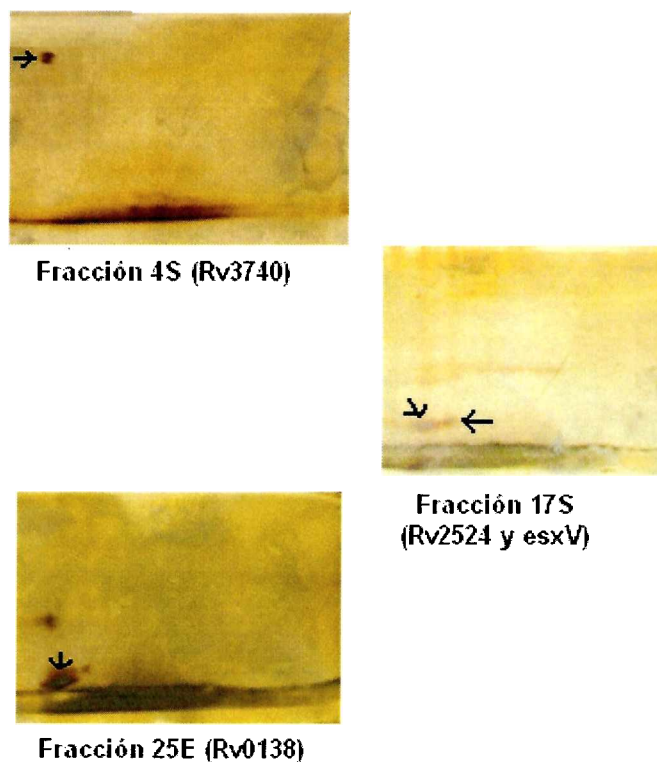
Las fracciones seleccionadas para seguir el estudio de electroforesis en 2 dimensiones y la

posterior identificación de las proteínas individuales por espectrometría de masa Maldi-Tof, fueron los que se muestran en la tabla VIII en negrita.

**TABLA VIII.** Pesos moleculares de las proteínas recombinantes y de las fracciones originales correspondientes.

Proteína	Fracción original	Peso Molecular (kDa)
Rv1636	<b>24E</b>	16
HspX (Rv2030c)	<b>24E</b>	16
Rv3740	<b>4S</b>	50
Rv2524c (sintasa de ácidos grasos)	<b>17S</b>	33
EsxV/ Rv3619c	<b>17S</b>	10
Rv0138	<b>25E</b>	19

A modo de ejemplo en la Figura IV, se muestran tres geles teñidos con nitrato de plata de la fracción 4S, 17S y 25E, donde se indica con flechas negras las manchas de proteínas que se enviaron a secuenciar por espectrometría de masa Maldi-Tof. Posteriormente se identificaron las proteínas utilizando el programa MSFit comparando con la base de datos del genoma de *M. tuberculosis*.



**Figura IV.** Spots (manchas), examinados por espectrometría de masa Maldi-Tof

A continuación se resumen los aspectos encontrados en la base de datos disponible en tubercuList (genolist.pasteur.Fr/tubercuList) respecto de cada una de las siguientes fracciones:

**Rv1636:** de función desconocida cuya expresión génica se cree que está regulada por el hierro. Tiene un peso molecular de 14 kDa, posee 441 pb (146 aa).

**HspX (Rv2031):** homóloga a la alfa cristalina, inducida por anoxia (estrés), se mantiene viable por largo tiempo en el período de latencia de la enfermedad. Se manifiesta en infecciones sintomáticas, y tiene un rol propuesto en la replicación durante la infección inicial. Regulada por un sistema de dos componentes. Tiene un peso molecular de 16kDa y posee 435 pb (144 aa).

**Rv3740c:** de función desconocida, proteína hipotéticamente conservada. Tiene un peso molecular

de 48kDa, posee 1347 pb (448 aa).

**Rv2524c:** es una sintetasa de ácidos grasos. Su función está involucrada en el metabolismo lipídico. Tiene un peso molecular de 33kDa, posee 9210 pb (3069 aa).

**EsxV:** pertenece a la familia Esat 6, de función desconocida. Tiene un peso molecular de 10kDa, posee 285 pb (94 aa).

**Rv0138:** de función desconocida. Tiene un peso molecular de 19kDa y posee 504 pb (167 aa).

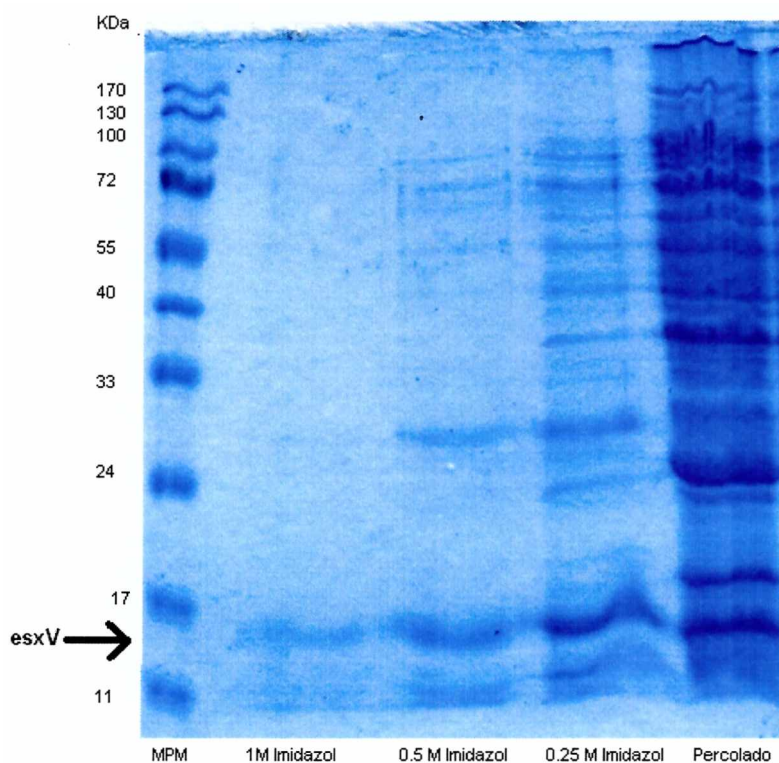
En la tabla IX se describe el grado de homología encontrada con los genomas de *M. avium* y *M. smegmatis*.

*TABLA IX.* Grado de homología aminoacídica entre las proteínas identificadas de *M. bovis* y ORFs de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium smegmatis*

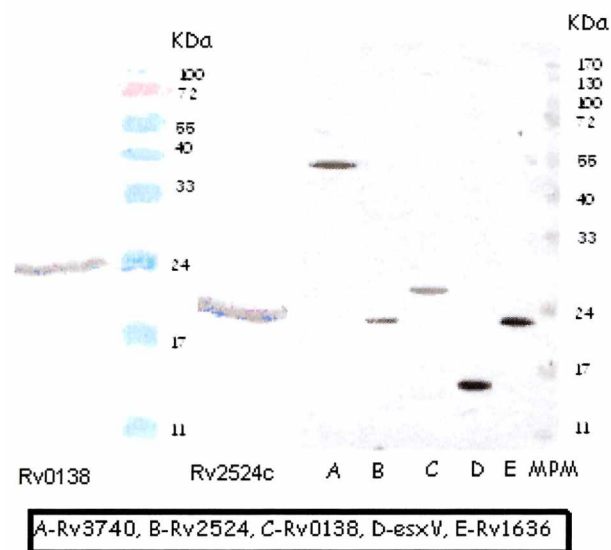
	<b>Rv1636</b>	<b>HspX</b>	<b>Rv3740</b>	<b>Rv2524</b>	<b>EsxV</b>	<b>Rv0138</b>
<b><i>M. avium</i></b>	95%	43%	78%	86%	91%	86%
<b><i>M. smegmatis</i></b>	88%	36%	76%	90%	non- orth	86%

Las proteínas recombinantes fueron clonadas en el vector de expresión pRSET-A para crear una proteína fusionada a histidinas. Los productos de PCR fueron ligados a pRSET, transformados en *E. coli* XL1Blue y los genes correspondientes fueron expresados en la cepa *E. coli* BL21. Las proteínas recombinantes del extracto de células de *E. coli* se purificaron, usando columnas de afinidad de níquel- agarosa y se eluyeron con concentraciones crecientes de 250mM a 1M de

Imidazol. La expresión fue confirmada por Western-blot usando un anticuerpo monoclonal antihistidina conjugado a fosfatasa alcalina, dando una señal colorimétrica cuando se incubó con los sustratos BCIP y NBT (figuras V y VI).



**Figura V.** Purificación de la proteína *EsxV*. SDS-PAGE teñido con Coomasie-blue, percolado y 3 fracciones eluidas con concentraciones crecientes de Imidazol.



**Figura VI.** Western-blot de las proteínas recombinantes Rv1636 (16kDa), Rv0138 (19kDa), Rv3740 (50kDa), Rv2524c (33kDa), EsxV (10kDa)

### 12-5. Diseño experimental III: Evaluación de la respuesta inmune de los nuevos antígenos recombinantes de *M. bovis*, en animales naturalmente infectados

#### 12-5-1. Sensibilidad y especificidad de ensayos basados en las proteínas identificadas.

En este experimento se evaluaron los antígenos recombinantes obtenidos en el laboratorio (a excepción de HspX) (Tabla VIII), en animales naturalmente infectados. Los resultados de este experimento fueron evaluados teniendo en cuenta el punto de corte para cada fracción obtenido por la curva ROC y tomando en cuenta una especificidad del 95 %, Tabla X.

*TABLA X.* Puntos de corte obtenidos por la Curva ROC (valor de predicción según el criterio establecido por la curva ROC), y para una especificidad del 95 %.

Criterio establecido por la curva ROC				Especificidad 95%	
Fracción	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Punto de corte	Sensibilidad
DPPA	1.77	40	86	2	28
DPPB	1.96	77	91	2.29	67
RV1636	1.06	49	73	0.81	16.5
RV3740	1.2	70	68	0.96	33
Rv2524	1.01	43	86	0.68	10
EsxV	1.25	62	54	2.04	19
RV0138	1.08	49	86	0.8	12.7

Ver figura XVIII de la Curva ROC como agregado, después de bibliografía.

### **12-5-2. Índice de densidad óptica (liberación de IFN $\gamma$ ) de los diferentes antígenos**

El promedio de la liberación de IFN $\gamma$  en DPPB fue mayor en animales tuberculino-positivos que en los tuberculio-negativos ( $P < 0.0001$ ) y un patrón similar se observó para EsxV ( $P = 0.13$ ) (ver Tabla VIII). No se observaron diferencias significativas en la liberación de IFN $\gamma$  entre los

animales negativos y positivos con DPPA ( $P=0.2$ ) y con el resto de los antígenos recombinantes (Rv1636, Rv3740, Rv0138 y Rv2524c). La liberación de  $IFN\gamma$  en animales positivos a DPP no difirió entre los antígenos Rv1636, Rv3740, Rv0138 y Rv2524c que fueron menores al IDO de EsxV, DPPA y DPPB. El IDO de DPPA y EsxV fue menor que el de DPPB. No se encontraron diferencias en el IDO de animales negativos a DPP, entre los diferentes antígenos.

*TABLA XI.* Promedio ( $\pm$  SEM) de índice de densidad óptica (establecidos por la liberación de  $IFN\gamma$ ) de los antígenos recombinantes en animales positivos y negativos a DPP.

Fracción	Positivos DPP (n= 79 )	Negativos DPP (n= 22 )
PPDA	$2.1 \pm 0.28^b$	$1.45 \pm 0.43$
PPDB	$6.1 \pm 0.28^c$	$1.42 \pm 0.43$
Rv1636	$1.16 \pm 0.28^a$	$1.27 \pm 0.43$
Rv3740	$1.35 \pm 0.28^a$	$1.4 \pm 0.43$
Rv2524c	$1.28 \pm 0.28^a$	$1.36 \pm 0.43$
EsxV	$2.2 \pm 0.28^b$	$1.38 \pm 0.43$
Rv0138	$1.36 \pm 0.28^a$	$1.77 \pm 0.43$

Valores con superíndices con diferentes letras dentro de la misma columna indican una diferencia significativa de  $P < 0.05$



### ***12-5-3. Resultados de la reacción tuberculínica (DPP) de los animales del corral y del examen pos mortem***

La reacción de DPP fue positiva en todos los animales experimentalmente infectados y negativa en los dos controles. En la revisión pos-mortem no se encontró lesión en ninguno de los órganos. No se encontró alteración histopatológica y no hubo desarrollo de colonias en los cultivos de los órganos realizadas en los medios Stonebrink y Löwestein-Jensen.

### **12-6. Diseño experimental IV: Evaluación de la respuesta inmune celular (IFN $\gamma$ ), de antígenos recombinantes de *M.bovis*, ensayados en forma individual y en distintas combinaciones, en animales naturalmente infectados.**

#### ***Sensibilidad y especificidad de los diferentes antígenos***

En este experimento se evaluaron los antígenos recombinantes obtenidos en el laboratorio (Tabla VI) en 6 animales naturalmente infectados (DPP positivos), y 6 animales de un establecimiento libre de la enfermedad (DPP negativos). Los resultados de este experimento fueron evaluados

teniendo en cuenta el punto de corte para cada antígeno, obtenido por la curva ROC, ver Tabla XII.

*TABLA XII.* Puntos de corte establecidos por datos de la Curva ROC

(ABC, área bajo la curva)

Antígenos	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	ABC*
DPPA	1.09	83	83	0.8
DPPB	1.46	83	100	0.97
Esat6+ CFP10	1.15	100	100	1
Rv1636	-	-	-	0.5*
HspX	1.11	66	100	0.9
Rv1636+hspX	0.71-1	100	100	1
Esx+Rv1636+R v2524c	1.05	67	100	0.75
EsxV	0.51	33	100	0.61
Rv0138	0.72	33	100	0.53
EsxV+Rv3740	0.95	80	67	0.75

\*Datos de  $ABC \leq 0.5$  no serán considerados

Ver figura XIX de la Curva ROC como agregado, después de bibliografía.

Como se observa en la Tabla XII, los antígenos recombinantes combinados, HspX+Rv1636, analizados de acuerdo al punto de corte de la curva ROC, estima un 100% de especificidad y 100% sensibilidad, coincidiendo con los resultados ya estudiados y aquí ensayados, de la combinación antigénica de ESAT6+CFP10. Este resultado es esperable dado que al comienzo de todo el experimento partimos de fracciones antigénicas de las cuales surgieron los antígenos recombinantes; y en éste caso los antígenos HspX y Rv1636, formaban la misma fracción 24E la cual fue seleccionada por el alto índice de estimulación de linfocitos T observado en el IDO de liberación al IFN $\gamma$  (ver tabla VIII).

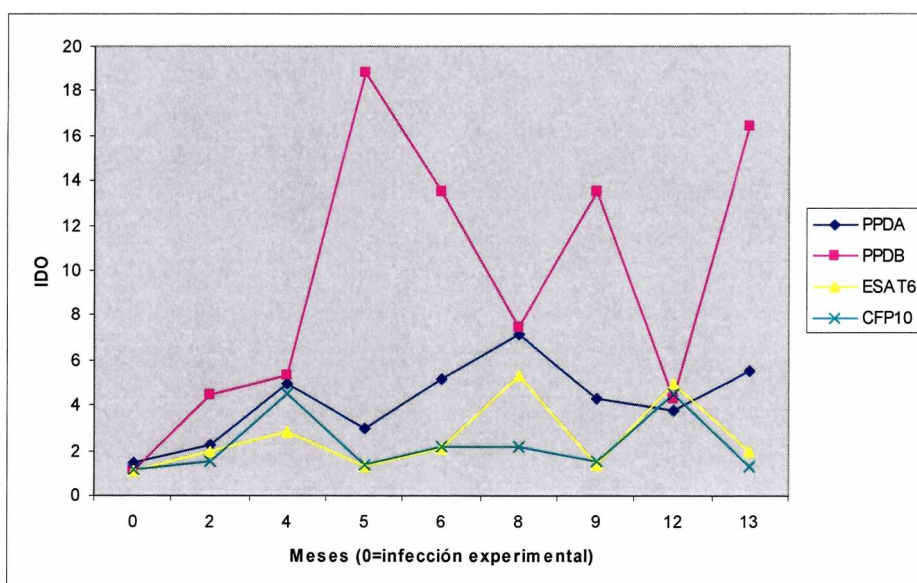
#### **12-7. Diseño experimental V: Evaluación de la respuesta inmune de los antígenos recombinantes de *M.bovis* en animales experimentalmente infectados a lo largo del tiempo**

De la infección experimental de los cuatro animales establecida a corral, la evaluación estadística de los 12 antígenos (ESAT6, CFP10, PP195, MPB70, TB10.4, TB11.5, TB16.2, PP386, MPB64, MPB59, MPB83 y P38) y DPPA, DPPB establece que hay un efecto significativo de los antígenos y del tiempo de infección ( $P < 0.0001$  para ambos). Mientras que la reactividad de DPPB va aumentando al mes 4, observándose una gran variación en el aumento del IDO, durante los meses 5, 6, 8 y 9 pos inoculación, en el resto de los antígenos se encuentran aumentos significativos respecto a niveles de pre incubación, pero estos niveles no se mantienen en el tiempo: PP386 aumentó a los dos meses pos inoculación; PP195 tendió a aumentar al cuarto mes pos inoculación; DPPA, ESAT6, MPB70, TB10.4, y TB16.2 al mes 8 pos inoculación; ESAT6 a los 12 meses pos inoculación así como también CFP10 presentó una

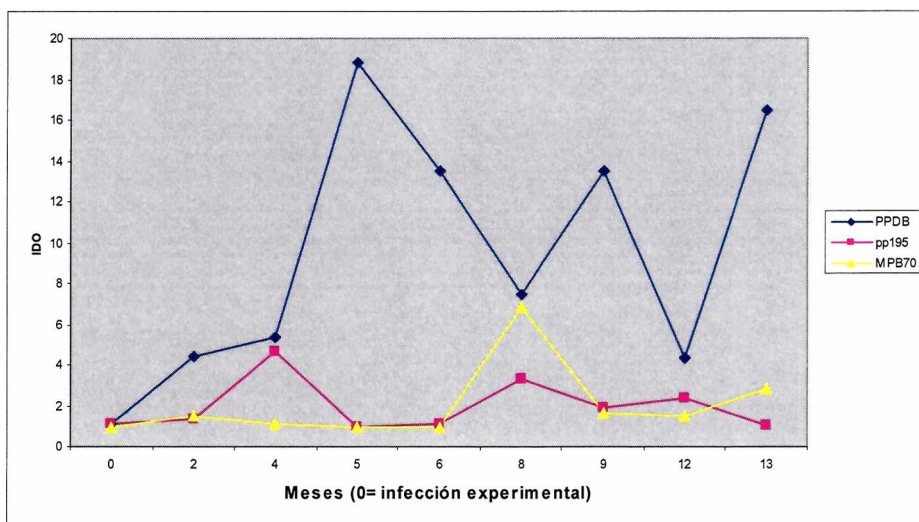
tendencia en este tiempo ( $P=0.14$ ); DPPA a los 13 meses pos inoculación. El resto de los antígenos (TB11.5, MPB64, MPB59, MPB83 y P38) no presentaron aumentos del IDO durante el período experimental. En la Figura 4 se muestran solo los antígenos que presentaron aumentos de la IDO significativos.

Al octavo mes pos-inoculación, la reactividad (IDO) de DPPB, DPPA y MPB70 fue más alta que la IDO de TB16.2, TB10.4 y ESAT6 (Figura VII). Al mismo tiempo, todas estas 6 fracciones aumentaron de forma significativa respecto al resto de los antígenos (datos no mostrados).

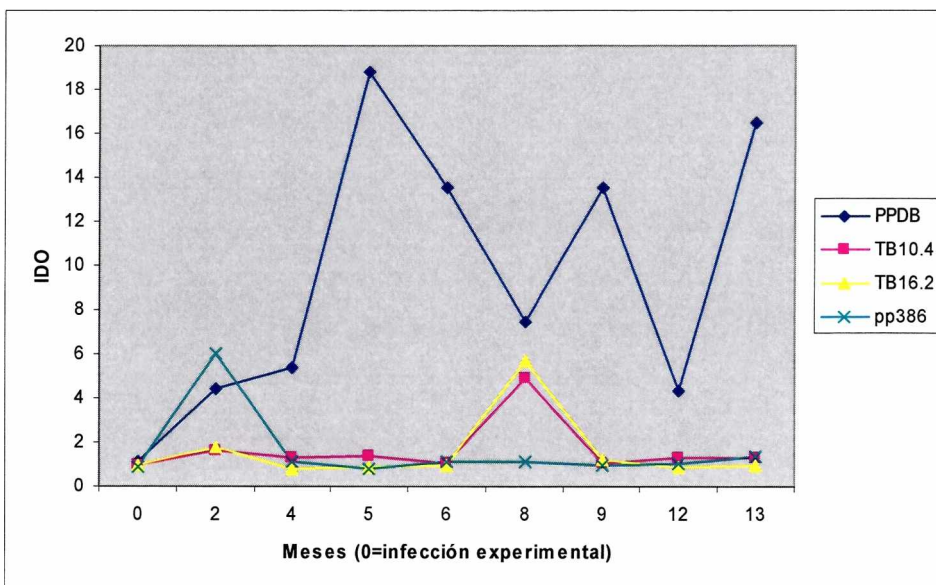
A)



B)



C)



**Figura VII.** Índice de Densidad Óptica de antígenos DPPA, DPPB, ESAT6, CFP10, pp195, MPB70, TB10.4, TB16.2, pp386 de *M. bovis* a lo largo del tiempo.

## **12-8. Diseño experimental VI: Evaluación de la respuesta inmune de los antígenos recombinantes de *M.bovis* en animales naturalmente infectados**

### **12-8-1. *Sensibilidad y especificidad de los diferentes antígenos***

En este experimento se evaluaron los antígenos recombinantes enviados por el Consorcio INCO en animales naturalmente infectados. Los resultados de este experimento fueron evaluados teniendo en cuenta el punto de corte para cada fracción obtenido por la curva ROC de manera de arrojar una especificidad del 95 % (criterio utilizado por el Laboratorio de P. Andersen, Staten Serum Institut, DK), ver Tabla X.III

*TABLA XIII.* Puntos de corte establecidos por la Curva ROC (valor de predicción según el criterio establecido por la curva ROC) y para una especificidad del 95%

Criterio establecido por la curva ROC				Especificidad 95%	
Antígenos recombinantes	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	Punto de corte	Sensibilidad
DPPA	2.37	90	87	3.04	74
DPPB	2.4	74	96	2.4	74
ESAT6	1.69	88	83	3.57	67
CFP10	1.29	98	87	1.9	84
Pp195	0.98	91	71	1.52	62
MPB70	0.81	86	67	2.53	38
TB10.4	1.26	71	90	1.54	59
TB11.5	0.99	84	71	1.82	43
TB16.2	0.78	91	50	2.7	33
TB27.4	0.76	95	33	6.7	28
Pp386	1.11	74	87	1.26	62
MPB64	0.75	83	71	1.28	48
MPB59	0.87	76	75	1.4	33
MPB83	0.96	78	79	1.62	31
P38	1.24	57	92	1.57	37
<b>Comb.1(CFP10+ESAT6)</b>	<b>2.1</b>	<b>97</b>	<b>100</b>	<b>1.13</b>	<b>100</b>
<b>Comb.2(pp195+CFP10)</b>	<b>1.47</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>1.47</b>	<b>100</b>
TPX	0.29	100	42	2.46	30

Teniendo en cuenta los puntos de corte con 95% de especificidad, los únicos que mostraron una sensibilidad del 100% fueron los dos combos. ESAT6 mostró una sensibilidad del 67% y CFP10 del 84% respectivamente. La sensibilidad de DPPA y DPPB fue del 74%. El resto de las recombinantes mostraron una sensibilidad menor. De acuerdo al punto de corte establecido según el criterio de la curva ROC para optimizar sensibilidad y especificidad: DPPA, ESAT6, CFP10, pp195, MPB70, TB11.5, TB16.2, TB27.4, Comb.1, Comb.2 y TPX muestran alta sensibilidad respecto al resto de los recombinantes; DPPA, DPPB, CFP10, TB10.4, Pp386, p38, Comb.1 y Comb.2 muestran una especificidad superior al 85%. Es interesante destacar las Comb. 1 y 2 llegan a una sensibilidad y especificidad similar con ambos criterios (ROC y 95% de especificidad), es decir que son altamente sensibles y específicos.

#### ***12-8-2. Índice de densidad óptica (liberación de IFN- $\gamma$ ) de los diferentes antígenos***

La liberación de IFN $\gamma$  estimulado por los antígenos DPPB, DPPA, ESAT6, CFP10, pp195 y por los dos combos, fue mayor en animales positivos a la prueba tuberculínica que negativos ( $P < 0.0001$ ) y un comportamiento similar se observó en TB10.4 ( $P = 0.06$ ) y TB11.5 ( $P = 0.08$ ) (ver Tabla XIV). No se observaron diferencias significativas en la liberación de IFN $\gamma$  entre los animales negativos y positivos con el resto de los antígenos (MPB70, TB16.2, TB27.4, PP386, MPB64, MPB59, MPB83, P38 y TPX).



**TABLA XIV.** Promedio ( $\pm$  SEM) de índice de densidad óptica (establecidos por la liberación de IFN $\gamma$ ) de los antígenos recombinantes en animales positivos y negativos a DPP.

Antígenos	Positivos a PPD (n=59)	Negativos a PPD (n=20)
DPPA	9,43 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	1,89 $\pm$ 1.55
DPPB	10,9 $\pm$ 0.91 <sup>ab</sup>	1,6 $\pm$ 1.55
ESAT6	12,16 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	2,01 $\pm$ 1.55
CFP10	11,56 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	1,19 $\pm$ 1.55
PP195	5,07 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	1,12 $\pm$ 1.55
MPB70	4 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	1,55 $\pm$ 1.55
TB10.4	4,48 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	1,14 $\pm$ 1.55
TB11.5	4,3 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	1,24 $\pm$ 1.55
TB16.2	3,48 $\pm$ 0.91 <sup>cd</sup>	1,53 $\pm$ 1.55
TB27.4	6,2 $\pm$ 0.91 <sup>ce</sup>	3,34 $\pm$ 1.55
PP386	2,84 $\pm$ 0.91 <sup>cf</sup>	1,06 $\pm$ 1.55
MPB64	1,76 $\pm$ 0.91 <sup>df</sup>	1,00 $\pm$ 1.55
MPB59	1,92 $\pm$ 0.91 <sup>df</sup>	1,09 $\pm$ 1.55
MPB83	2,03 $\pm$ 0.91 <sup>df</sup>	1,12 $\pm$ 1.55
P38	2,85 $\pm$ 1.17 <sup>cdi</sup>	1,14 $\pm$ 1.55
C1	12,67 $\pm$ 1.17 <sup>b</sup>	0,99 $\pm$ 1.55
C2	10,71 $\pm$ 1.73 <sup>ab</sup>	1,06 $\pm$ 1.55
TPX	3,47 $\pm$ 0.94 <sup>cf</sup>	1,81 $\pm$ 1.55

Valores con superíndices con diferentes letras dentro de la misma columna indican una diferencia significativa de  $P < 0.05$

La liberación de IFN $\gamma$  en animales positivos a DPP, no difirió entre los antígenos MPB64, MPB59, MPB83, que tuvieron menor IDO que PP195, MPB70, TB10.4, TB11.5, TB16.2, TB27.4, PP386, P38 y TPX. Estos a su vez tuvieron menor IDO que DPPA, DPPB, ESAT6, CFP10, comb. 1 y comb. 2. El grado de antigenicidad de ESAT6 y CFP10, que además son los que componen el comb. 1, fue mayor que DPPB y DPPA.

No se encontraron diferencias en la IDO de animales negativos a DPP entre todas las fracciones.

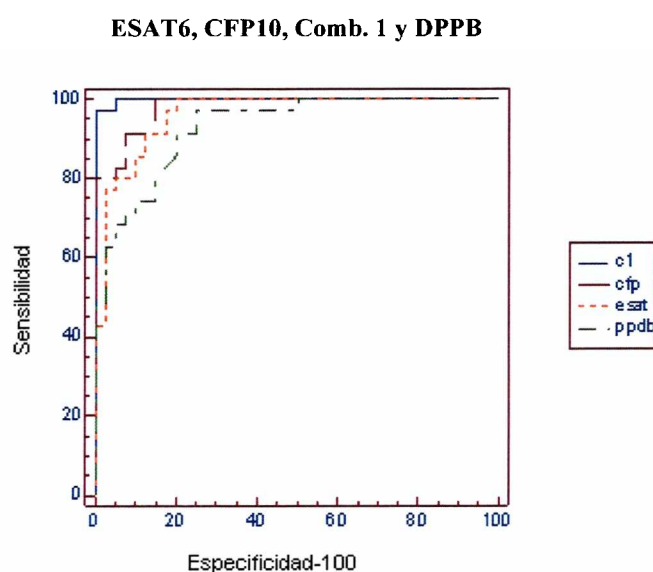
Si tomamos un valor de 2 de IDO como punto de corte en el estudio basado en inmunidad celular (liberación de IFN $\gamma$ ), podemos observar que para 59 animales positivos a la prueba tuberculínica, 13 animales tuvieron IDO menor a 2 para DPPB. De estos mismos 13 animales los antígenos que mostraron IDO mayor a 2 fueron: ESAT6 y CFP10 en 10 animales, Comb. 1 en 8 animales, TB 27.4 en 5 animales, pp195 y MPB70 en 3 animales, MPB83 en 2 animales, pp386, MPB64, TB10.4, MPB59, TB16.2 y p38 en un solo animal.

Siguiendo el razonamiento anterior pero para el caso de los 20 animales tuberculino negativos, 4 animales mostraron IDO mayor a 2 para DPPB, de éstos 4 animales, 3 fueron positivos a DPPA, TB16.2, TB27.4, un animal en el caso de ESAT6, TPX, MPB 70 y TB11.5.

De los 20 animales DPP negativos, hubieron antígenos que reaccionaron con valores mayores a 2 de IDO, éstos fueron TB27.4 (9/20), TB16.2 y ESAT-6 (5/20), MPB70 y TPX (3/20), CFP10 (2/20), TB10.4, TB11.5, MPB64, MPB59, MPB83, p38 (1/20), pp195 y pp386 no reaccionaron.

Como podemos observar en figura VIII, la combinación de los dos antígenos manifestó mejor sensibilidad y especificidad que cada uno por separado y a su vez estos mejor que DPPB. Estos

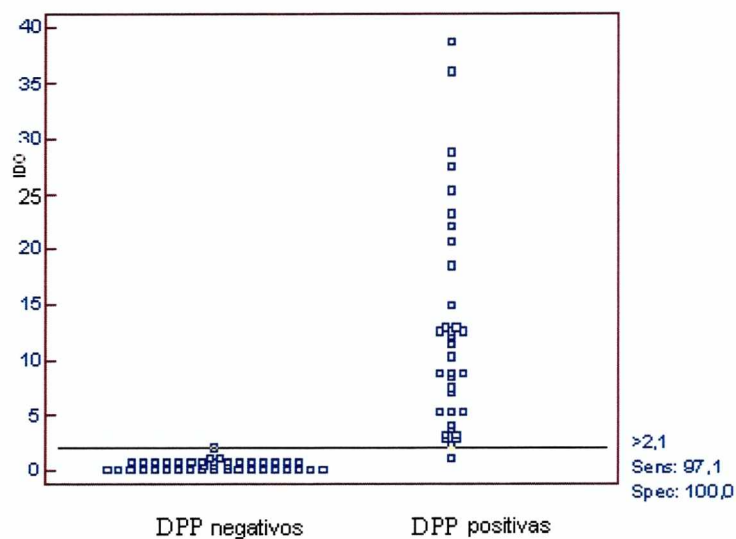
valores tan notables respecto a la eficiencia de la comb. 1 en detectar animales infectados con la prueba de IFN $\gamma$ , fue obtenida de 59 animales de establecimientos con 35% de prevalencia de la enfermedad, y de 20 animales de un establecimiento libre de enfermedad.



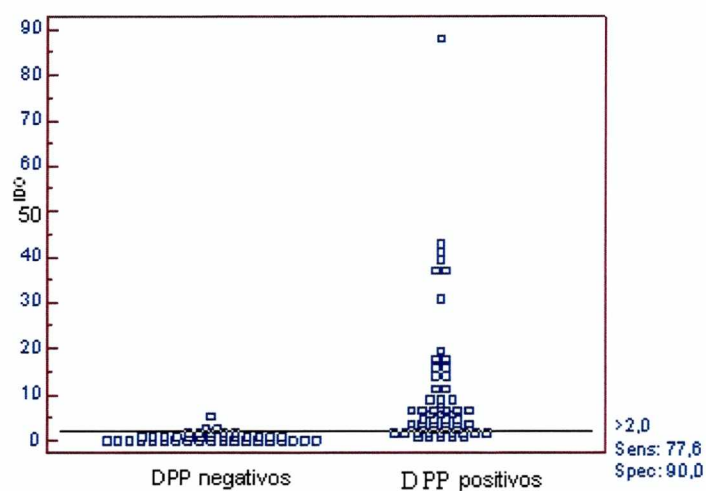
**Figura VIII.** Sensibilidad y especificidad (según el Índice de Densidad Óptica), de antígenos DPPB, ESAT6, CFP10 y comb.1 de *M. bovis* en un grupo de animales.

Para estos mismos animales podemos observar un Gráfico de puntos en la figura IX (obtenidos del programa *MedCalc*), donde cada punto representa un animal. El programa determina un valor de IDO como punto de corte, para la Comb.1 de 2,1 y para DPPB de 2, comparando valores de sensibilidad y especificidad (97 y 100) para la comb. 1 y (78 y 90) para el DPPB.

**A) Comb. 1 (Esat-6+Cfp-10)**



**B) DPPB**



**Figura IX.** Sensibilidad y especificidad, determinado por el punto de corte estimado por la curva ROC, del Comb.1 (A) y DPPB (B) de animales negativos y positivos a la prueba de tuberculina (DPP).

**12-9. Diseño experimental VII: Evaluación de la respuesta inmune de un antígeno recombinante y 3 combinaciones en animales naturalmente infectados en diferentes regiones**

***Índice de densidad óptica (liberación de IFN- $\gamma$ ) de los diferentes combos***

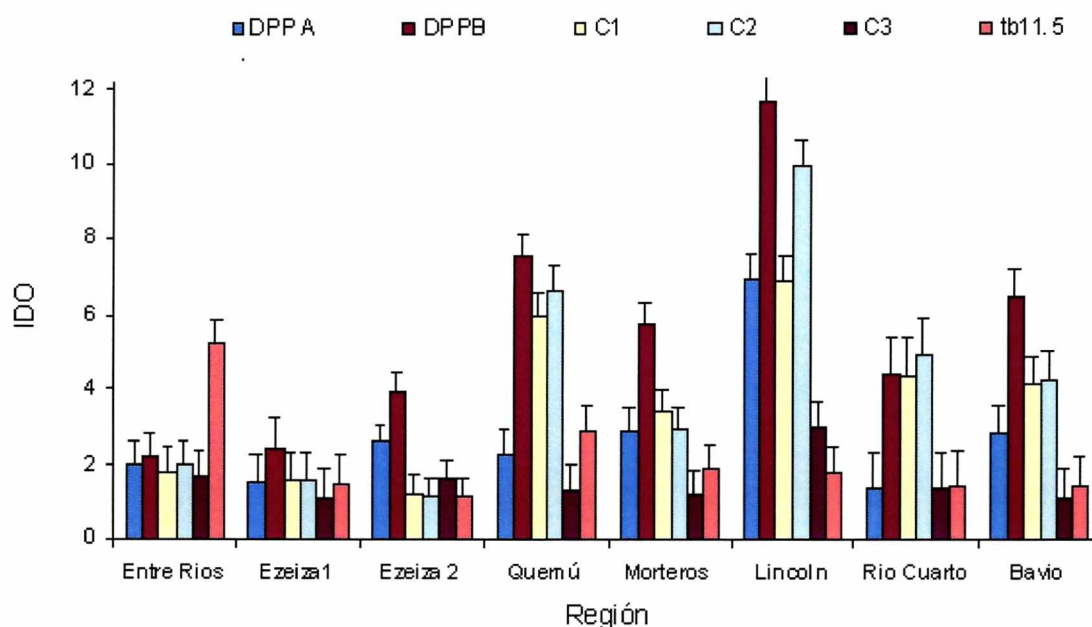
La liberación de IFN $\gamma$  en DPPB, DPPA, Comb. 1 y 2 fue mayor en animales positivos que negativos ( $P < 0.0001$ ). No se observaron diferencias significativas en la liberación de IFN $\gamma$  entre los animales negativos y positivos con la comb. 3 y tb11.5. La liberación de IFN $\gamma$  en animales positivos a DPP no difirió entre la comb. 3 y TB11.5, y estos tuvieron menor IDO que DPPA, DPPB, comb. 1 y comb. 2 (ver Tabla XV). No se encontraron diferencias en el IDO de animales negativos a DPP entre todas las fracciones.

**TABLA XV.** Promedio ( $\pm$  SEM) de IDO (establecidos por la liberación de IFN $\gamma$ ) de los antígenos recombinantes y de las Combinaciones en animales positivos y negativos a DPP.

Antígenos	Positivos a PPD (n=247)	Negativos a PPD (n=44)
DPPA	2.92 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.24 $\pm$ 0.59
DPPB	5.57 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	1.23 $\pm$ 0.59
Comb.1	3.43 $\pm$ 0.24 <sup>ac</sup>	0.83 $\pm$ 0.59
Comb.2	3.92 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	0.89 $\pm$ 0.59
Comb.3	1.58 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	0.98 $\pm$ 0.59
TB11.5	2.16 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>	1.27 $\pm$ 0.59

Valores con superíndices con diferentes letras dentro de la misma columna indican una diferencia significativa de  $P < 0.05$ .

Se encontró un efecto significativo de los establecimientos, antígenos (DPPA, DPPB, TB11.5, comb. 1, 2 y 3); de la interacción entre ambos ( $P < 0.0001$  para los tres efectos). En la Figura X, se muestra la reactividad de los antígenos en distintos establecimientos. La antigenicidad de DPPB, Comb. 1 y 2 fueron mayores en los establecimientos de Quemú-Quemú y Lincoln. Comb. 3 y TB11.5 tuvieron menor antigenicidad que DPPA, DPPB, comb. 1 y comb. 2 en casi todos los establecimientos. El resultado obtenido del establecimiento de La Paz (Entre Ríos) se destacó la reactividad de TB11.5, mientras que en Ezeiza 1 no se encontraron diferencias en las IDO de los diferentes antígenos y Combinaciones.



**Figura X.** Índice de Densidad Óptica de antígenos (DPPA, DPPB, TB11.5) y Comb. (1, 2 y 3) de *M.bovis* en diferentes establecimientos (animales con reacción positiva a DPP).

Se pudo observar que los resultados obtenidos por la curva ROC (n= 247 positivos, 44 negativos), (ver TABLA XVI) la comb. 2 mostró resultados similares respecto a la especificidad que el PPDB, pero la sensibilidad fue mayor en éste ultimo. La comb. 1 fue menos específica y más sensible que la comb. 2, lo mismo se observó con la comb. 3 y TB11.5. Para una especificidad del 95% la sensibilidad de la Comb. 2 fue mayor que para el resto de los antígenos y combinaciones.

*TABLA XVI.* Sensibilidad y especificidad obtenidas de las combinaciones, en animales positivos y negativos a la prueba intradérmica (DPP), con diferente efecto según el punto de corte para la curva ROC (valor de predicción según el criterio establecido por la curva ROC) y para una especificidad del 95%.

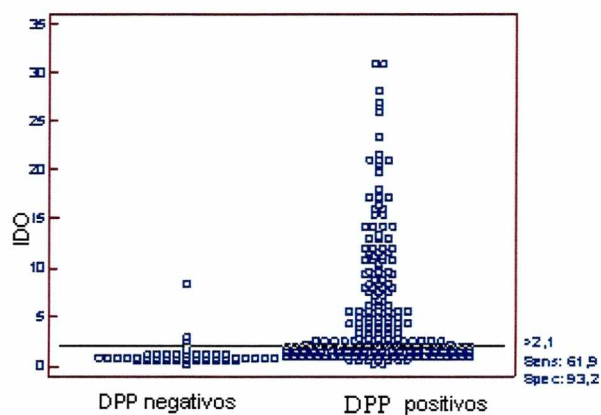
**Criterio establecido por la curva ROC**

**Especificidad 95%**

Antígenos	ABC (área bajo la curva)	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Punto de corte	Sensibilidad (%)
DPPA	0.78	1.3	75	68	2.8	25
DPPB	0.9	1.4	81	91	2.6	51
Comb.1	0.86	1.01	78	82	1.5	52
<b>Comb.2</b>	<b>0.84</b>	<b>1.21</b>	<b>69</b>	<b>93</b>	<b>1.2</b>	<b>66</b>
Comb.3	0.69	0.95	72	59	2.3	10.5
Tb11.5	0.64	1.43	44.5	82	2.5	19

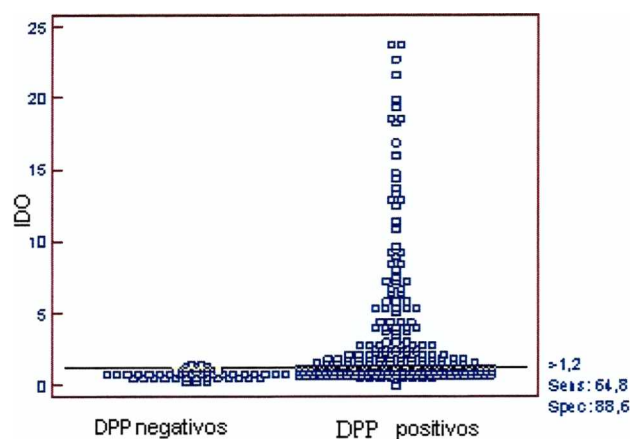
Se realizó un Análisis comparativo de las Combinaciones 1 y 2 respecto a DPPB, en 247 animales DPP positivos y 44 animales DPP negativos en 10 establecimientos distintos, con una incidencia de la enfermedad diferente en cada establecimiento (figura X). Los valores de sensibilidad y especificidad para DPPB fueron de 81 y 90%, para la Comb. 1 fueron de 78 y 82%, y para la comb. 2 fueron de 69 y 93% respectivamente.

A)

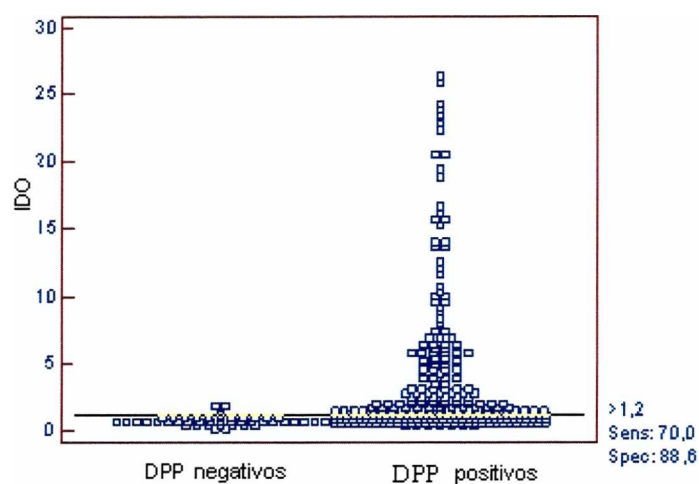
**DPPB**



**B) Combinación 1**



**C) Combinación 2**



**Figura XI.** Distribución de los valores del IDO, y en el índice inferior derecho se observan los valores de Sensibilidad y especificidad, determinado por el punto de corte estimado por la curva ROC, del DPPB (A) Comb.1 (B) y Comb.2 (C) de animales negativos y positivos a la prueba de tuberculina (PPD) de 10 establecimientos diferentes.

## 12-10. Diseño experimental VIII: Evaluación de diferentes técnicas diagnósticas en 14 animales naturalmente infectados

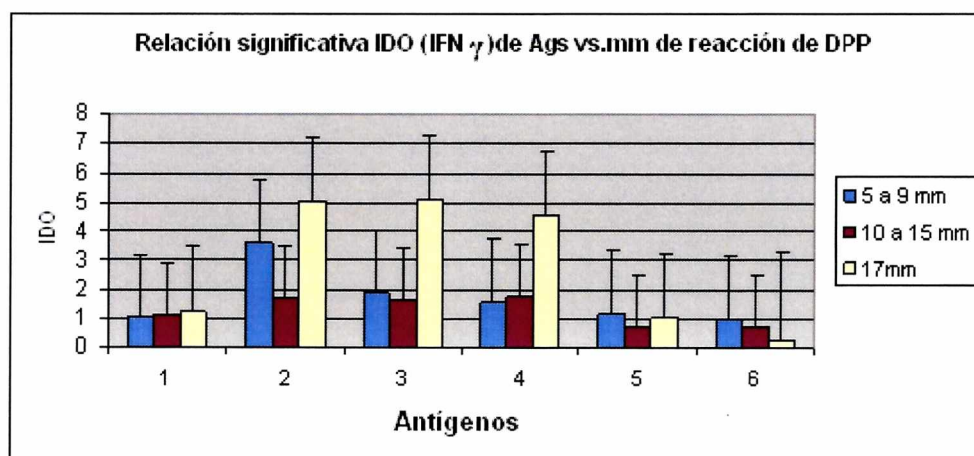
De un establecimiento de la provincia de Córdoba trabajamos con 14 animales, se realizaron diferentes pruebas diagnósticas de tuberculosis, obteniendo muestras de diferentes órganos, a partir de las cuales se intentó el cultivo de *M. bovis*. Se recolectaron 14 muestras de sangre, y se determinó la liberación de IFN $\gamma$  por linfocitos estimulados con diferentes antígenos (las tres combinaciones, TB11.5, DPPA y DPPB) (ver tabla XVII). El control (PWM) de estimulación de linfocitos T en un animal fue muy bajo, por lo que decidimos no considerarlo para comparar el IDO en la liberación de IFN $\gamma$ .

TABLA XVII. IDO obtenido de la sangre entera enfrentada a los diferentes antígenos de *M. bovis*, de los 14 animales positivos a la prueba intradérmica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DPPa	0,17	0,55	2,57	2,74	0,96	1,10	2,26	0,99	1,55	0,87	1,34	1,46	1,12	1,15
DPPb	0,36	1,34	5,36	17,18	4,30	2,92	9,65	1,96	6,88	1,48	2,31	5,06	1,32	1,09
PBS	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PWM	0,59	4,02	14,65	22,01	10,97	12,37	10,49	7,14	13,36	3,28	12,43	10,67	5,27	4,45
Comb. 1	0,89	2,74	2,29	21,61	1,98	1,77	9,24	1,98	6,73	1,25	1,84	5,39	1,82	1,29
Comb. 2	2,10	3,15	10,03	20,49	1,78	1,41	6,96	2,43	7,49	1,08	2,02	5,88	2,23	1,43
Comb. 3	0,89	3,29	1,68	2,55	1,73	0,67	1,07	1,18	1,27	0,25	0,90	0,83	1,02	1,39
Comb. 4	0,20	4,63	2,67	2,92	1,02	1,00	1,10	0,73	1,06	0,44	0,84	0,73	0,88	1,58

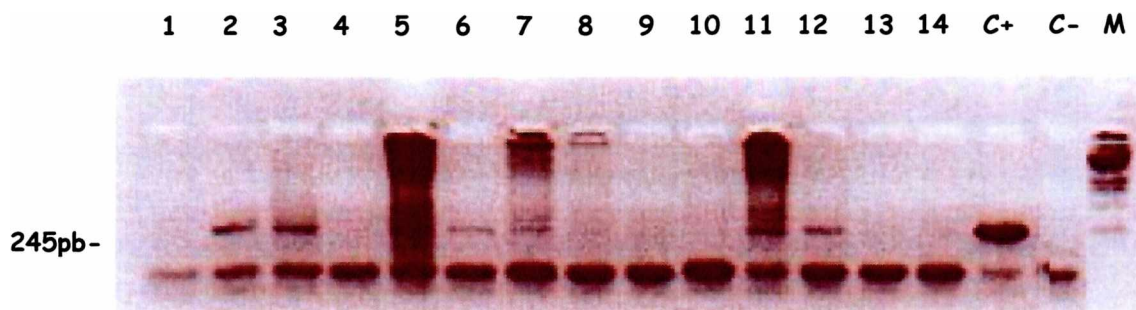
\*En color amarillo marcamos el IDO mayor al punto de corte establecido por la curva ROC.

Se cuantificó la liberación de IFN $\gamma$  por linfocitos sensibilizados por estimulación antigénica con DPP bovino, DPP avium y diferentes antígenos de *M. bovis* y se los relacionó con los mm medidos luego de la realización de la tuberculina (Fig. XII).



**Figura XII.** Relación del IDO de los diferentes antígenos (1-DPPA, 2-DPPB, 3-Comb.1, 4-Comb.2, 5-Comb. 3, 6-TB11.5) respecto a los mm medidos al momento de la lectura de la tuberculina.

Se obtuvieron hisopado nasal de los 14 animales individuales, para la realización de PCR. Se amplificó la secuencia de inserción IS6110 con los cebadores descritos por Hermans y col., 1991, generando un producto de amplificación de 245pb (Fig. XIII).



*Figura XIII. Reacción de PCR-IS6110 de las muestras de hisopado nasal de los 14 animales DPP positivos*

En la faena, fueron tomadas muestras de órganos que presentaron lesiones macroscópicas compatibles con TBC, confirmadas bacteriológicamente por cultivo (Fig. XIV).



*Figura XIV. Lesión macroscópica compatible con tuberculosis en pulmón.*

Una tabla resumen muestra los resultados de las diferentes pruebas diagnósticas realizadas a los 14 animales, y el lugar donde se encontraron las lesiones (tabla XVIII).

*Tabla XVIII.* Comparación de los resultados obtenidos con las diferentes pruebas diagnósticas de tuberculosis bovina

	Nº animal	IDR (PPD)		Cultivos	PCR		IFN gamma (IDG)					lesiones
		mm 27/08/03	mm 21/12/2003		cultivo de lesiones	hisopado nasal	PPDB 27/08/03	PPDA 27/08/03	ESAT+CFP10 27/08/03	PPDB 21/12/2003	PPDA 21/12/2003	
1	6599	17	15	+	+	+	0,36	0,17	0,89	2,93	1,84	Gl, Hg
2	6557	17,5	9	-	+	-	1,34	0,55	2,74	12,64	2,13	TRS, TRI
3	9058	24	9	+	ND	-	5,36	2,57	2,29			LM
4	8594	5	10	+	+	-	17,18	2,74	21,61	19,26	2,72	Gl, TRI
5	8208	8	9	-	ND	+	4,300	0,961	1,976	3,84	1,60	GL, TRI, LM, Hg, gener
6	6627	9	0	+	+	+	2,924	1,101	1,773	2,80	0,88	TRS
7	6581	17	7	+	ND	+	9,65	2,26	9,24	8,43	1,04	TRS
8	6567	11	9	-	ND	-	1,96	0,99	1,98	2,29	0,70	TRS, TRI, LM
9	8704	7	10	+	+	-	6,88	1,55	6,73	13,57	3,77	TRS, TRI, LM
10	8784	11	10	+	+	+	1,48	0,87	1,25	2,11	1,29	TRS, TRI, LM
11	9036	14	9	+	ND	+	2,31	1,34	1,84	16,26	3,09	TRI
12	8964	17	16	+	ND	-	5,06	1,46	5,39			TRI
13	8794	15	8	-	ND	+	1,32	1,12	1,82	4,21	1,02	TRS cal
14	9064	17	6	+	+	-	1,09	1,15	1,29	2,30	1,02	LM cal

TRS: tracto respiratorio superior, Gl: ganglios linfáticos (retrofaríngeos medios y laterales, parotídeos y submaxilares), TRS: tracto respiratorio superior, TRI: tracto respiratorio inferior (tráquea, pulmones), LM: linfonódulos mesentéricos, HIG: Hígado, GENER: lesiones generalizadas.

Observamos un decrecimiento en el tamaño de reacción de DPP, de 13,5mm en promedio (5-24) a 9mm (0-16). Un solo animal resultó negativo a DPP (Nº 6627) cuando se realizó la IDR por

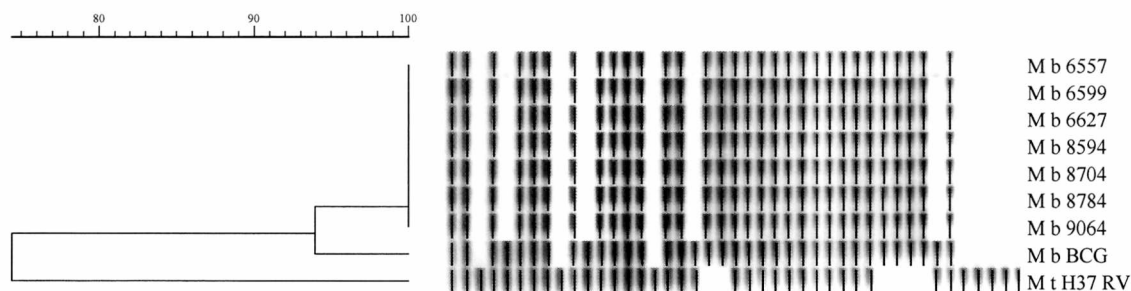
segunda vez a los cuatro meses.

En la primera prueba de IFN $\gamma$  10 animales resultaron positivos a DPPB, y para ESAT6/CFP10 fueron 13 los que reaccionaron. Aumentó la reactividad (IDO mayor a 1.4) en 8/14 animales. En 3 animales la reacción del IDO decreció.

En cuanto a la realización de PCR de muestras obtenidas de mucosa nasal, 7/14 fueron positivas, mostrando el alto número de animales que excretan el bacilo.

Luego de 8 meses se sacrificaron los animales. De la realización del cultivo de órganos, 11/14 crecieron en el medio de cultivo para *M. bovis*. Dos de los 3 animales que habían sido negativos la primera vez a la prueba de IFN $\gamma$ , tuvieron cultivos negativos.

Los aislamientos fueron tipificados por la técnica de *Spoligotyping* según lo descrito por Kamerbeek y col., 1997. La imagen fue analizada con el programa Gel Compar, Applied Math, Bélgica (Fig.XV).



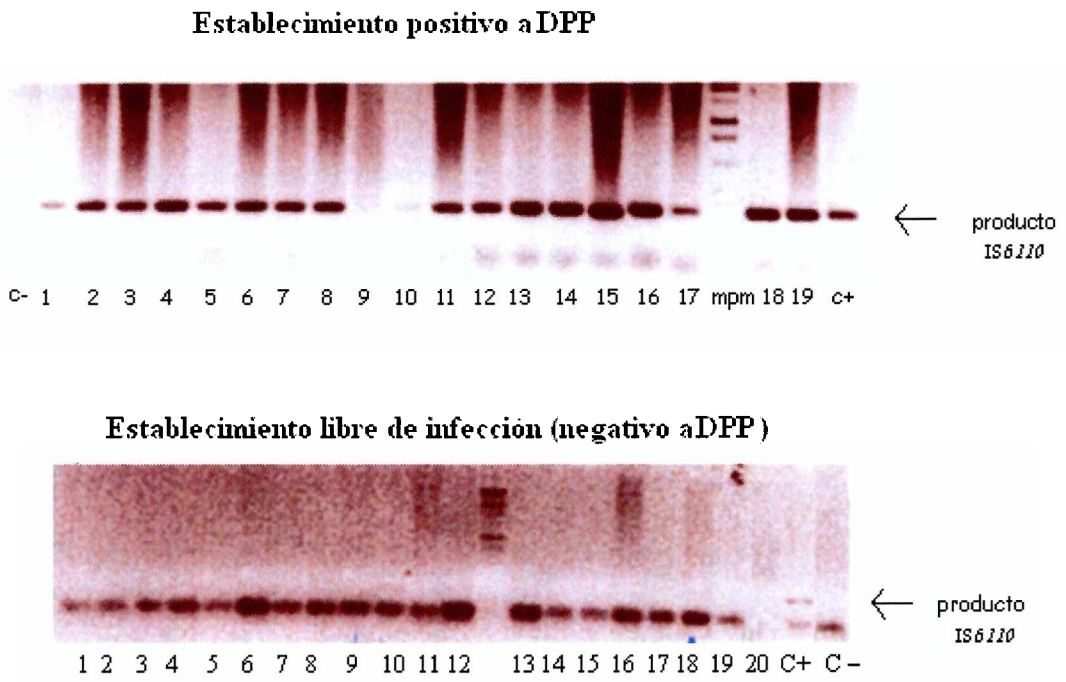
**Figura XV.** Dendrograma que muestra la relación de los patrones de *Spoligotyping* de los aislamientos tipificados y de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.

### **12-11. PCR de muestras de hisopados nasales**

Los cuatro hisopados nasales obtenidos de los animales experimentalmente infectados, resultaron positivos por PCR, y los dos hisopados nasales de los controles negativos mostraron resultado negativo a la misma técnica. (figura no mostrada).

De los 39 animales positivos a la prueba tuberculínica, 37 fueron positivos por PCR y 2 negativos. La observación como positivo, se define por la banda de amplificación específica de 245pb tal como el control positivo (C+). La figura XVI A) corresponde a un establecimiento de animales DPP positivos.

De las muestras de hisopado nasal de 20 animales DPP negativos, obtenidas de un establecimiento libre de infección, podemos observar en la figura XVI B), que todos los animales resultaron negativos a la prueba de PCR.

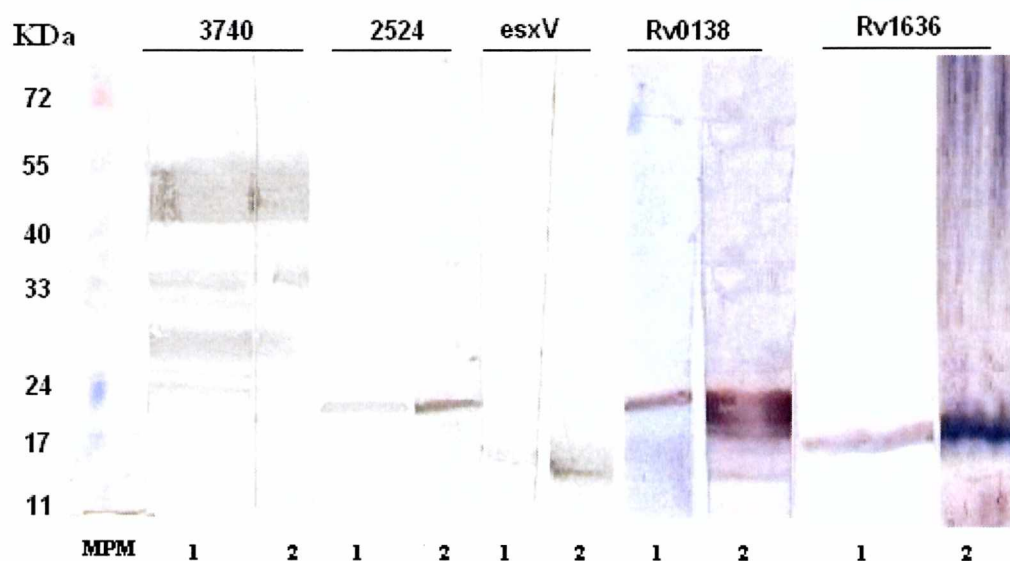


**Figura XVI.** Reacción de PCR en hisopado nasal de animales DPP positivos (A) y animales de un establecimiento libre de la enfermedad (DPP negativo) (B).



## 12-12. Obtención de anticuerpos policlonales

Se obtuvieron los anticuerpos policlonales en los ratones BALB/C, de cada proteína recombinante, confirmadas por Western-blot. Se sembró cada uno de los antígenos recombinantes purificados (SDS-PAGE), se realizó electroforesis y a la membrana de nitrocelulosa se la enfrentó a cada anticuerpo monoclonal antihistidina, y la segunda calle contra el suero policlonal de la proteína correspondiente. Corroborando así la obtención de los mismos (figura XVII).



**Figura XVII.** Western-blot de las proteínas recombinantes Rv1636 (16Kda), Rv0138(19Kda), Rv3740 (50Kda), Rv2524c (33Kda), EsxV (10Kda), enfrentadas con el anticuerpol correspondiente. 1- anti-HIS; 2-anti-RATÓN.

## **Discusión**

### 13. Discusión

La única prueba oficial para el diagnóstico de *M. bovis* en nuestro país y en la mayor parte de los países del mundo, es la prueba de la tuberculina que como se mencionó anteriormente en esta tesis, es una prueba potencialmente inespecífica ya que al estar compuesta por muchos antígenos no definidos, puede reaccionar frente a otras micobacterias no tuberculosas (MNT). De ahí surge que el objetivo de este trabajo fuese identificar y evaluar nuevos antígenos proteicos, útiles para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

En la primera etapa, se seleccionaron las fracciones antigénicas estimulantes de la respuesta T, para luego resolver estas fracciones hasta encontrar las proteínas que componen a las mismas. Las técnicas empleadas en este proceso fueron electroelución, para la separación de las proteínas, electroforesis en 2D para su aislamiento, y espectrofotometría de masas (MALDI-TOF) para su identificación.

Los primeros trabajos realizados de electroelución de geles SDS-PAGE, fueron aquellos de Gulle et al. (1990) (281), que separaron antígenos solubles. Andersen y Heron (1993) identificaron antígenos de *M. tuberculosis* relacionados con una respuesta a células T de memoria (282). Pollock et al. (1997), obtuvieron fracciones partiendo de sobrenadante de cultivos de *M. bovis* (277). En estos trabajos el énfasis se ponía en las proteínas secretadas, ya que a éstas se las consideraba como las únicas proteínas que estimulaban la respuesta inmune y que indicaban una respuesta protectora. Es así, que por el método de electroelución propuesto por Andersen (1997), obtuvimos 30 fracciones del sobrenadante y 30 fracciones del extracto del cultivo de *M. bovis*, observando una alta resolución de las proteínas (283). Obtuvimos estas fracciones acotadas a un rango de peso molecular por PAGE-SDS; esta metodología es de suma utilidad porque cada

fracción se circunscribe a un número limitado de manchas. Analizamos inmunológicamente cada una de estas fracciones y logramos identificar proteínas del extracto y del sobrenadante. Del mismo modo Weldingh et al. (1999) usando como agente infeccioso *M. tuberculosis* evaluado en ratones, identificaron nuevas proteínas partiendo de fracciones agrupadas en tres regiones de diferente peso molecular, del filtrado del cultivo celular de *M. tuberculosis*. Observaron mayor índice de liberación de IFN $\gamma$  en las fracciones de bajo y medio peso molecular. Identificaron por electroforesis en 2D a ESAT- 6 (9.8kDa) en el primer grupo y al complejo Ag85 (31kDa) en el segundo (284).

Luego de obtener las fracciones, se investigó cuales de esas bandas tenían la mayor antigenicidad en bovinos infectados con *M. bovis*; éstas fueron posteriormente identificadas. Alito et al. (2003), obtuvieron fracciones proteicas de extracto y del sobrenadante del cultivo de *M. bovis*, utilizando cromatografía de intercambio iónico. Estos autores realizaron ensayos de linfoproliferación de linfocitos de bovinos infectados experimentalmente e identificaron proteínas antigénicas por electroforesis en 2-dimensiones (IEF) (285). En cambio en nuestro trabajo, los índices de estimulación de las fracciones y de los antígenos, fueron evaluados mediante la prueba de detección de IFN $\gamma$  liberado por linfocitos T, siendo ésta una técnica menos laboriosa, obteniéndose el resultado en menor tiempo y con la posibilidad de poder ser utilizada en laboratorios de menor complejidad. Es decir, si bien el costo de ambas metodologías es alto, su simplicidad hace al IFN $\gamma$  posible de ser utilizado por los veterinarios de campo en caso de ser requerido.

Como se describió anteriormente, para el estudio de la liberación de IFN- $\gamma$ , las 30 fracciones originales del sobrenadante y las 30 originales del extracto se resolvieron en 13 y 15 fracciones respectivamente (tabla V

I). Se pudieron observar diferencias en la respuesta de cada animal para cada una de las fracciones, al igual que Fifis y Pollock (286-277). Resultados similares fueron informados por Andersen et al. (1992) con antígenos de *M. tuberculosis*, por estimulación de linfocitos T en ratones (183). La mayoría de éstas investigaciones evaluaron la totalidad de las proteínas secretadas, a diferencia de ellos, en este trabajo se realizó una selección de fracciones, partiendo del extracto y del sobrenadante de cultivo. En nuestro caso se observó que las fracciones del sobrenadante en su mayoría, estimularon las células T produciendo alto índice en la liberación de IFN $\gamma$ ; en cambio dos de las fracciones del extracto de bajo peso molecular tuvieron alto IDO. Mientras que en el trabajo de Pollock (277), solo las fracciones del sobrenadante de bajo peso molecular estimulan la liberación de IFN $\gamma$  en el primer tiempo pos inoculación. El criterio de selección de las fracciones antigénicas fue: **14E** con una respuesta similar a la DPPB respecto a la liberación de IFN $\gamma$ , **7S** similar a la DPPA y **4S**, fracción sugerida por el Laboratorio de Veterinary Sciences Division, Queén, Belfast. Se identificaron nuevos antígenos originados de estas fracciones, los que fueron clonados, expresados y utilizados posteriormente en animales naturalmente infectados (diseño experimental III).

La fracción 24 original del extracto, que junto a la fracción 25 formó la fracción unida **14E**, fue evaluada en 4 animales experimentalmente infectados junto a DPPB, DPPA y a los antígenos ESAT6 y CFP10, a lo largo del tiempo hasta 8 meses posinoculación (diseño experimental II). Paralelamente se incluyeron otras dos fracciones originales de extracto 27E y 28E. Se observaron importantes diferencias individuales de respuesta inmune en los cuatro animales infectados (ver errores estándares en la Figura III). Algunos antígenos se comportaron como inmunodominantes durante el transcurso de la experimentación: DPPB y

DPPA presentaron un aumento importante de la liberación de IFN $\gamma$  al primer mes postinoculación, mientras que ESAT-6 aumentó a los 8 meses pos-inoculación. Pollock et al. (1997) encontró que ESAT-6 provocó altos niveles de liberación de IFN $\gamma$  a las 10 semanas postinoculación, pero estos autores utilizaron células mononucleares de sangre periférica bovina. Los mismos autores en animales naturalmente infectados encontraron alta correlación entre ESAT-6 y DPPB, confirmando que ESAT-6 era reconocido por poblaciones heterogéneas de bovinos infectados con *M. bovis* (290). De las fracciones seleccionadas en este estudio, la **24E** (Figura III) aumentó a los 8 meses pos inoculación conjuntamente con ESAT-6, no así otras fracciones seleccionadas como la 27E y 28E que presentaron niveles basales de la liberación de IFN $\gamma$ . Los 4 animales a los que inoculamos, fueron sacrificados a los 13 meses pos infección, durante la inspección pos mortem no observamos lesiones macroscópicas, en ninguno de los cuatro animales. Pollock et al. (1997) observaron lesiones en 11 de 19 animales en la examinación pos-mortem, indicando el alto índice de infección y patogenicidad (290). Un estudio realizado en ratones (287) describe que la dosis de infección debe ser mayor en países como Brasil y México ( $10^5$ - $10^6$  UFC) que en los países Europeos o en USA (50-200 bacterias), ya que el medio ambiente (agua de bebida, comida, suelo, etc.) determina una abundancia de MNT que generan una resistencia inmune innata en el organismo de cada individuo. Creemos que el hecho de no observar lesiones macroscópicas, podría deberse a la baja virulencia de la cepa con la que se inoculó (corroborado posteriormente en ratones), y/o al grado de respuesta inmune innato del propio animal, que provocaría una resistencia natural a la infección por *M. bovis* en los animales. El cambio de perfil de respuesta antigénica podría reflejar el progreso de la enfermedad en cada animal infectado.

Aplicando la técnica de electroelución se identificaron las siguientes proteínas EsxV, Rv0138, Rv3740, Rv1636, Rv2524 y HspX, logrando así el primer objetivo de esta tesis que fue caracterizar proteínas antigénicas que estimularan la respuesta inmune celular en el bovino. El grado de similitud de estas proteínas encontrada en *M. bovis* con genes homólogos en el genoma de *M. avium* fue la siguiente: Rv1636 (95%), EsxV (91%), Rv3740 (78%), Rv2524 (86%), Rv0138 (86%), HspX (43%), respectivamente (Tabla IX). Como se observa, todas estas proteínas tienen un alto grado de conservación, a excepción de HspX.

En el siguiente paso de esta tesis, se evaluaron los antígenos recombinantes en animales naturalmente infectados, con el método de detección del IFN $\gamma$ . Como se puede observar en la tabla VII, según el punto de corte establecido por la curva ROC, determinando valores de sensibilidad y especificidad respecto a la prueba tuberculínica, PPDB demostró ser más sensible y específico que el resto de los antígenos (comportamiento que será discutido mas adelante en objetivo 2). De acuerdo a este punto de corte observamos que varias de las proteínas halladas no mostraron alta antigenicidad. Si bien sabemos que al aumentar la especificidad bajamos la sensibilidad y viceversa y teniendo en cuenta el punto de corte para una especificidad del 95%, podemos observar que Rv3740 y EsxV son los que tienen una sensibilidad mayor respecto al resto de los antígenos. De las 5 proteínas probadas (Rv1636, Rv0138, Rv2524c, EsxV y Rv3740), la única que demostró tener un valor significativamente mas alto que el resto de las proteínas, fue EsxV (tablaXI). Podemos sugerir que EsxV al formar parte de la familia ESAT-6 (288), puede ser un antígeno interesante al momento de evaluar antígenos. Proponemos la utilización de ésta proteína como proteína complementaria

en el diagnóstico de la tuberculosis basándonos en su alta especificidad. El resto de los antígenos utilizados en forma individual, no estimuló la producción de altos niveles de liberación de IFN $\gamma$ . Nosotros no esperábamos que todos fuesen antigénicos.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del sistema para estudiar estos nuevos antígenos (diseño experimental IV), se reemplazó la sangre entera por células mononucleares de sangre periférica. Se evaluaron los antígenos individuales y combinados. En el caso de HspX y Rv1636 (componentes de la fracción 24E), pudimos observar una sinergia que conduce a un aumento de respuesta en todos los animales DPP positivos y dieron negativo en los animales DPP negativos (Tabla XII). Los resultados fueron semejantes a los obtenidos con ESAT6 y CFP10 en ese mismo experimento. Es la conclusión de muchos investigadores, que si bien en forma individual los epitopes de cada antígeno pueden ser reconocidos por las células T, la suma de los distintos epitopes aumenta la sensibilidad del ensayo al estimular mas clones T. Respecto a este punto, recientemente se ha publicado un trabajo diagnosticando infección temprana en recién nacidos con ESAT-6 y CFP-10 (289). La proteína HspX se encuentra también en *M. bovis* BCG donde se localiza en la pared celular y se la ha descrito que cumple una función de chaperona. En un trabajo realizado por Desjardín et al. (2001) (290), en el que trabajaron en la inducción microaerófila de la proteína chaperona, homóloga a la alfa cristalina (HspX) de *M. tuberculosis*, observaron que niveles de proteína son detectados en cultivos que crecen a una muy baja concentración de oxígeno. Nuestros resultados muestran que es necesaria la unión de las dos proteínas (HspX y Rv1636), para que se observe un aumento importante en el índice de liberación de IFN $\gamma$ , mostrando una sensibilidad y especificidad óptima (Tabla XII), aunque estos resultados son preliminares ya que se trabajó con un bajo



número de animales. Cunningham et al. (1998) observaron un engrosamiento marcado en la capa externa de la pared celular, cuando se cultiva la micobacteria en anaerobiosis durante varios meses, sugiriendo que la proteína HspX, está asociada a mantener la integridad estructural de la célula (186). Rosenkrands et al. (2002), estudiaron la proteína HspX aislada en 2D, de cultivos de *M. tuberculosis* colocados en diferentes concentraciones de oxígeno: con un 5% de oxígeno se observaron 8 manchas diferenciales y con 10% de oxígeno 5 manchas en geles de 2D (291). Un trabajo realizado por Valdez et al.(2002), en el cual se determinó que el 85% de los pacientes con tuberculosis activa, mostraba reacción positiva a éste antígeno, sugiriendo que esta proteína expresada *in vivo*, tiene una función central en la infección con *M. tuberculosis* (292). Wong et al. (1998) observaron que la proteína Hsp16.3 (que es HspX), pequeña de choque térmico, de la familia  $\alpha$ -cristalina de *M. tuberculosis*, se sobreexpresaba en altas concentraciones de hierro. La encontraron también en *M. leprae* y *M. bovis*, pero no en *M. smegmatis* o en especies patógenas de *M. avium*. Se informó que todos los miembros de la familia HSP conservan una cantidad de residuos de leucina, teniendo una importante función en la actividad molecular de chaperona de *M. tuberculosis* HspX y función de estructura oligomérica. La expresión de esta proteína recombinante *M. tuberculosis* HSP 16.3 en *E. coli* expuesta a temperaturas de 48° C, resultó en valores altos de sobrevivencia, sugiriendo que la actividad chaperona tiene un importante valor en la estabilidad y sobrevivencia de la bacteria (293).

La **Rv3740** es uno de los 15 genes micobacterianos considerados como supuestas sintetas de triacilglicerol (*tgs*) Daniel et al. (2004). Estos autores postulan que la micobacteria usa triacilglicerol (TG) como forma de almacenar energía para ser utilizado durante mucho

tiempo, en el llamado estado de “dormancia”. El origen de ácidos grasos destinado a TG es desconocido. Se sabe poco de la biosíntesis de TG en *M. tuberculosis*. Demostraron que muchos genes *tgs* se inducen cuando el patógeno entra en un estado no replicativo de resistencia a las drogas causado por falta de O<sub>2</sub> y también por tratamiento con óxido nítrico (ON), el cual se conoce que induce genes asociados a la “dormancia”. La síntesis de TG puede ser un blanco para nuevas drogas antilaticencia, que puedan prevenir al organismo de sobrevivir en forma de “dormancia” y así controlar la tuberculosis. Basados en la homología de una proteína con doble función en la producción de cera de *A. calcoaceticus* observaron que el gen Rv3740 mostró la mayor homología con dicho gen. Postulan que algunos de esos genes pueden estar involucrados en la síntesis de TG como forma del organismo de adaptarse a la dormancia. La hipoxia induce un estado de persistencia no replicativo. Los productos de los 15 genes *tgs* mostraron actividad TGS cuando fueron expresados en *E coli*. El gen 3740c mostró baja actividad TGS, en cambio mostró gran actividad cuando fue sometido a ON durante 20 h. El aumento de los niveles transcritos de *tgs*, causado por hipoxia y tratados con ON, mostró cómo hace el patógeno para sintetizar TG, aumentando la secreción de TGS (294).

Lamichhane et al., predijo mediante análisis estadístico que el genoma de *M. tuberculosis* contiene 35% de genes esenciales. Uno de esos genes esenciales es el **Rv2524c** de *M. tuberculosis*, descrito con un 78% de probabilidad, de estar relacionado a la sintetasa de ácidos grasos (FasI) (295). El gen Rv2524c tiene 3069aa, del cual sólo se clonó un segmento del mismo, la parte de la proteína que fue identificada en el gel 2D. La secuencia clonada tiene una homología del 86% con *M. avium* y 90% *M. smegmatis*. Esta parte de la proteína no fue

antigénica de acuerdo a nuestros resultados. Posiblemente la razón ha sido que la parte del gen clonado no tenga epitopes suficientes para estimular a los linfocitos T.

En el desarrollo de este primer objetivo, la metodología aquí adaptada nos permitió identificar proteínas partiendo de cada fracción, teniendo en cuenta que no todas las proteínas identificadas deben ser antigénicas.

El segundo objetivo consistió en evaluar la respuesta inmune celular contra antígenos recombinantes de *M. bovis*, en animales experimentalmente y naturalmente infectados. La prueba de inmunidad celular utilizada fue la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Se evaluaron 12 antígenos recombinantes de *M. bovis*, en bovinos experimentalmente infectados, durante 13 meses (diseño experimental V). Se observaron variaciones en la respuesta provocada por cada antígeno en el transcurso de la infección, los antígenos que tuvieron valores significativos más altos de liberación de IFN $\gamma$  fueron ESAT-6, CFP-10, pp195, MPB70, TB10.4, TB16.4 y pp386 (Fig. VII). La proteína TB10.4, identificada del filtrado de cultivo de *M. bovis* por Skjot et al. (1999), con una homología de 79% con genes de *M. avium*, es miembro de la familia ESAT-6, mostró inmunodominancia en la respuesta inmune humana contra *M. tuberculosis*, siendo reconocida por un 71% de las personas vacunadas con BCG y un 88% de pacientes tuberculosos (296). Arend et al., (2001) la detectaron en niveles similares que a ESAT-6 (88%) en pacientes tuberculosos, describiendo niveles de estimulación similares a los indicados por Skjot, en individuos vacunados con BCG (71%) y en casos de tuberculosis latente, reactivos a la intradermorreacción (58%) (297).

Algunos de estos antígenos fueron estudiados por otros autores en bovinos

experimentalmente infectados (298). Donde encontraron que la respuesta para ESAT-6 y CFP-10 fue positiva respectivamente en 14 y 13 animales de un total de 15, y para TB10.4 fueron 10 de 15 animales los que reaccionaron. En animales negativos estos antígenos no resultaron estimulantes de los linfocitos T. Observaron estimulación en algunos animales con DPPA y en menor grado con DPPB; y si bien TB10.4 tiene homólogos en *M. avium*, en animales negativos no reaccionó, demostrando ser específico. En nuestro trabajo experimental los cuatro animales inoculados reaccionaron, demostrando tener alto IDO con ESAT-6 y CFP-10 durante la mayor parte del tiempo del ensayo, se comportan del mismo modo que DPPB, es decir con valores de IDO fluctuantes a lo largo del tiempo (fig VII).

El gen que codifica para CFP10 (*esxB*) es cotranscrito con el gen *esxA* que codifica para ESAT6 y las dos proteínas se han obtenido como un complejo de secreción estable en la mayoría de las micobacterias. Ambos genes se encuentran ubicados en la región RD1. Observamos que ESAT6 y CFP10 mostraron en animales naturalmente infectados una sensibilidad del 88% y 98%, y una especificidad del 83 y 87% (tabla XIII), mostrando ambos diferencias significativas entre animales positivos y negativos a DPP (tabla XIV). La combinación de ambos en estos mismos animales produjo una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% (Fig. IX). El gen de ESAT-6 no está presente en BCG. Vordermeier et al. (2001), en un trabajo realizado en bovinos con tuberculosis, con la combinación de ESAT-6/CFP-10 detectó un 78% de bovinos infectados (299); van Pinxteren et al (2000) detectaron un 75% de bovinos infectados usando cada uno de éstos antígenos por separado (300). Posteriormente a este trabajo, Waters et al. (2004) usaron estas proteínas fusionadas para diferenciar bovinos infectados con *M. bovis* de aquellos infectados con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *avium*. La respuesta de liberación de IFN- $\gamma$  de la proteína fusionada ESAT-6/CFP-10 en animales infectados con *M.*

*bovis* fue significativamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) de los animales control y de los infectados con *M. avium* ( $P \leq 0.08$ ) y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) ( $P \leq 0.05$ ) (301). Ravn et al. (2005) compararon técnicas diagnósticas (cultivo, microscopía e IFN $\gamma$ ), en pacientes sospechosos de TB y un grupo de pacientes control (vacunados con BCG). Utilizando la combinación antigénica ESAT6-CFP10 (RD1) para medir liberación de IFN $\gamma$  y así evaluar tuberculosis. La sensibilidad del IFN $\gamma$  fue del 85%, mayor a las otras dos pruebas. La combinación de las tres pruebas logró 96% de sensibilidad. La especificidad para RD1 fue del 60%. Sugiriendo que RD1 podría ser utilizada para diagnosticar TB activa y en especial TB extrapulmonar (siendo negativos estos casos para las otras dos pruebas mencionadas) (302).

Tom et al., (2004) estudiaron el efecto repetido de DPP en animales negativos en un período de 11 meses, previo a la inoculación de *M. bovis* en bovinos y pos inoculación por un período de 13 meses (303). ESAT-6 indujo altos niveles de liberación de IFN $\gamma$  a los 2, 3 y 4 meses pos inoculación. Altos niveles de anticuerpos contra ESAT-6 fueron observados a las 7 semanas pos inoculación, con un máximo a los 2 meses. Buddle et al. (2001) mostraron que ESAT-6 tuvo mayor especificidad que DPPB estudiando 51 animales infectados con *M. bovis* y 85 animales de un establecimiento libre de enfermedad (304). A diferencia de nuestro trabajo donde ESAT6 tuvo una especificidad menor que el DPPB (Tabla XIII). La especificidad de ESAT6 fue baja debido a que hubo animales DPP negativos (establecimiento de Florida) que respondieron con altos IDO de IFN $\gamma$ .

TB10.4 reaccionó en uno de los 4 animales al 8 mes pos infección, con un valor de IDO similar a ESAT-6 y superior a CFP10. En cambio TB10.4 estudiado por vez primera por Aagard et al (298) en bovinos experimentalmente infectados, fue reconocida por 52% de las muestras de

sangre recolectadas al día 20 y 210 pos infección. Respecto a ésta proteína TB10.4 obtuvimos una especificidad del 90% y una sensibilidad del 71% (tabla XIII) en animales naturalmente infectados, observando además diferencias significativas en estos bovinos respecto a bovinos de un establecimiento libre de infección (Fig. XI). De esta manera a este antígeno lo podemos considerar de relevancia para ser incluido como complementario a ESAT6 y CFP10, para el diagnóstico.

MPB64 conjuntamente con ESAT-6, produce respuesta de hipersensibilidad tardía (305). La proteína MPB64 no se encuentra en algunas cepas de *M. bovis* BCG (306). Andersen et al., (1991) trabajaron con proteínas del cultivo de *M. tuberculosis* obtenidas en distintos tiempos del cultivo, observaron que MPB64 (24kDa) es secretada en forma mayoritaria en los primeros días del cultivo (8% de proteínas totales) (194). Se ha encontrado que MPB64 tiene regiones de secuencias similares a la familia del antígeno 85 o ESAT-6 (216), presentando un péptido señal (307). Nosotros no observamos respuesta antigénica a MPB64 en los animales experimentalmente infectados, y no logró diferenciar animales naturalmente infectados de animales negativos a DPP (tabla XIV).

La proteína MPB70 (Rv2875) (18 kDa) es un antígeno de secreción, aislado del sobrenadante del cultivo de *M. bovis* BCG, formando un 10% de las proteínas secretadas de *M. bovis* (180). Fue identificada como producto único de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y BCG (de baja expresión en algunas cepas BCG) (209). MPB70 es homóloga a MPT83 (63% identidad de secuencia), resultando ser inmunogénica durante una infección en ratones (308). La reacción de DPP en cobayos sensibilizados con *M. bovis* BCG fue específica para MPB70, no hubo reacción en cobayos sensibilizados con otras micobacterias (180). Pollock et al. (2000) determinaron la sensibilidad y especificidad de los antígenos ESAT6 y MPB70, la sensibilidad determinada para

PPDB, ESAT6 y MPB70 fue de 90.8, 83.2 y 49.6 %, y la especificidad fue de 88.3, 93.8 y 91.4 % respectivamente. La mayoría de los animales DPP positivos respondieron a ESAT-6, y observaron que MPB70 también tuvo buena respuesta aunque fue menor (309). Nuestro trabajo mostró en los animales experimentalmente infectados, un aumento marcado de MPB70 al 8 mes pos-infección (fig.VII-B). Con los animales naturalmente infectados, se estimó un punto de corte en IDO de 0.81 para MPB70, donde la sensibilidad y especificidad fueron de 86 % y 67 % respectivamente (tabla XIII), logrando diferenciar animales positivos de negativos a DPP (tabla XIV). Mostró tener un porcentaje de sensibilidad similar a ESAT-6 y superior a DPPB, aunque su especificidad fue menor.

TB27.4 (localizada en la región RD1, a igual que ESAT-6 y CFP-10), codificada río abajo de ESAT-6, manifestó índices de estimulación altos en 13 de 15 animales inoculados (298). TB27.4 (Rv3878) es un fuerte antígeno de células T y B relacionadas a ESAT-6 y CFP-10 en modelo humano y cobayo (310, 311). Nuestros resultados indicaron que en animales experimentalmente infectados no mostró aumento significativo durante los meses que duró el experimento, y en animales naturalmente infectados manifestó baja especificidad y no observamos diferencias significativas entre animales negativos y positivos a la reacción de tuberculina.

En nuestro trabajo, en el muestreo de los 4 animales infectados experimentalmente con *M. bovis*, observamos que en la estimulación de linfocitos T, la antigenicidad de DPPB fue superior que al resto de los antígenos a lo largo del experimento (Fig. VII). Al segundo mes pos-inoculación pp386 aumentó y pp195 a los 4 mpi respectivamente. MPB70 manifestó valores tan altos como los de DPPA y DPPB al octavo mes (Fig.VII B y C), siendo estos valores mayores que el resto de los antígenos. En este mismo período de tiempo TB16.2, TB10.4 y ESAT6

(aunque mas bajos que los antígenos antes mencionados), indujeron valores más altos que la del resto de los antígenos (CFP10, pp195, pp386, Tb11.5, MPB64, MPB59, MPB83 y p38) (Fig.VII).

Si comparamos los valores de la tabla XIII, la liberación de IFN $\gamma$  de DPPB respecto a los antígenos con animales naturalmente infectados, el estudio de especificidad dados por la curva ROC, establece que DPPB fue más alta (96%) que la del resto de los antígenos individuales, pero menor que la del combo 1 (ESAT6-CFP10) (100%). Valores de especificidad entre 85-95% tuvieron CFP10, TB10.4, p38 y Pp386. La sensibilidad del DPPB fue en general menor que la del resto de los antígenos. La sensibilidad más alta fue la de CFP10 (98%). Esto podría indicar que los antígenos que tuvieron valores de sensibilidad altos, no conformarían la composición del DPPB; o podrían estar en DPPB en muy baja concentración, no llegando a tener las condiciones de concentración óptimas para ser reconocidos por los linfocitos T o estar muy degradados.

En segunda instancia cuando se probaron las combinaciones (mezcla de proteínas recombinantes), los datos obtenidos de IFN $\gamma$  en los 247 animales DPP positivos y 44 animales DPP negativos, se observó que la comb. 2 formado por la unión de ESAT-6, CFP10, pp195, tb10.4 y tb11.5, reaccionó con altos valores en índice de estimulación de linfocitos T, de modo muy interesante en diferentes regiones, mayor aún que la comb. 1 formado por ESAT-6 y CFP-10 solos (fig. X). Mostrando a su vez, una especificidad del 93% y una sensibilidad del 69%, siendo la especificidad mayor que la de DPPB (tabla XVI).

DPPA, DPPB, Comb. 1 y Comb.2 lograron diferenciar animales negativos de positivos a DPP (tabla XV). Pudimos observar que DPPB y el combo 2 tuvieron valores de IFN $\gamma$  altos respecto al resto (Fig. X). La comb. 3, formado por dos antígenos recombinantes integrantes de la comb. 2 (pp195 y tb10.4) no diferenció animales DPP positivos de negativos. Tb11.5 se destacó



por su reactividad en el establecimiento de La Paz (Entre Ríos) (Fig. X).

En el diseño experimental VIII, se realizó un estudio con 14 animales de un establecimiento de Córdoba, evaluando diferentes pruebas diagnósticas. Comparando los datos de la tabla XVII, tomando como positivos valores superiores al estimado por el punto de corte dado por la curva ROC, observamos que 10/13 (77%) fueron positivos para DPPB (punto de corte de 1.4). En el caso de la Comb.1 (1.01) todos los animales reaccionaron de modo positivo (13/13) (100%), con la comb. 2 (1.21) y Tb11.5 (0.64) reaccionaron 12/13 (92%), con la comb.3 (0.69) reaccionaron 11/13 (85%). Un mismo animal fue positivo para DPPB y Comb. 1, no reaccionando con la Comb. 2, Comb. 3 y Tb 11.5.

Observamos una correlación entre el tamaño de la reacción de tuberculina y el IDO de PPDB, Comb.1 y Comb.2. Cuanto mayor fue el IDO, mayor fue el tamaño de la reacción (figura XII). Sugiriendo éste resultado una expansión sistémica de clones de linfocitos T de memoria.

Es de importancia epidemiológica la cantidad de animales que presentaron *M. bovis* en las fosas nasales (50%), demostrado por PCR (fig. XIII) y cultivo. PCR es una buena técnica para diagnosticar casos de TB avanzada, la consideramos una técnica complementaria ya que algunos animales pueden ser DPP negativos y *M. bovis* estar presente en el fluido nasal (312). Es de importancia epidemiológica el poder detectar tuberculosis por hisopado nasal, ya que durante todo ese tiempo, estos animales están contaminando el medio y transmitiendo de este modo la enfermedad a otros animales. Es sabido que PCR diagnostica la presencia de ADN de la micobacteria y no su viabilidad (como el cultivo), pero reconocemos que es una buena aproximación para detectar si la micobacteria *está* o *estuvo* presente, además la positividad del PCR descarta la presencia de MNT.

Es generalmente aceptado que la prueba intradérmica de la tuberculina se correlaciona con la infección y no necesariamente con la enfermedad (313), en este caso todos los animales DPP positivos desarrollaron lesiones compatibles con la enfermedad (fig. XIV). Roswurm et al. (1979) observaron lesiones en un 68% de los animales examinados en Argentina (314). Buddle et al. (2001) observaron que el 70% de los animales DPP positivos tuvieron lesión (304). Resultados similares fueron encontrados por otros autores (315). Encontramos lesión de nódulos linfáticos periféricos (57%), tracto respiratorio (79%) y en particular 57% del tracto respiratorio inferior (TRI). El alto número de lesiones observadas podría deberse al lugar de selección de los animales, debido a una alta incidencia de tuberculosis en ese establecimiento. Es importante destacar que en una inspección detallada de los órganos bovinos en una sala de necropsia, es más eficiente que en la rápida inspección de las playas de faena, donde pequeñas lesiones podrían no ser detectadas.

El tiempo en el que comenzó la infección se desconoce, pero el rango de edad de los animales fue entre 13-15 meses, es posible asumir que fueron infectados siendo terneros amamantados con leche o calostro, por el alto porcentaje de lesiones en hígado y en nódulos linfáticos mesentéricos. También podría deberse a la alta prevalencia de animales DPP positivos del establecimiento originario.

En tres animales de 14 no se obtuvo cultivo positivo a *M. bovis*. Otros autores encontraron resultados similares (316). No hubo diferencias marcadas de esos animales respecto al resto. Del total de los animales, el 64% mostró lesiones en el TRI y en el hígado, sugiriendo un estado avanzado de la enfermedad (tabla XVIII). Es importante destacar que si bien fueron pocos los animales estudiados, el método más sensible utilizado *ante mortem*, fue la prueba de IFN $\gamma$ , utilizando DPPB y antígenos recombinantes. La prueba de IFN $\gamma$  falló en la detección de dos

animales que fueron claramente infectados por *M. bovis* en la examinación *pos mortem*. Hubo un animal que fue negativo en todos los ensayos de IFN $\gamma$ . Buddle et al. (2001), trabajaron con animales donde el resultado de IFN $\gamma$  daba falsos negativos, con cultivo positivo a *M. bovis* (304). En 3 animales los niveles de IFN $\gamma$  disminuyeron al segundo muestreo, del mismo modo Thom (2004) observó en 6 animales una variación en los niveles de IFN $\gamma$  con ESAT-6, quedando demostrado que según el momento de la infección el nivel de IFN $\gamma$  estará aumentado o disminuído (303). Esto corrobora una vez más nuestros datos obtenidos en la infección experimental, el grado de fluctuación de los diferentes antígenos a lo largo de la infección.

A pesar de que todos los animales fueron infectados por el mismo genotipo de *M. bovis*, hubo importantes variaciones en la respuesta inmune y en el tamaño de las lesiones encontradas dada la existencia del bacilo. Todas las cepas estudiadas mostraron el mismo spoligotipo (Fig. XV) sugiriendo un suceso de infección común. Este tipo de spoligotipo no había sido previamente detectado ni en Argentina ni en Brasil. Se desconoce si esta cepa es más virulenta o si esta prevalece en la región.

Buscamos una forma alternativa en la confirmación del diagnóstico de *M. bovis*, ya que el método “gold estandar” por cultivo es muy lento y requiere el sacrificio del animal, agregado a que tiene baja sensibilidad y se obtienen resultados falsos negativos(317). Para el tercer objetivo nos basamos en un estudio descrito por Zumárraga et al. (2005), donde utilizamos la técnica de PCR con muestras de hisopado nasal, aumentando la sensibilidad de la misma en la detección de *M. bovis* mediante un proceso de ciclado llamado “*touch-down*”. Esta técnica es conveniente porque se parte de una muestra fácil de obtener y diagnostica en forma rápida la tuberculosis bovina en el animal vivo (273). En los animales naturalmente infectados (n=39) y negativos (n=20), obtuvimos por la técnica de PCR con muestras de hisopado nasal, una especificidad del

100% y una sensibilidad del 89%. Datos similares fueron estudiados por Vitale et al. (1998) con bovinos, de 50 muestras de hisopados nasales (25 positivos y 25 negativos a PPD) y obtuvieron una especificidad del 100% y sensibilidad del 58%(330). La diferencia es que ellos utilizaron para amplificar un fragmento de 580pb de IS6110, una región con un número mayor de pares de bases. Una nota de investigación reciente Romero et al. (2006) confirmaron una vez más la transmisión de *M. bovis* por vía respiratoria mediante la técnica de PCR anidada de hisopado nasal (318). Romero et al. (1998) analizaron 271 muestras de mucosa nasal tomando como referencia la prueba intradérmica, donde la especificidad por PCR fue del 94.5%. De los tres tipos de muestras utilizadas (leche, sangre e hisopado nasal), la muestra de hisopado nasal fue la que detectó mayor número de casos positivos. Ellos utilizaron primers de 500 pb, dirigidos contra una región del ADN diferente a los que usamos nosotros. Concluyeron que la técnica de PCR es la prueba más sensible y específica para detectar la infección por *M. bovis*, y debería ser utilizada en la caracterización epidemiológica de animales infectados en áreas consideradas de alto riesgo de transmisión (319). Mientras que para aislar y cultivar la micobacteria se necesita entre 10 y 100 organismos viables en la muestra, para PCR “touch-down” se necesitan 9 UFC, equivalente a 45fg de ADN (273).

La principal desventaja es el cuidado que debe tenerse al momento de la extracción del ADN de las muestras, debido a la fácil contaminación entre ellas (falsos positivos), y tener en cuenta el tipo de programa que debe usarse (touch-down) para amplificar la muestra y poder aumentar así la sensibilidad, que solo se puede realizar en algunos modelos de termocicladores.

**Conclusiones**



## 14. Conclusiones

- La técnica de electroelución puesta a punto en nuestro laboratorio brinda la posibilidad de poder seleccionar fracciones antigénicas del organismo en estudio.
- El vector multicopia empleado en el desarrollo de esta tesis, es efectivo en cuanto al rendimiento del producto (proteína recombinante).
- El antígeno EsxV que forma parte de la familia ESAT pudo diferenciar entre animales naturalmente infectados y negativos a PPD. Este antígeno podría formar parte de las proteínas que conformen una combinación para poder ser evaluado en el uso diagnóstico.
- La combinación de los dos antígenos (Rv1636 y HspX) aumenta el reconocimiento antigénico, logrando un efecto potenciado, mayor que cada uno de ellos en forma individual. Estas observaciones son preliminares, ya que se empleó un reducido número de animales.
- Las diferentes combinaciones de las cuales formaron parte los antígenos ESAT-6, CFP-10 y TB11.5 son eficientes para el diagnóstico de la enfermedad.

- El trabajo realizado con 14 animales del establecimiento de Córdoba, bovinos infectados naturalmente por el mismo genotipo de *M. bovis*, muestra la variabilidad de respuesta en la liberación de IFN- $\gamma$ . Esto indicaría dos posibles causas a tener en cuenta, el sistema inmune del hospedador y los estadios de la enfermedad.
- Las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas previo al sacrificio, son complementarias para la obtención de un buen diagnóstico de *M. bovis*.
- Mediante PCR de hisopado nasal queda demostrado el alto número de animales que se encuentran eliminando el bacilo por fosas nasales transmitiendo la enfermedad. Este método confirmó la efectividad de los antígenos utilizados para producir la liberación de IFN- $\gamma$ , pudiendo ser empleado este método para mejorar el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

## **Bibliografía**





## 15. Bibliografía

- 1 -**Chan ED, Heifets L, Iseman MD** Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. *TuberLungDis*.2000;80(3):131-40.
- 2 - **Barry R.Bloom and Christopher J. L. Murray.** Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science*.1992.Vol.257.
- 3 -**Allison MJ, Mendoza D, Pezzia A** “Documentation of a case of tuberculosis in pre-Columbian America . *AmRev Respir Dis*. 1973 Jun; 107: 985-91.
- 4 - **Manchester Keith.** Tuberculosis and Leprosy in antiquity. *Medical History*, 1984, 28: 162-173
- 5 -**Stead W. W.** Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics?: *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Volume 5, Number 9, September 2001, pp. 807-814(8).
- 6 -**Allison MR, Mendoza O. Pezzia A.** Documentation of a case of tuberculosis in pre Columbian America. *Am Rev Respir Dis* 1973;107:985-991.
- 7 - **Gómez Luis H.** "La tuberculosis en la cultura andinas" en: *Archivos Bolivianos de Historia de la Medicina*. Pp 3-6, Vol 2 # 1, 1996.
- 8 -<http://webarg1.ops-oms.org/FuentesInfo/PublicacArg/publi-46/refcap2.html>
- 9 - <http://www.dic.org.ar/tuberculosis/TUBERCULOSIS02.pdf>
- 10 -**World Health Organization.** Fact Sheet No. 104. Revised March 2004
- 11 -**Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Dr. Emilio Coni”.** Tuberculosis en Argentina. PRO.TB.INF.09/02

- 12 -**G.F. Kuszniertz; O.A. Latini; M.D. Sequeira.** Quality assessment of smear microscopy for acid-fast bacilli in the Argentine tuberculosis laboratory network, 1983–2001. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Volume 8, Number 10, October 2004, pp. 1234-1241(8).
- 13 -**Instituto Nacional de Epidemiología Emilio Coni.** ANLIS C. Malbrán, Situación de la TBC. PRO. TBJ 4/02 Mortalidad 1980-2000 PRO. TB.INF 11/03 Sta Fe Rep. Arg INER, 2003; 14-Asociación Médica Argentina TUBERCULOSIS-VIH EN AMÉRICA LATINA. Total de muertes Asociación TB-VIH. 1990
- 14 - [www.ama-med.org.ar/publicaciones\\_revistas3.asp?id=136](http://www.ama-med.org.ar/publicaciones_revistas3.asp?id=136)
- 15 -**Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T et al.** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 1998 Jan-Mar;4(1):59-70.
- 16 -**O. Latini; A.M. Canal; M.E. Ferrara; M.D. Sequeira; G. Sequeira, et al.** Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos- *Arch. med. vet.* v.29 n.2 Valdivia 1997.
- 17- **Abdala, AA; Tarabla.** Prevalencia de lesiones compatibles con tuberculosis en vacas lecheras del Dpto. Las Colonias, Santa Fe (Argentina). [www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2002](http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2002)
- 18-**Pedro M Torres.** Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. [www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/tuberculosis/situacion\\_actual.pdf](http://www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/tuberculosis/situacion_actual.pdf)
- 19- **Rebak, Gladis I. - Brenn, Guadalupe M. - Sanchez, Sebastián - Molina, Karina - Cedres, José F.** V-050 Manifestación de tuberculosis bovina *pos mortem*. V-048 -2005.
- 20- **Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM et al.** Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec*. 1994 Aug 6;135(6):134-5.

- 21- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M et al.** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24; 100 (13):7877-82. Epub 2003 Jun 3.
- 22- Michael Goodfellow and Jhon G. Magee.** Mycobacteria Basic Aspets, Chapman & Hall Medical Microbiology Series. Gangadham & Jenkins
- 23-Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W.** (1997) Diseases caused by bacteria. Veterinary Pathology 6<sup>th</sup> edition. Williams & Wilkins. Maryland, USA.
- 24-Rastogi N, Legrand E, Sola C** The Mycobacteria:an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev Sci Tech 2001 Apr;20: 21-54.
- 25- Falkinham JO (1996)** “Epidemiology of infection by nontuberculous micobacteria” Clin Microbiol Rev 9: 177-215
- 26- Weir E.** Buruli ulcer: the third most common mycobacterial infection. *CMAJ*. 2002 Jun 25; 166(13): 1691.
- 27-Wolinsky E, Ryneanson TK** “Mycobacteria in soil and their relation to disease associated strains” Am Res Respir Dis. 1968 Jun; 97: 1032-1037
- 28- Collins CH, Granges JM, Yates MD** “Mycobacteria in water” J Appl Bacteriol 1984 Oct; 57: 193-211
- 29- Falkinham JO, Norton CD, Le Chevallier MW** “Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and others Mycobacteria in drinking water distribution systems” Appl Environ Microbiol. 2001 Mar; 67: 1225-1231
- 30-Bloom BR (1994)** “Tuberculosis: Pathogenesis, protección and control” Washington DC: ASM Press 637pp
- 31- Collins CH** “The bovine tubercle bacillus” Br J Biomed Sci 2000; 57 (3): 234-40.

- 32-Stienstra Y, van der Graaf WT, te Meerman GJ, The TH, de Leij LF, van der Werf TS**  
 “Susceptibility to development of *Mycobacterium ulcerans* disease: review of possible risk factors” Trop Med Intl Health. 2001 Jul; 6 (7): 554-562
- 33-van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, Asiedu K** “*Mycobacterium ulcerans* infection” Lancet 1999 Sep 18;354 (9183):1013-8.
- 34-Hastings RC (1994)** “Leprosy” Edinburgh/New York: Churchill Livingstone. XIV, 470pp
- 35- Jacobson RR, Krahenbuhl JL** “Leprosy” Lancet 1999 Feb 20;353(9153):655-60.
- 36-Wayne LG, Kubica GP (1986)** Section 16. Mycobacteria. En “Bergey’s Manual of Sistematic Bacteriology”vol 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, & Holt JG. William & Williams, Baltimore
- 37- Gutierrez Cancela,M., Juste Jordán,R.** Capítulo 1. Bacteriología del agente de la tuberculosis caprina. En: García Marín, J.F. (1996) O. cit.
- 38- Karlsen AG, Lessel EF (1970)** “*Mycobacterium bovis* nom.nov” Int J System Bacteriol 20: 273-282
- 39-van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM, Ritacco V et al.** “Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from. animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis” J Clin Microbiol. 1994 Oct;32(10):2425-33.
- 40**[www.ratsteachmicro.com/2003\\_HCOE\\_PDFs/2006\\_winter\\_pdfs/2006\\_Laboratory\\_Techniques\\_6.pdf](http://www.ratsteachmicro.com/2003_HCOE_PDFs/2006_winter_pdfs/2006_Laboratory_Techniques_6.pdf)
- 41-Jubb, K.V.F.,; Kennedy,P.; Palmer, N.** (1970) Chapter 3. Respiratory System. Pathology of domestic animals. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press.
- 42-Oriani, D.S., Blando, J., García Montero, C., Rodríguez Gómez, J., Sagardoy, M. A.** (2000). Características de micobacterias no tuberculosas aisladas de suelos de la Provincia de La Pampa.

Memorias de la XIII Reunión Científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico. 15-17/10/00, Merlo, San Luis.

- 43-Peluffo, G., Zapata, A., Barrera, L., Weinstock, D., Gammella, D. et al. (2000).** Micobacterias atípicas: ¿Variaciones de la prevalencia de especie? Memorias del III Taller Internacional de Infecciones por Clamidias, Brucelas y Micobacterias en Humanos y Animales. 13-24/11/00, Buenos Aires.
- 44- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC (1999)** “Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project” JAMA 282: 677-686
- 45- MacLeod IM** “A case of non pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium africanum*” Tubercle 1977 Mar;58(1):39-42.
- 46-Thoen CO, Mills K, Hopkins MP** “Enzyme-linked proteína A: an enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tubercle exotic animals” Am J Vet Res. 1980 May; 41(5): 833-5.
- 47-Pattyn SR, Portaels FA, Spagnone L, Magos J (1970a)** “Further studies on African strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Comparison con *M bovis* and *M microti*” Ann Soc Belge Med Trop 1970;50: 211-28.
- 48- Tsukamura MS, Mizuno S, Toyama H** “Taxonomic studies on the *Mycobacterium tuberculosis* series” Microbiol Immunol. 1985;29(5):467-73.
- 49- Wells AQ (1946)** “The murine type of tubercle bacillus (the vole acid fast bacillus)”. Sir Williams Dunn School of Pathology , University of Oxford. Special Report Series in Medicine, Council of London, n° 259

- 50- van Soolingen D, van der Zanden AGM, de Haas PEW, Noordhoek GT, Kiers A et al.**  
“Diagnostic of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers” J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):1840-5.
- 51-Goh KS, Legrand E, Sola C, Rastogi N.** “Rapid differentiation of “*Mycobacterium canettii*” from. Other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-Restriction analysis of the hsp65 gene” J Clin Microbiol. 2001 Oct;39(10):3705-8.
- 52-van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA et al.**“A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex *canettii*: characterization of an exceptional isolate from. Africa” Int J Syst Bacteriol. 1997; 47: 1236-1245
- 53-Rastogi N, Lévy-Frébault V, Blom-Potar MC, David HL** “Ability of the smooth and rough variants of *Mycobacterium avium* and *M intracellulare* to multiply and survive intracellularly: role of C-mycosides”. Zentbl Bakteriol Parasitenkd Infektkrankh Hyg Abt 1 Orig Reihe A. 1989 Jan;270(3):345-60.
- 54- Eckstein TM, Inamine JM, Lambert ML, Belisle JT** “A genetic mechanism for deletion of the ser2 gen cluster and formation of rough morphological variant of *Mycobacterium avium*” J Bacteriol.2000 Nov;182(21):6177-82.
- 55-Belisle JT, Klaczkiwwics K, Brennan PJ, Jacobs WR (Jr), Inamine JM** “Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*: Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression” J Biol Chem. 1993 May 15;268(14):10517-23.
- 56-Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A et al.**  
*Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jul;49 Pt 3:1263-73.

- 57-Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S.** Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002 Mar;52(Pt 2):433-6
- 58-Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L.** Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Nov;53(Pt 6):1785-9.
- 59- Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S et al.** Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003 Sep; 53(Pt 5):1305-14.
- 60-Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, Kluver P.** Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes.* 1999 Dec;13(6):431-42.
- 61-Bernardelli A, Cataldi A, Costas C, Romano MI, Bastida C (1996)** “Tuberculosis in seal lions and fur seals from the south-western Atlantic ocean” *Rev Sci Tech OIE* 15: 985-1005
- 62-Alito A, Romano MI, Bigi F, Zumárraga M, Cataldi A** “Antigenic caracterización of micobacteria from South American wild seals” *Vet Microbiol.* 1999 Aug 31;68(3-4):293-9.
- 63- Zumarraga M, Bigi F, Alito A, Cataldi A, Romano MI** “Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America” *J.Clin.Microbiol.* 1999 Feb;37(2):296-303.
- 64-Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Bigi F, Kantor I et al.** “Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine Tuberculosis. *Vet Microbiol.* 1996 May;50(1-2):59-71.

- 65-Perez Tamayo,R., Ridaura Sanz, C (1989):** Capítulo 6. Patologías de las enfermedades infecciosas. En: Pérez Tamayo ,R. (1989) Op. cit.
- 66-Wayne LG, Lin KY.** Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun.* 1982 Sep;37(3):1042-9.
- 67- Collins CH, Grange JM.** The bovine tubercle bacillus. *J Appl Bacteriol.* 1983 Aug;55(1):13-29.
- 68- Corner LA,** 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* 4:53-63.
- 69- HeifetsLB.** Antimycobacterial drugs. *Semin Respir Infect.* 1994 Jun;9(2):84-103. Review. Erratum in: *Semin Respir Infect* 1995 Jun;10(2):121
- 70- Lesslie IW, Magnus K, Stewart CJ.** The prevalence of bovine type tuberculous infection in man in the English rural population. *Tubercle.* 1972 Sep;53(3):198–204.
- 71- Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H.** Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet Microbiol.* 1994 May;40(1-2):83-94.
- 72- Romano MI, Alito A, Zumarraga MJ, Bigi F, Cataldi A.** Molecular markers in the epidemiology of bovine tuberculosis. *Rev Argent Microbiol.* 1999;31
- 73-Romano MI, Alito A, Bigi F, Fisanotti JC, Cataldi A.** Genetic characterization of mycobacteria from South American wild seals. *Vet Microbiol.* 1995 Nov;47(1-2):89-98.
- 74- O'Reilly LM, Daborn CJ.** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 1995 Aug;76 Suppl 1:1-46.
- 75-Kantor , I.N. de; Ritacco, V. (1993)** El diagnóstico de la tuberculosis: del examen microscópico a la Biología Molecular. *Revista de la Asociación Médica Argentina* 106(2):9-12.
- 76-García Marín, J.F., Gutiérrez Cancela, M. (1996<sup>a</sup>)** Capítulo IV. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la tuberculosis caprina. En: García Marín, J. F. (1996) Op. Cit.



- 77-**Martínez Vivot, M., Romano, M.I., Torres, P.** (1999). Aplicación del spoligotyping al análisis de la transmisión de *Mycobacterium bovis* en rodeos bovinos a caprinos. Rev.Arg. Microb. 31 (Supl.1):1-3.
- 78-**Zumárraga MJ, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Romano MI.** Application of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of mycobacteria in milk] Rev Argent Microbiol. 1999;31 Suppl 1:4-5.
- 79- **Morris RS, Pfeifer DU, Jackson R** “The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections” Vet Microbiol. 1994 May;40(1-2):153-77.
- 80-**Jorge, M. C., Bernardelli, A., Martínez Vivot, M., Alito, A., Schettino, M., Torres, P.,** (2000). Tuberculosis bovina: métodos de diagnóstico. Memorias de la XIII Reunión Científico-Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 15-17/11/00, Merlo, San Luis.
- 81-**Martínez Vivot, M., Ritacco, V., Barboni, A., Guida, N., Moras, E.V.** (2000). Tuberculosis felina: caracterización bacteriológica y genómica de aislamientos del Conurbano Bonaerense. Memorias del III Taller Internacional de Infecciones por Clamidias, Brucelas y Micobacterias en Humanos y Animales. 13-24/11/00, Buenos Aires.
- 82- **Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D et al.** “Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence”. Nature 1998,393: 537-544
- 83-**Poulet S, Cole ST.** Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Microbiol. 1995 Feb;163(2):87-95.
- 84-**Ross BC, Jackson K, Yang M, Sievers A, Dwyer B.** Identification of a genetically distinct subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 1992 Nov;30(11):2930-3.
- 85- **Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST** Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? Mol Microbiol. 2002 Apr;44(1):9-19.

- 86- Dubnau E, Smith I.** *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in macrophages. *Microbes and Infection* 5 (2003) 629-637.
- 87- Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K.** Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* 2002 Feb;43(3):717-31.
- 88- Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM.** Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol.* 2002 Jul;184(14):4025-32.
- 89-Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR.** Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis.* 2003 Jan 1;187(1):117-23. Epub 2002 Dec 2.
- 90-Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM.** Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6996-7003.
- 91-Skeiky YA, Ovendale PJ, Jen S, Alderson MR, Dillon DC, Smith S et al.** T cell expression cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):7140-9.
- 92- Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Lewinsohn DM, Coler R et al.** Molecular characterization and human T-cell responses to a member of a novel *Mycobacterium tuberculosis* mtb39 gene family. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2941-50.
- 93- Collins DM, Stephens DM.** Identification of an insertion sequence, *IS1081*, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett.* 1991 Sep 15;67(1):11-5.

- 94-Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW.** DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J Clin Microbiol. 1993 May;31(5):1143-7
- 95- Cole ST.** Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 2002 Oct;148(Pt 10):2919-28.
- 96- Daborn CJ, Grange JM (1993)** “HIV/AIDS and its implication for the control of animal tuberculosis” British Vet J 149: 405-417
- 97- Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R.** The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res Vet Sci. 2003 Feb;74(1):1-15
- 98- Whiting TL, Tessaro SV.** An abattoir study of tuberculosis in a herd of farmed elk. Can Vet J. 1994 Aug;35(8):497-501
- 99-Lugton IW, Wobeser G, Morris RS, Caley P.** Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in feral ferrets (*Mustela furo*) in New Zealand: II. Routes of infection and excretion. N Z Vet J. 1997 Aug;45(4):151-7.
- 100- Ragg JR, Moller H, Waldrup KA.** The prevalence of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) infections in feral populations of cats (*Felis catus*), ferrets (*Mustela furo*) and stoats (*Mustela erminea*) in Otago and Southland, New Zealand. N Z Vet J. 1995 Dec;43(7):333-7.
- 101- Caley P., Morriss G.** Summer/autumn movements, mortality rates and density of feral ferrets (*Mustela furo*) at a farmland site in North Canterbury, New Zealand. New Zealand Journal of ecology (2001). 25(1): 53-60.
- 102- Little TW, Naylor PF, Wilesmith JW.** Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. Vet Rec. 1982 Dec 11;111(24):550-7.

- 103- McInerney J, Small KJ, Caley P.** Prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory. Aust Vet J. 1995 Dec;72 (12):448-51.
- 104- Pérez, A., Debenedetti, R., Martinez Vivot, M., Martin, A., Bernardelli, A., Torres, P. et al.** Descenso en la prevalencia de la tuberculosis porcina según hallazgos bacteriológicos e histopatológicos en faena. Memorias de la XIII Reunión Científico-técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. 15-17/11/00, Merlo, San Luis.
- 105- Nieberle K (1931)** Ergeb Allg Path Anat 25: 631. Citado por Jensen R y DR Mackey (1979) "Diseases of feedlot cattle" 3rd ED Lea & Febiger, Philadelphia
- 106- Francis J (1947)** "Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis" Staples Press Ltd, London.
- 107- Neill SD, Hanna J, O'Brien J, McCracken RM** "Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle" Vet Rec. 1988 Sep 24;123(13):340-3.
- 108- Jensen KA (1952)** "Bovine tuberculosis in man and cattle" In Advances in the control of zoonoses. WHO/FAO Seminar on Zoonoses, Vienna, November 1952. Geneva: World Health Organization. 1953: 11
- 109- Magnus K.** Bull Int Union Tuberc. The significance of bovine tuberculous infection for human tuberculosis of today. 1968 Dec;41:289-94.
- 110- Jensen KA, Lester V, Tolderlund K (1940)** "The frequency of bovine infection among tuberculosis patients in Denmark" Acta Tuberc Scand 14: 125-157
- 111- Sigurdsson J (1955)** "Studies on the risk of infection with bovine tuberculosis in the rural population. With special reference to pulmonary tuberculosis" Acta Tuberc Scand Supplement 15: 1-250.
- 112- Kubin M, Heralt Z, Morongova I, Ruzhova R, Viznerova A** "Two cases of probable man to man transmission of *Mycobacterium tuberculosis*" Z Erkrank Atmungsorg 1984;163(3):285-91.

- 113- Grange JM, Darbon C, Cosivi O** “HIV-related tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*” Eur Respir J. 1994 Sep;7(9):1564-6.
- 114- Dankner WM, Waeckert NJ, Essey MA, Moser KM, Thompson M, Davies CE** “*Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and historical review of a forgotten pathogen” Medicine 1993 Jan;72(1):11-37.
- 115- Blazquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, Martín C, Guerrero A, Cobo J, van Embden J et al.** “Genetic characterization of multidrug-resistan *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients” J Clin Microbiol. 1997 Jun;35(6):1390-3. Erratum in: J Clin Microbiol 1998 Aug;36(8):2398.
- 116- Bouvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, Lariven S, Vallee E, Pernet m, Gottot S, Vachon F** “A nosocomial outbreak of multi drug-resistan *Mycobacterium bovis* among HIV infected patients. A case-control study” AIDS 1993 Nov;7(11):1453-60.
- 117- Lesslie IW** “Cross infections with mico bacteria between animals and man” Bull Int Union Tuberc. 1968 Dec;41:285-8.
- 118- Huitema H** “The erradicación of bovine tuberculosis in cattle and the significance of man as a source of infection in cattle”. Selected Papers , Roy Neth Tuberc Assn .1969; 12: 62-67
- 119- Collins CH, Granges JM** “Zoonotic implication of *Mycobacterium bovis* infection” Irish Vet J. 1987;41: 363-366
- 120- Schliesser T (1974)** “Die Bekämpfung der Rindertuberkulose- Tiervesuch der Vergangenheit”. Prax Pneumonol 28 Supplement: 870-874
- 121- Lesslie IW** “Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus” Vet Rec 1960; 72: 218-224

- 122- Fenton MJ, Vermeulen MW.** Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 1996 Mar;64(3):683-90  
<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/general.php?Mostrar=baar>
- 123- Chatterjee D, Roberts AD, Lowell K, Brennan PJ, Orme IM** “Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor” *Infect Immun* 1992 Mar;60(3):1249-53.
- 124- Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M et al.** “Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan: relationship to chemical structure” *J Immunol* .1992 Jul 15;149(2):541-7.
- 125- Chan J, Fan X, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR** “Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages” *Infect Immun.* 1991 May;59(5):1755-61.
- 126- Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP** “Racial differences in susceptibility to infection by *M.tuberculosis*” *N.Engl JM.* 1990 Feb 15;322(7):422-7.
- 127- Dannenberg A.M. Jr,** Pathogenesis of pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: basic principles established by the rabbit model. *Tuberculosis (Edinb).* 2001;81 (1-2):87-96.
- 128- Ernst, JD** “Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*” *Infection Immun.*1998 Apr;66(4):1277-81.
- 129-Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA.** Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990 Apr 1;144(7):2771-80.
- 130-Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ.** A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science.* 1997 Aug 22;277(5329):1091-3.

- 131- Crowle A, Dahl R, Ross E and May M** “Evidence that vesicles containing living virulent *M. tuberculosis* or *M.avium* in cultured human macrophages are not acidic” *Infec.Immun.* 1991; 59:1823-1831
- 132-Oh YK and Straubinger RM** “Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual -label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interacción” *Infect Immun* .1996; 64: 319-325.
- 133- Hackman DJ, Rotsein OD, Zhang WJ, Gruenheid S, Gros P and Grinstein S** “Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance - associated macrophage protein 1 (Nramp 1) impairs phagosomal acidification” *J.Exp.Med.* 1998; 188: 351-364
- 134- Strugill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK et al.** “Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATPase” *Science.* 1994; 263: 678-681
- 135- Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I et al** “Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* infected macrophages” *J.Immunol.* 1994; 153:2568-2578
- 136-Hackman DJ, Rotsein OD, Zhang WJ, Demaurex N, Woodside M, Tsai O et al.** “Regulation of phagosomal acidification” *J.Biol Chem.* 1997; 272: 29810-29820
- 137- Aniento F, GU F, Parton RG and Gruenberg J** “An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes” *J Cell Biol.* 1996; 133: 29-41.
- 138-Bloom BR, Small PM** “The evolving relación between humans and *Mycobacterium tuberculosis*” *N Engl J Med.* 1998; 338: 677-78.
- 139-Casanova JL, Abel L** “Genetic diseccción of Immunity to mico bacteria: the human model” *Annual Rev Immunol.* 2002; 20: 581-620

- 140- Murray J. F.** *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption. Am J. Respir Crit Care Med Vol 169,pp 1086-1088, 2004
- 141- Sakula A.** Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. Thorax. 1982 Apr;37(4):246-51.
- 142- Grange JM, Bishop PJ.** 'Uber tuberkulose'. A tribute to Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus, 1882. Tubercle. 1982 Mar;63(1):3-17.
- 143-Ligon BL.** Robert Koch: Nobel laureate and controversial figure in tuberculin research.Semin Pediatr Infect Dis. 2002 Oct;13(4):289-99.
- 144-Roy E, De Silva AD, Sambandamurthy VK, Clark SO, Stavropoulos E, Jacobs WR Jr et al.** Induction of high levels of protective immunity in mice after vaccination using dendritic cells infected with auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. Immunol Lett. 2006 Mar 15;103(2):196-9. Epub 2005 Nov 2.
- 145-Saunders BM, Frank AA, Orme IM.** Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Immunology. 1999 Nov;98 (3):324-8.
- 146- Giordano, M., Trevani, A.,** (1999) Capitulo 13. Respuesta inmune frente a agentes infecciosos. En: Fainboim, L., Satz, L., y Geffner, J. (1999) Op. Cit.
- 147-Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2001: Vol.14(1);39-48.** María del Carmen Jiménez Martínez
- 148-Orme IM.** Progress in the development of new vaccines against tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 1997 Apr;1(2):95-100.
- 149- Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR** "Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle" Vet Microbiol. 1992: 30: 343-354



- 150-Cooper AM, Flynn JL.** The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*.  
Curr Opin Immunol. 1995 Aug;7(4):512-6
- 151-Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR** Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 15;89(24):12013-7.
- 152-Tascon RE, Stavropoulos E, Lukacs KV, Colston MJ.** Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. Infect Immun. 1998 Feb;66(2):830-4.
- 153-Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB.** Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med: 1999 Jun 21;189(12):1973-80.
- 154- Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR, Flynn JL** Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. J Immunol. 1999 May 1;162 (9):5407-16.
- 155-Cherñavsky, A.,** Capítulo 6. Receptor para el antígeno en el linfocito T. En: Fainboim, L.; Satz, M. L.; Geffner, J (1999). Op. Cit.
- 156- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1994) Molecular biology of the cell (3rd edition). New York: Garland Publishing, Inc.
- 157- Liebana E, Girvin RM, Welsh M, Neill SD, Pollock JM.** Generation of CD8(+) T-cell responses to *Mycobacterium bovis* and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis. Infect Immun. 1999 Mar;67(3):1034-44.

- 158-Kabelitz D, da Silva Lobo ML, Schurmann G, Hofmann WJ, Otto G.** Presence of gamma/delta T-cell receptor-expressing T cells in liver biopsies following liver transplantation. *Hum Immunol.* 1990 Jun;28(2):167-9.
- 159- Havlir DV, Ellner JJ, Chervenak KA, Boom WH.** Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* 1991 Feb;87(2):729-33.
- 160- Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP.** Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2001;81(1-2):103-7.
- 161- Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM.** Antigen recognition and immunomodulation by gamma delta T cells in bovine tuberculosis. *J Immunol.* 2001 May1;166(9):5604-10.
- 162- Kennedy HE, Welsh MD, Bryson DG, Cassidy JP, Forster FI, Howard CJ.** Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infect Immun.* 2002 Mar;70(3):1488-500
- 163- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM.** Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2243-7.
- 164- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR.** An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2249-54.
- 165- Orme IM, Andersen P, Boom WH.** T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1993 Jun;167(6):1481-97.
- 166-Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orme IM.** The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. *Infect Immun.* 1997 Apr;65(4):1317-20.

- 167- Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA.** Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1739-42.
- 168- Murray PJ, Young RA.** Secretion of mammalian proteins from mycobacteria. *Methods Mol Biol*. 1998;101:275-84
- 169-Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD.** *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol*. 1999 Oct 1;163(7):3898-906.
- 170- Dannenberg Jr., A.M.** (2000) Capítulo 2. Fisiopatología: aspectos básicos. En: Schlossberg, D. (2000) Op. Cit.
- 171- Yoneda T, Ellner JJ.** CD4(+) T cell and natural killer cell-dependent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Aug;158(2):395-403.
- 172- Jacqueline G O'Leary, Mahmoud Goodarzi1, Danielle L Drayton1 & Ulrich H von Andrian.** T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology* 7, 507 - 516 (2006).
- 173- Lurie MB, Zappasodi P.** "Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized animals" *J Exp Med*. 1942; 75: 247-267
- 174- Raffel S.** "Types of acquired immunity against infectious disease" *Ann Rev Microbiol*. 1949; 3: 221-264
- 175- Wright GL Jr, Roberts DB.** "Two dimensional immunoelectrophoresis of mycobacterial antigens. Comparison with a reference system" *Am Rev Respir Dis*. 1974; 109: 306-310

- 176- Closs O, Harboe M, Axelsen NH, Bunch-Christensen K, Magnusson M.** “The antigens of *Mycobacterium bovis* strains BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system” Scand J Immunol. 1980; 12: 249-263)
- 177- Wicker HG, Harboe M, Bennedsen J, Closs O.** “The antigens of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv studied by crossed immunoelectrophoresis. Comparición with a reference system for *Mycobacterium bovis* BCG” Scan J Immunol. 1988; 27: 223-239
- 178- Wicker HG, Harboe M.** “Comparison of antigen and antisera in crossed immunoelectrophoresis by dual dilution” J Immunol Methods. 1987; 97(2): 201-207
- 179- Hermans PWM, Abebe F, Kuteyi VIO, Kolk AHJ, Thole JER, Harboe M.** “Molecular and immunological caracterización of the highly conserved antigen 84 Prom. *M. tuberculosis* and *M. leprae*” Infect & Immun. 1995; 63(3): 954-960
- 180- Nagai, S., J Matsumoto, and T Nagasuga..** Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect, Immun.1981; 59:372-382.
- 181- Schneewind O, Fowler A, Faull KF.** “Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*”. Science. 1995; 268(5207):103-106
- 182- Hayashi S, Wu HC** “Lipoproteins in bacteria”.J Bioenerg Biomembr. 1990; 22(3): 451-71
- 183-Andersen PD, Askgaard D, Gottshaus A, Bennedsen J, Nagai S, Heron I** “Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*” Scand J Immunol.1992; 36: 823-831
- 184-Raynaud C, Etienne G, Peyron P, Laneelle MA, Daffe M.** Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 1998 Feb;144 ( Pt 2):577-87.

- 185-Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhay MJ, Andersen P** Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 1998 Aug;66(8):3492-500.
- 186-Cunningham AF, Spreadbury CL.** Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol.* 1998 Feb;180(4):801-8.
- 187-Sonnenberg MG, Belisle JT.** Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 1997 Nov;65(11):4515-24.
- 188-Yuan Y, Crane DD, Barry CE 3rd.** Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol.* 1996 Aug;178(15):4484-92.
- 189-Rosenkrands I, Rasmussen PB, Carnio M, Jacobsen S, Theisen M, Andersen P.** Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2728-35.
- 190-Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B.** A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology.* 1998 Nov;144 ( Pt 11):3195-203.
- 191- Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB.** Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995 May; 63(5): 1710-1717.

- 192- Harth G, Clemens DL, Horwitz MA.** Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27; 91(20): 9342-9346.
- 193- Menozzi FD, Bischoff R, Fort E, Brennan MJ, Locht C.** Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Oct 13; 95(21): 12625-12630.
- 194- Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bentzon MW, Heron I.** T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1991 Apr; 59(4): 1558-1563.
- 195- Wieles B, Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Ottenhoff TH.** Identification and functional characterization of thioredoxin of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995 Dec; 63(12): 4946-4948.
- 196-Wiker HG, Sletten K, Nagai S, Harboe M.** Evidence for three separate genes encoding the proteins of the mycobacterial antigen 85 complex. *Infect Immun*. 1990 Jan;58(1):272-4.
- 197- Oettinger T, Andersen AB.** Cloning and B-cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infect Immun*. 1994 May; 62(5): 2058-2064.
- 198- Engers HD and workshop participants.** "Monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*" *Infect Immun*. 1985; 48: 603-605
- 199-Engers HD and workshop participants** "Antigens recognized by mico bacteria-specific monoclonal antibodies" *Infect Immun*. 1986; 51: 718-720
- 200- Ljungqvist L, Worsaae A, Heron I.** "Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 strains of inbred mice: novel monoclonal antibody specificities generated by fusions, using spleens from BALB.B10 and CBA/J mice" *Infect Immun*. 1988; 56(8):1994-1998

- 201- Ljungqvist L, Worsaae A, Heron I.** “Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* and production of monoclonal antibodies in mice” *Acta Leprol.* 1989; 7 Suppl 1:184-5
- 202-Huygen K, Ljungqvist L, ten Berg R, Van Vooren JP** “Repertoires of antibodies to culture filtrate antigens in different mouse strains infected with *Mycobacterium bovis* BCG” *Infect Immun.* 1990; 58(7): 2192-2197
- 203-Haslov K, Andersen AB, Ljungqvist L, Weis Bentzon M.** “Comparison of the immunological activity of five defined antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in seven inbred guinea pig strains. The 38-kDa antigen is immunodominant” *Scand J Immunol.* 1990; 31(4):503-514
- 204- Khanolkar Young, S., A.H. KolK, A.B. Andersen, J. Bennedsen, P. J. Brennan, B. Rivoire et al.** Results of the third immunology of leprosy/immunology of tuberculosis antimicrobial monoclonal antibody workshop. *Infect. Immun.*1992; 60:3925-7.)
- 205-Wood PR, Ripper J, Radford AJ, Bundesen PG, Rylatt DB, Cottis LE et al.** “Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*” *J Gen Microbiol.* 1988; 134 ( Pt 9):2599-2604
- 206- Belisle, J. T., Braunstein, M., Rosenkrands I, Andersen, P.** Chapter 16. The Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* . Ed: Stewart T. Cole et al. 2005.
- 207- Hewinson RG, Harris DP, Whelan A, Russell WP.** Secretion of the mycobacterial 19-kilodalton protein by *Escherichia coli*, a novel method for the purification of recombinant mycobacterial antigens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 Jan; 3(1): 23-29.
- 208- Koo HC, Park YH, Ahn J, Waters WR, Palmer MV, Hamilton MJ et al.** Use of rMPB70 Protein and ESAT-6 Peptide as Antigens for Comparison of the Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunochromatographic, and Latex Bead Agglutination Assays for Serodiagnosis of Bovine Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep; 43(9): 4498-4506.

- 209-Buddle, B.M., Parlane, N.A., Keen, D.L., Aldwell, F.E., Pollock, J.M., Lightbody, K., Andersen, P.** Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin.Diag.Lab. Immunol.* 6: 1-5, 1999.
- 210- Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J et al.** Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol.* 1999 Sep;33(6):1103-17.
- 211- Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, Warndorff D, Crampin AC, Mwaungulu L et al.** Gamma Interferon Responses Induced by a Panel of Recombinant and Purified Mycobacterial Antigens in Healthy, Non-*Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated Malawian Young Adults *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 July; 10(4): 602–611.
- 212-Smith SM, Malin AS, Pauline T. , Lukey, Atkinson SE, Content J et al.** Characterization of Human *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin-Reactive CD8<sup>+</sup> T Cells. *Infect Immun.* 1999 Oct; 67(10): 5223-5230.
- 213- Daffe M.** The mycobacterial antigens 85 complex - from structure to function and beyond. *Trends Microbiol.* 2000 Oct;8(10):438-40.
- 214-Haga S, Yamaguchi R, Nagai S, Matsuo K, Yamazaki A, Nakamura RM.** Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 1995 Feb;57(2):221-5.
- 215-Lightbody KA, Girvin RM, Mackie DP, Neill SD, Pollock JM.** T-cell recognition of mycobacterial proteins MPB70 and MPB64 in cattle immunized with antigen and infected with *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol.* 1998 Jul;48(1):44-51.



- 216 -Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, Warndorff D, Crampin AC, Mwaungulu L et al.**  
Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Jul;10(4):602-11.
- 217- McNair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock JM.** Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. Scand J Immunol. 2001 Apr;53(4):365-71.
- 218 -Jiang XY, Wang CF, Wang CF, Zhang PJ, He ZY.** Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* secreted protein MPB83 in Escherichia coli. J Biochem Mol Biol. 2006 Jan 31;39(1):22-.
- 219- Abou-Zeid C, Filley E, Steele J, Rook GAW** “A simple new method for using antigens separated by polyacrilamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in Vitro alter converting bands cut from Western blots into antigen -bearing particles” J Immunol Methods. 1987; 98: 5-10.
- 220- O'Farrell PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 1975 May 25;250(10):4007-21.
- 221-Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J et al.**  
Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. Mol Microbiol. 1999 Sep;33(6):1103-17.
- 222-Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM.**  
Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science. 1999 May 28;284(5419):1520-3.
- 223-Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, Zimny-Arndt U et al.**  
Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. Electrophoresis. 2001 Aug;22(14):2936-46.

- 224 -Garbe TR, Hibler NS, Deretic V.** Response to Reactive Nitrogen Intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: Induction of the 16-Kilodalton  $\alpha$ -Crystallin Homolog by Exposure to Nitric Oxide Donors. *Infect Immun.* 1999 Jan; 67(1): 460-465.
- 225-Sherman DR, Sabo PJ, Hickey MJ, Arain TM, Mahairas GG, Yuan Y et al.** Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci US A.* 1995 Jul 3; 92(14): 6625-6629.
- 226-Young DB, Garbe TR.** Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991 Sep; 59(9): 3086-3093
- 227-Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C.** Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1073-7. Epub 2002 Jan 17.
- 228-Yuan, Y., D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman et al.** The 16Kda alpha crystallin (Acr) protein of *M. tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; USA 95: 9578-9583).
- 229-Rosenkrands, I., K. Welding, S. Jacobsen, C. V. Hansen, W. Florio, I. Giantri et al.** Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing, and immunodetection. *Electrophoresis.* 2000; 21:935-948.
- 230- de Kantor IN.** Primary and acquired resistance in tuberculosis *Medicine (B Aires).* 1979 Sep-Oct;39(5):693-4.
- 231- Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ.** The tuberculin test. *Vet Microbiol.* 1994 May;40(1-2):111-24.

- 232-Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB et al.** “Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis” *Aust Vet J.* 1991 Sep;68(9):286-90.
- 233-Francis J, Seiler RJ, Wilkie EW, O’Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ** “The sensitivity and specificity of various tuberculina tests using bovine and others tuberculins” *Vet Rec.* 1978 Nov 4;103(19):420-5.
- 234- Haslov K, Andersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Andersen P** “Guinea pig cellular immune responses to proteína secreted by *Mycobacterium tuberculosis*” *Infec Immun* 1995 Mar;63(3):804-10.
- 235- Lyashchenko K, Manca C, Colangeli R, Heijbel A, Williams A, Gennaro ML** “Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis” *Infect Immun.* 1998 Aug;66(8):3606-10.
- 236- de Vries RRP** “Regulation of T cell responsiveness against mycobacterial antigens by HLA class 2 immune response genes”. *Rev Infect Dis.* 1989 Mar-Apr;11 Suppl 2:S400-3.
- 237- Worthington RW.** Mycobacterial PPD sensitins and the nonspecific reactor problem. *Onderstepoort J Vet Res.* 1967 Dec;34 (2):345-437.
- 238- Wood PR, Corner LA and Plackett P** “Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the producción of  $\gamma$  interferon”. *Res Vet Sci.* 1990 Jul; 49(1):46-9.
- 239- Townsend J, Duffus WPH and Williams DL** “The effect of age of cattle on the in vitro production of interferon by peripheral blood mononuclear cells. *J Comp Pathol.* 1988 Aug;99 (2):169-85
- 240- Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC and PR Wood** “A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detección of tuberculosis in cattle” *Aust Vet J.* 1990 Apr;67(4):134-7.

- 241-Katial RK, Hershey J, Purohit.Seth T, Belisle J, Brennan P, Spencer J et al.** “Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing measurement of in vitro gamma interferon production in whole-blood culture” Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Mar;8(2):339-45.
- 242-De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, fassote MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne J et al.** “Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. I Comparison with isolated PBMC stimulation”. Cytokine. 1992 May; 4(3):239-48.
- 243-Vordermeier HM, Cockle PC, Whelan A, Rhodes S, Palmer N, Bakker D et al.** Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Sep;6(5):675-82.
- 244- de la Rua-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 Oct;81(2):190-210.
- 245-Lepper AWD, Pearson CW, Outteridge PM** “Assessment of the bentonite flocculation test for detecting tuberculosis in cattle” Aust Vet J. 1973 Oct;49(10):445-50.
- 246- Auer LA** “Assessment of an enzyme linked immunorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*” Austr Vet J 1987 Jun;64(6):172-6.
- 247- Hanna J, Neill SD, O’Brien JJ** “Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis”Res Vet Sci. 1989 Jul;47(1):43-7.
- 248- Hanna J, Neill SD, O’Brien JJ (1992)** “ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis” Vet Microbiol. 1992 Jun 1;31(2-3):243-9.

- 249- Ritacco V, Kantor IN de, Barrera L, Nader A, Bernardelli A Torrea G, et al.** “Assessment of the sensitivity and specificity of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis” *Zentralbl Veterinarmed [B]* 1987 Mar; 34(2): 119-125.
- 250-Ritacco V, López B, Barrera L, Torrea G, Nader A, Kantor IN de et al.** “Evaluation of four antigens for the detección of anti-*Mycobacterium bovis* antibodies by enzyme immuno-assay” *Rev Arg Microbiol.* 1988 Apr-Jun; 20: 97-101.
- 251-Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E. Kantor IN de.** “Further evaluación of an indirest enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis” *J Vet Med* 1990; B37: 19-27
- 252-Ritacco V, López B, Kantor IN de , Barrera L, Errico F, Nader A** “Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis” *Res Vet Sci.* 1991; 50: 365-367
- 253-Bardana EJ, McClatchy JK, Farr S, Minden P** “Universal occurrence of antibodies to tubercle bacilli in sera from. Non-tuberculous and tuberculous individuals” *Clin Exp Immunol.* 1973; 13: 65-77
- 254 -Das S, Chang SH, Lowrie DB, Walker KB, Mitchison DA, Vallishayee RS** “The pattern of mycobacterial antigen recognition in sera from. Mantoux-negative individuals is essentially unaffected by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination in either South India or London” *Clin Exp Immunol.* 1992; 89: 402-406
- 255-Del Giudice G, Gervaix A, Constantino P, Wyler C, Tounge C, Graeff-Meeder ER de et al.** “Priming to heat shock proteins in infants vaccinated against pertussis” *J Immunol .* 1993; 150: 2025-2032
- 256-Verbon A, Kuijper S, Jansen HM, Speelman P, Kolk AHJ** “Antigens in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal and human antibodies. *J Gen Microbiol.* 1990; 136: 955-964

- 257-Harboe M, Wilker HG, Duncan JR, García MM, Dukes TW, Brooks BW et al.** “Protein G-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for anti-MPB70 antibodies in Bovine Tuberculosis” *J Clin Microbiol.* 1990; 28(5): 913-921
- 258-Roche PW, Triccas JA, Avery DT, Fifis T, Billman -Jacobe H, Briotton WJ** Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1994 Nov;170 (5):1326-30.
- 259-Pollock JM, McNair J, Lightbody KA, Fulton C, Mackie PD, Neill SD (1995)** “Tuberculosis in wildlife and domestic animals” Eds F Griffin and G de Lisle. New Zealand, University of Otago press p70
- 260-Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML.** “A multiple-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases” *J Immunol Meth.* 2000; 242: 91-100
- 261-Kemeny DM, Challacombe SJ (1988)** “Microtitre plates and other solid phase support” In: Kemeny DM, Challacombe SJ (Eds) *ELISA and other solid phase immunoassays: theoretical and practical aspects.* John Wiley and Sons, N.Y, p.31
- 262-Chiyoji A, Hirano K, Tomiyama T** “Simple and rapid identificación of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti MPB64 monoclonal antibodies” *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11): 3693-3697
- 263-Cole RA, Lu HM, Shi YZ, Wang J, De-Hua T, Zhou AT** “Clinical evaluación of a rapid immunochromatographic assay based on the 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China” *Tuberc Lung Dis.* 1996; 77: 363-368
- 264-Grobush MP, Schürman D, Schwenke S, Teichmann D, Klein E** “Rapid immunochromatographic assay for diagnosis of tuberculosis” *J Clin Microbiol.* 1998; 36(11): 3443

- 265- Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME** “Amplification of species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis” J Clin Microbiol 1991; 29: 2163-2168.
- 266-Rodríguez JG, Megía GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA** “Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology. 1995 Sep;141 ( Pt 9):2131-8.
- 267-Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gómez-Mampaso E, Tercero JC et al.** “Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR” J Clin Microbiol. 1995; 33: 33-6.
- 268-Wards BJ, Collins DM, Lisle GW** “Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reacci3n” Vet Microbiol. 1995; 43: 227-240
- 269-Fisanotti JC, Romano MI, Alito A, Bigi F, Cataldi A** “An mpb-64 flanking sequence specific for *Mycobacterium bovis*. Res Microbiol. 1997; 148(5): 427-435.
- 270- Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann Biol Clin (Paris). 1990;48(8):579-82.
- 271 -Nuovo GJ.** PCR in situ hybridization. Methods Mol Biol. 1994;33:223-41.
- 272 -Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis** Electrophoresis (1989)16: 1648-1656.
- 273-Zumárraga MJ, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano MI, et al.** Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J Vet Diagn Invest. 2005 May;17(3):232-8.
- 274- Francois Baneyx.** Recombinant protein expresi3n in *Escherichia coli*. Current Opini3n in Biotechnology 1999, 10: 411-421.

- 275- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994).** Current Protocols in Molecular Biology (New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience).
- 276-Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 Oct; 150(1):76-85.
- 277- Pollock JM, Andersen P.** Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infect Immun. 1997 Jul;65(7):2587-92.
- 278 -Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis. 2000 Apr;21(6):1037-53.
- 279- Lightbody KA, Skuce RA, Neill SD, Pollock JM.** Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. Vet Rec. 1998 Mar 21;142(12):295-300.
- 280- Hermans PW, Schuitema AR, Van Soolingen D, Verstynen CP, Bik EM, Thole JE et al.** Specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1990 Jun;28(6):1204-13.
- 281- Gulle H, Schoel B, Kaufmann SH.** Direct blotting with viable cells of protein mixtures separated by two-dimensional gel electrophoresis. J Immunol Methods. 1990 Oct 19;133(2):253-61.
- 282-Andersen P, Heron I.** Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1993 Mar;61(3):844-51.
- 283-Andersen P.** Host responses and antigens involved in protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. Scand J Immunol. 1997 Feb;45(2):115-31.



- 284-Weldingh K, Andersen P.** Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. FEMS Immunol Med Microbiol. 1999 Feb;23(2):159-64.
- 285-Alito A, McNair J, Girvin RM, Zumárraga M, Bigi F, Pollock JM et al.** Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. Braz J Med Biol Res. 2003 Nov;36(11):1523-31
- 286-Fifis T, Corner LA, Rothel JS, Wood PR.** Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. Scand J Immunol. 1994 Mar;39(3):267-74.
- 387- Rook GA, Dheda K, Zumla A.** Immune systems in developed and developing countries; implications for the design of vaccines that will work where BCG does not. Tuberculosis (Edinb). 2006 May-Jul;86(3-4):152-62. Epub 2006 Feb 28.
- 288-Tekaia F, Gordon SV, Garnier T, Brosch R, Barrell BG, Cole ST.** Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. Tuber Lung Dis. 1999;79(6):329-42.
- 289-Connell T, Bar-Zeev N, Curtis N Clin.** Early detection of perinatal tuberculosis using a whole blood interferon-gamma release assay. Infect Dis 2006 Jun 1; 42 (11): e 82-5 Epub 2006 Apr 27 Apr 2006).
- 290-Desjardin LE, Hayes LG, Sohaskey CD, Wayne LG, Eisenach KD.** Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (hspX) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 2001 Sep;183(18):5311-6.
- 291-Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE 3rd, Andersen P.** Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. J Bacteriol. 2002 Jul;184(13):3485-91.
- 292-Valdez MM, Clark JI, Wu GJ, Muchowski PJ.** Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human alphaB-cryst.allinEur J Biochem. 2002 Apr;269(7):1806-13

- 293-Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, Gibson BW.** Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun.* 1999 Jan;67(1):327-36.
- 294-Daniel J, Deb C, Dubey VS, Sirakova TD, Abomoelak B, Morbidoni HR.** Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J Bacteriol.* 2004 Aug;186(15):5017-30.
- 295-Lamichhane G, Zignol M, Blades NJ, Geiman DE, Dougherty A, Grosset J et al.** A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):7213-8. Epub 2003 May 29.
- 296-Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, Andersen P.** Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun.* 2000 Jan;68(1):214-20.
- 297-Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH, van Dissel JT.** Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Nov;8(6):1089-96.
- 298-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 Aug;41(8):3719-28.

- 299-Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG.** Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 May;8(3):571-8.
- 300-van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P.** Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000 Mar;7(2):155-60.
- 301-. W. R. Waters, B. J. Nonnecke, M. V. Palmer, S. Robbe-Austermann, J. P. Bannantine, J. R. Stabel et al** Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10. Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July 2004, p. 729-735, Vol. 11, N°4.
- 302-Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN et al.** Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Apr;12(4):491-6.
- 303-Thom M, Morgan JH, Hope JC, Villarreal-Ramos B, Martin M, Howard CJ.** The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 Dec 28;102(4):399-412.
- 304-Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Andersen P, de Lisle GW.** Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Microbiol.* 2001May3;80(1):37-46.
- 205- Kaufmann SH, Andersen P.** Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem Immunol.* 1998;70:21-59.

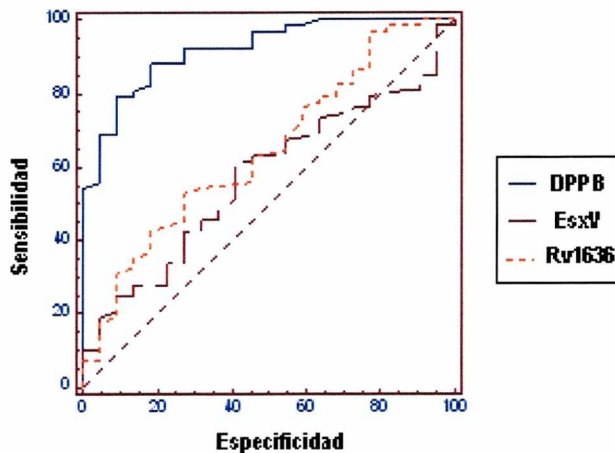
- 306-Haga S, Yamaguchi R, Nagai S, Matsuo K, Yamazaki A, Nakamura RM.** Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 1995 Feb;57(2):221-5.
- 307-Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, Abe C, Nagai S, Terasaka K, Yamada T.** Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1989 Jan;57(1):283-8.
- 308-Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr.** Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol.* 1996 May;43(5):490-9.
- 309-Pollock JM, Girvin RM, Lightbody KA, Clements RA, Neill SD, Buddle BM, Andersen P.** Assessment of defined antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet Rec.* 2000 Jun 3;146(23):659-65.
- 310-Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, Zhao X, Vogelstein M, Spencer JS et al.** Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Scand J Immunol.* 2001 Nov;54(5):448-52.
- 311-Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM.** Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6996-7003.
- 312-Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG.** Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet Rec.* 1992 Jul 18;131(3):45-7.
- 313-Roswurm JD, de Kantor N, Marchevsky N, Spinelli R, Spath E.** Tuberculin test sensitivity in cattle with *Mycobacterium bovis* in Argentina *Bol Oficina Sanit Panam.* 1979 May;86(5):420-8.

- 314-Norby B, Bartlett PC, Fitzgerald SD, Granger LM, Bruning-Fann CS, Whipple DL et al.**  
The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest.* 2004 16:126-31.
- 315-Vitale F, Capra G, Maxia L et al: 1998,** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J Clin Microbiol* 36:1050-1055.
- 316-González Llamazares OR, Gutiérrez Martín CB, Alvarez Nistal D, de la Puente Redondo VA, Domínguez Rodríguez L, Rodríguez Ferri EF.** Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet Microbiol.* 1999 Oct;70(1-2):55-66.
- 317-Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB.** False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):988-91.
- 318-Romero Tejeda A, Díaz CA, Guevara Vivero J, García Zalazar JA, Torres León RA, Estrada Chávez C.** Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudado nasal mediante PCR anidada, en un hato lechero. *Veterinaria México*, enero-marzo, 2006/vol.37, número 001, pp 137-143.
- 319-Romero RE, Garzon DL, Mejía GA et al.** Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species- specific primers. *Can J Vet Res* 1999,63: 101-106.
- 320-Flynn JL, Ernst JD.** Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol.* 2000 Aug;12(4):432-6.

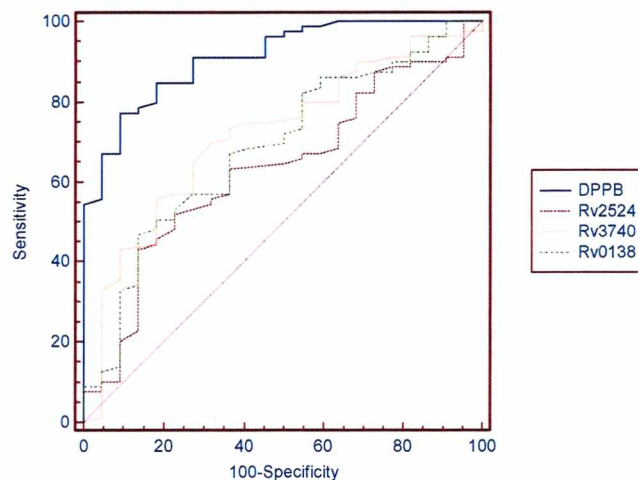
**Fe de Erratas**

*Fig XVIII-* Curva ROC de las proteínas recombinantes en 79 animales naturalmente infectados (DPP+) y 22 animales libres de infección (DPP-)

EsxV, Rv1636 y DPPB

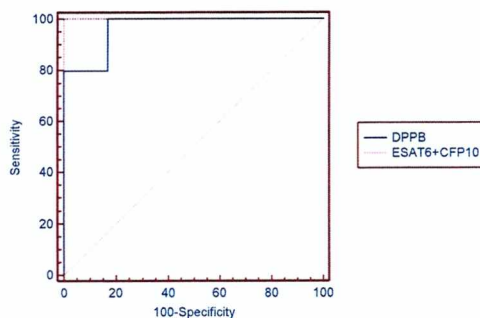


Rv2524, Rv3740, Rv0138 y DPPB

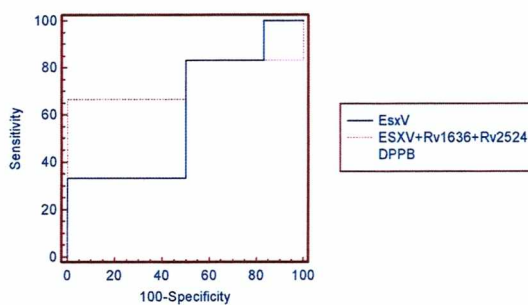


*Tabla XIX*- Curvas ROC obtenida de los datos de IFN- $\gamma$  liberado por células mononucleares de sangre periférica estimuladas con antígenos recombinantes

### ESAT6 +CFP1010 y DPPB



### EsxV, EsxV+Rv2524+Rv1636 y DPPB



### Rv1636, HspX, Rv1636+HspX y DPPB

