

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



"EVALUACIÓN DE DOS PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE TUBERCULOSIS BOVINA"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

ROSA MARÍA BERMÚDEZ HURTADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. TOMÁS BENJAMÍN RENTERÍA EVANGELISTA

Mexicali Baja, California

Septiembre de 2010

La presente tesis titulada “**Evaluación de dos pruebas para el diagnóstico de la tuberculosis bovina**” realizada por la alumna **Rosa María Bermúdez Hurtado**, ha sido aprobada bajo la dirección del consejo particular indicado y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ PARTICULAR

Director de Tesis: _____

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista

Asesor: _____

Dr. Gilberto López Valencia

Asesor: _____

Dr. Sawako Hori-Oshima

Asesor: _____

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

Contenido

	<i>PÁGINA</i>
<i>Introducción</i>	1
<i>Revisión de literatura</i>	3
<i>Historia de la tuberculosis</i>	4
<i>Etiología</i>	4
<i>Características del microorganism</i>	4
<i>Patogenesis</i>	5
<i>Factores de virulencia</i>	6
<i>Epidemiología</i>	7
<i>Diagnóstico</i>	9
<i>Control y erradicación</i>	17
<i>Literatura citada</i>	22
<i>Anexo</i>	
<i>Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis</i>	30
<i>Evaluation of a lateral flow assay for the diagnosis of Mycobacterium bovis infection in dairy cattle</i>	43

Introducción

La tuberculosis (TB) en humanos y en animales sigue siendo uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial. La TB humana es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*) y anualmente mueren por esta enfermedad 1.7 millones de personas (OIE, 2004). La TB bovina es causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), infecta aproximadamente 50 millones de animales en todo el mundo y provoca pérdidas económicas aproximadamente de 3 mil millones de dólares anualmente (Steele, 1995).

La TB bovina es una zoonosis y afecta a la población humana mediante el contacto con animales enfermos, consumo de leche y sus derivados sin pasteurizar. En México, el 28% de la leche se comercializa sin pasteurizar para la preparación de quesos y derivados (NOM-EM-017-ZOO-2005), lo que implica un alto riesgo para la salud pública. A nivel mundial se ha estimado que el 10% de los casos de TB humana es provocado por *M. bovis* (Cosivi *et al.*, 1998).

En México, la campaña de control de tuberculosis utiliza un esquema de aplicación intradérmica de derivado proteico purificado (PPD; Weddle y Livingstone, 1994) o tuberculina así como el sacrificio de animales reactores (NOM-EM-017-ZOO-2005); esta estrategia no ha logrado erradicar la enfermedad en ganado bovino.

Una de las razones por las que no ha sido exitosa esa estrategia es la falta de un programa de indemnización que permita reducir las pérdidas económicas por el sacrificio de animales positivos. La prueba en el pliegue ano caudal tiene una sensibilidad de 72% al 91% y especificidad del 78% al 96% (Francis *et al.*, 1978; Costello *et al.*, 1997) y se estima que un 19% de los bovinos tuberculosos no reaccionan a la tuberculina (Neill *et al.*, 1992, 1994), lo que conduce a falsas lecturas (Ritacco *et al.*, 1991). Por lo anterior, es necesario continuar con la búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico.

Diversas pruebas para el diagnóstico de TB han sido estudiadas, tales como la de gamma Interferón (IFN- γ , Bovigam[®]) y las pruebas de flujo lateral las cuales utilizan cocteles de antígenos (Pollock *et al.*, 2001; Wood y Jones 2001, Lyashchenko 2004).

Los ensayos que detectan IFN- γ bovino como respuesta celular a PPD (Roethel *et al.*, 1990; Word *et al.*, 1990) han demostrado ser de lo más prometedor en el diagnóstico de la TB. Sin embargo aunque ha sido utilizada en más de 200 000 bovinos en distintos países como Brasil, Irlanda, Italia, Nueva Zelanda, Rumania, España y Estados Unidos (Wood, *et al.*, 1991, 1992; Neil *et al.*, 1994, 1995; Moda *et al.*, 1999, Wood y Jones 2001) se requiere incrementar su especificidad (González *et al.*, 2000).

Revisión de literatura

Historia de la tuberculosis

Se estima que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Se considera que los miembros del complejo *M. tuberculosis* se derivaron de un ancestro africano hace 20 000 años. Existe evidencia de la presencia de tuberculosis hace 5000 años en Egipto. En América existe evidencia de tuberculosis en la región de los Andes. La incidencia de la enfermedad aumento drásticamente con la industrialización al incrementarse el número de pobladores en las ciudades. Laennec en 1821 expuso la patología de la tuberculosis humana y describió los signos de la enfermedad pulmonar. En un tiempo la enfermedad sirvió de inspiración para las obras “La Traviata” y “La Dama de las Camelias”. Entre los jóvenes ilustres afectados están Federico Chopin y John Keats, entre otros (Daniel, 2006).

El posible vínculo entre tuberculosis bovina y humana fue supuesta por el doctor René Laennec en 1860 al observar similitudes entre ambas enfermedades. Jean Villemin, veterinario militar francés propuso que la tuberculosis tenía habilidad para cruzar la barrera de las especies y que la tuberculosis era transmitida entre el hombre y los animales. Fue hasta 1882 cuando Robert Koch demostró el bacilo tuberculoso como agente etiológico de la enfermedad, asumiendo que era el mismo microorganismo para ambos casos (Waddington, 2003) lo cual hacía peligroso el consumo de carne y leche. Para evitar el peligro del consumo de alimentos con tuberculosis la leche fue pasteurizada y las canales inspeccionadas por veterinarios (Pritchard,1988)

El bacilo tuberculoso aislado por Koch en 1882 fue llamado *Mycobacterium tuberculosis* por Lehmann and Neumann en 1896. La Comisión Real Británica en 1911 se refiere a la cepas bovinas como *M. bovis*, aunque el nombre no es legitimado hasta 1970 (Pritchard, 1988).

Etiología

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina y forma parte del grupo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Niemann *et al.*, 1999) junto con *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*, todas causantes de tuberculosis en humanos y animales.

Características del microorganismo

M. bovis es un bacilo no esporulado, no motil, es de crecimiento lento tardando hasta 8 semanas en aparecer en medios de cultivo con base de huevo a 37 grados centígrados y requiere de adición de piruvato al medio cuando el glicerol es la única fuente de carbón (Hewinson *et al.*, 2006).

Tienen alto contenido en guanina-citocina en su DNA y alto contenido lipídico en su pared cuya composición varía durante su ciclo de vida de acuerdo a la disponibilidad de los nutrientes. Esta cubierta explica sus características de tinción ácido resistente y su resistencia tanto frente a antibióticos como a los mecanismos microbicidas del huésped.

Patogénesis

La exposición a aerosoles conteniendo *M. bovis* es la ruta de infección más frecuente (Pritchard, 1988), aunque también son vías de infección el consumo de alimento contaminado, el contacto sexual (Francis, 1972), la congénita, entre otras. Al ingresar el microorganismo es ingerido por los fagocitos los cuales intentan destruir el bacilo, sin embargo éste posee la habilidad de escapar de este proceso al prevenir la fusión del fagosoma con los lisosomas y su posterior acidificación (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Los fagocitos conducen a los bacilos vía sanguínea o linfática a ganglios linfáticos asociados con la ruta de entrada, formándose un foco primario. Los bacilos sobreviven en los fagocitos y eventualmente los destruyen. Existe la hipótesis del movimiento bidireccional a través de la membrana del fagosoma permitiendo transferencia de productos tóxicos como el factor de acordonamiento entre otros (Teitelbaum *et al.*, 1999). La respuesta celular envía un gran número de fagocitos formándose una lesión granulomatosa la cual llega a ser visible conforme aumenta el número de células fagocíticas. Los macrófagos se transforman a células parecidas a las epiteliales debido a la persistencia de citocinas como gamma interferón y pueden fusionarse formando células gigantes cuyos numerosos núcleos aparecen en forma de herradura de caballo y en ocasiones pueden contener algún bacilo en su citoplasma. El desarrollo de esta respuesta de hipersensibilidad contribuye a la necrosis caseosa y en ocasiones a necrosis licuefactiva por acción enzimática formándose cavidades que de romperse favorecen la diseminación de bacilos vía aerosoles. A la superficie de corte se observa material amarillizo y áreas de calcificación las cuales pueden curarse completamente o progresar, he incluso persistir sin progresar (Francis, 1958). Si la enfermedad se generaliza en todo el organismo se denomina tuberculosis miliar (Jubb *et al.*, 1991).

Factores de virulencia

Dentro de los factores de virulencia se encuentra el factor de acordonamiento presente en cepas virulentas. Diversos estudios han demostrado que este factor inhibe la migración leucocitaria (Noll *et al.*, 1956); en células hepáticas disminuye la actividad respiratoria y la fosforilación oxidativa (Kato y Fukushi 1969) además de causar desintegración y separación de ribosomas en retículo endoplásmico rugoso. Así mismo se demostró que las cepas que no poseen la capacidad de sintetizar este factor no logran persistir en el huésped o causar la muerte del mismo (Glickman *et al.*, 2000)

Otro factor que contribuye a la virulencia es el Lipoarabinomannan (LAM) el cual contribuye al arresto en la maduración del fagosoma y actúa como eliminador de radicales libres derivados del oxígeno y nitrógeno los cuales son necesarios para la función microbicida de las células fagocíticas (Chan *et al.*, 1989; 1991).

Los Complejos proteicos así como proteínas del bacilo contribuyen a la virulencia por diversos mecanismos tales como el desarrollo de la respuesta inmune, protección de micobacterias fagocitadas a las enzimas hidrolíticas y producción de superóxido dismutasa para protegerse de radicales libres del oxígeno entre otros (Andersen *et al.*, 1991).

Epidemiología

Existen diversas rutas de transmisión de la infección por *Mycobacterium bovis*, las más frecuentes son la respiratoria y la digestiva. La respiratoria es debido a la inhalación de aerosoles contaminados, principalmente en animales que permanecen en contacto directo con aquellos que están infectados (Frye 1995, Gannon *et al.*, 2007). La transmisión digestiva ocurre por ingestión de agua o alimento contaminado con secreciones nasales, heces, orina o leche que contengan al micro organismo (Rentería y Hernández de Anda 1996). Otra forma menos común es la transcutánea al manipular canales infectadas permitiendo la entrada del bacilo a través de abrasiones en el operador (Grange y Yates, 1994).

En la actualidad existe una variación considerable en la prevalencia y en la cobertura de vigilancia de la TB entre los países de América Latina y el Caribe. Los países se pueden agrupar de acuerdo a la prevalencia de reactores a tuberculina: 1) más abajo de 0.1% o nada, 2) entre 0.1% y 1%, y 3) más alto de 1% o desconocido (Ritacco *et al.*, 2006). El grupo de baja o nula prevalencia incluye la mayoría de los países del Caribe (Antigua, Bahamas, Islas Vírgenes, Dominicana, Grenada, Guadalupe, Montserrat, Antillas Holandesas, Santa Lucía, San Vicente, Trinidad-Tobago, Cuba), Panamá, Honduras y Belice en América Central. En América del sur se encuentran Colombia, Surinam, Uruguay y Venezuela; en estas aéreas existen aproximadamente una población de ganado de 61.6 millones. Dentro del grupo con prevalencia intermedia se incluye a México, Paraguay, República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica y El Salvador. En estos países existe una población de 47.4 millones de animales.

Los países de alta prevalencia o que no reportan esta información son Haití, Guatemala, Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Ecuador, Perú y Guyana, con un censo de aproximadamente 265.1 millones de animales. Alrededor del 70% del ganado en América Latina se encuentra en áreas con alta prevalencia de la enfermedad y un 17% en áreas virtualmente libres de TB (De Kantor y Ritacco 2006). En México, con 30.8 millones de animales dedicados a la producción de

carne y 1.2 millones de ganado dedicado a la producción de leche, se han dado avances significativos en la reducción y el control de la TB principalmente en el norte del país, en el 2001 ocho estados fueron clasificados en fase uno de erradicación y nueve en fase uno de control (OIE, 2004).

La epidemiología de la TB es muy compleja por involucrar la interacción de seres humanos, animales domésticos y animales salvajes, lo cual hace difícil el entendimiento completo de la enfermedad. Es por lo tanto difícil establecer los factores que influyen en su presentación en regiones donde no se han llevado a cabo estudios epidemiológicos para tal fin (Morris *et al.*, 1994).

Diagnóstico

Inicialmente el diagnóstico de la tuberculosis bovina se basaba en el examen físico de los animales, éste era poco confiable y no contribuía a disminuir la prevalencia de la infección ya que únicamente aquellos animales con enfermedad avanzada eran diagnosticados de forma positiva. Con la aparición de la tuberculina en 1890 y su demostrado poco valor curativo el interés se desvió hacia el valor diagnóstico de la misma (Waddington, 2004). El veterinario danés Bernhard Bang convencido de la efectividad de la tuberculina propuso que todos los animales fueran probados y los positivos separados del hato para prevenir la infección, sacrificando únicamente casos avanzados. Además sugirió que la aplicación de la prueba se realizara anualmente. Esta idea fue apoyada por el gobierno danés que en 1893 aportó un fondo para motivar a los granjeros a eliminar la tuberculosis. Esta misma idea fue aplicada en el resto Europa. Anteriormente la prueba consistía en aplicación subcutánea de .2 - .5 mL de tuberculina seguida por una lectura de la temperatura corporal del animal probado en un lapso de 15 a 18 horas post inoculación. La tuberculina no se producía siguiendo algún estándar por lo que su composición variaba dándose numerosas reacciones inciertas. En 1907 la prueba intradérmica introducida para humanos fue adaptada para bovinos, con esta aplicación la reacción que se manifestaba por los animales infectados era una inflamación alérgica la cual se leía con más exactitud que los cambios de temperatura y ahorraba tiempo y esfuerzo (Waddington, 2004)

La tuberculina de Koch llamada “old tuberculin”, se fabricaba colocando bacilos en caldo de glicerol en el cual las bacterias crecían. Estas eran removidas y el caldo sometido a evaporación y filtración y el producto final era una mezcla compleja de proteínas. Posteriormente se utilizó un medio sintético con adición de asparagina como fuente de nitrógeno bacteriano, lo que conducía a obtener un producto con menor grado de mezclas de proteínas. Se continuo mejorando el proceso de producción hasta llegar a la tuberculina actual que se describe como derivado proteico purificado (PPD), que se produce a partir de la

cepa *M. bovis* AN5 (Monaghan et al, 1994) confiriendo mejor especificidad que la tuberculina preparada a partir de *M. tuberculosis* (OIE, 2004).

Actualmente el diagnóstico de la tuberculosis bovina puede realizarse por identificación del agente utilizando la microscopia, cultivo bacteriológico o identificación de ácidos nucleídos (OPS y OMS, 1992). Adicionalmente existen pruebas que miden la respuesta inmunológica tales como las que miden la respuesta celular (tuberculina, proliferación de linfocitos, gamma interferon), así como las que miden la respuesta humoral ante el proceso infeccioso (OIE, 2004).

Bacteriología

El cultivo bacteriológico es considerado la prueba de oro para la confirmación del diagnóstico de la tuberculosis (OIE, 2004). El tejido es homogenizado utilizando un mortero o licuadora, posteriormente se somete a descontaminación pudiendo usarse ácido o álcali; posteriormente la muestra es neutralizada, centrifugada, y una vez descartado el sobrenadante se siembra el sedimento. Los tubos se incuban por un periodo de 8 semanas a 37°C y son revisados una vez por semana a partir del 3er al 5to día post inoculación. Una vez que se observa algún crecimiento se procede a confirmar por tinción y microscopia para su posterior identificación por métodos bioquímicos con el inconveniente de que los resultados se obtienen en un periodo de 4 a 8 semanas. También se puede realizar la identificación por amplificación en cadena de la polimerasa o por tipificación molecular con resultado en 40 horas (Thompson, 2006).

Laboratorios y hospitales utilizan sistemas de cultivo líquido como BACTEC los cuales miden el crecimiento por fluorimetría y son considerados más sensibles. Este se basa en el principio de medir la actividad metabólica dentro del medio donde crece el microorganismo. (Tortoli *et al.*, 1998)

Mycobacterium bovis puede ser demostrado por microscopia a partir de frotis o de tejidos embebidos en parafina utilizando la tinción Ziehl-Neelsen o la de auramina. Un diagnóstico presuntivo puede realizarse con base a las características histológicas propias de una lesión granulomatosa donde se observa necrosis caseosa, mineralización, células epiteloideas, células multinucleadas o gigantes aunque no siempre se demuestra el organismo (OIE, 2004). La sensibilidad ha sido estimada en un 50-60% comparada con cultivo (Siddiqi *et al.*, 2003)

Reacción en cadena de la polimerasa

Se basa en amplificar DNA bacteriano extraído a partir de tejidos frescos, moco, esputo, aspirados, tejidos embebidos en parafina, etc. Como no se requiere de cultivo bacteriológico, los resultados pueden tenerse en un período corto. El blanco más frecuentemente usado es la secuencia de inserción IS6110 la cual se encuentra presente en el genoma de los agentes pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* entre los que se encuentran *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium pinnipedi* (Cousins *et al.*, 2003). Esta prueba puede utilizarse como complementaria o confirmatoria del cultivo bacteriológico (Kaneene y Thoen 2004). Para la diferenciación entre las siete especies de *micobacterias* de este complejo se requiere aplicar otras pruebas, sin embargo la especie animal diagnosticada con tuberculosis y la región geográfica da una fuerte indicación del miembro del complejo *M. tuberculosis* involucrada. *M. tuberculosis* afecta al humano, primates y otras especies; *M. africanum* y *M. canetti* afectan principalmente a humanos; *M. bovis* causa tuberculosis en bovino, pero puede afectar otras especies incluyendo al hombre; *M. microti* infecta al ratón de campo; *M. caprae* se ha aislado en cabras y *M. pinnipedi* se ha encontrado en focas; los últimos tres puede afectar a otras especies además de la citada. Esta prueba sin embargo requiere personal calificado, equipo y material costoso (Cousins *et al.*, 2003).

Tuberculina

Entre las pruebas que se basan en medir la respuesta inmune de tipo celular, la prueba intradérmica en la que se utiliza un derivado proteico purificado (PPD) ha sido utilizada desde principios de los 1900's y continua siendo la herramienta de elección para la mayoría de los programas de control (Cousins y Florisson 2005) además de ser la recomendada por la Oficina Internacional de las Epizootias (OIE) para intercambio comercial de bovinos. Esta prueba se basa en inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía a la aplicación intradérmica de PPD que al inyectarse a un animal infectado con *M. bovis* se desarrolla una respuesta inflamatoria que alcanza su mayor intensidad entre las 48-72 horas (Monaghan et al., 1994)

La prueba única intradérmica (SIT, por sus siglas en inglés) es la forma más simple de utilizar, la cual consiste en aplicar tuberculina bovina intradérmica en la región cervical media (SIT cervical) o en el pliegue ano caudal (SIT caudal) seguido por una lectura a las 72 horas (Monaghan et al., 1994). La SIT en el pliegue ano caudal es la utilizada de rutina cuando los animales son sometidos a muestreos individuales en diversos países como México, Canadá y Estados Unidos, entre otros (de la Rúa *et al.*, 2006). La SIT tiene como desventaja requerir al menos dos visitas a la granja por un médico veterinario con un intervalo entre las visitas de 3 días, los animales deben ser sujetados en ambas ocasiones y la interpretación del resultado puede ser subjetiva (Jolley *et al.*, 2007).

La sensibilidad y especificidad de la SIT en el pliegue ano caudal se estima entre 63% al 96.8 % y del 96 al 98%; mientras que la SIT cervical se encuentra entre el 80.2% al 100% y 75% al 96% y la SICCT va del 52 al 100 % y del 88 al 100% respectivamente (Monaghan et al., 1994).

En regiones con hatos que tienen la tuberculosis presente confirmada por inspección post mortem o bacteriología, los reactores a la tuberculina son altamente predictivos de infección por *M. bovis*; sin embargo al declinar la proporción de positivos disminuye el valor predictivo positivo y se tiende a utilizar otras pruebas (Buddle *et al.*, 2001).

La prueba intradérmica cervical comparativa (SICCT) consiste en la inyección de PPD bovino y PPD aviar en la tabla del cuello una al lado de la otra. La prueba es utilizada para saber si el animal está infectado con *M. bovis* o con otras micobacterias, dando una respuesta mayor a PPD bovina de tener *M. bovis* y menor de tener *M. avium* u otras micobacterias (Pollock *et al.*, 2003).

Prueba de proliferación de linfocitos

La prueba de proliferación de linfocitos fue explorada para usarse como diagnóstico *in vitro* de tuberculosis bovina. El principio del ensayo consiste en medir cambios en la proliferación de linfocitos una vez que fuesen estimulados con PPD bovino. La blastogénesis de los linfocitos se mide utilizando precursores de DNA marcados ya sea radiactivamente (timidina tritiada) o con un colorante fluorescente (ioduro de propidio). El índice de estimulación se determina al comparar la respuesta a un antígeno específico contra los controles no estimulados. Aunque los resultados obtenidos con esta prueba arrojaban buena correlación al compararse con la tuberculina en investigaciones experimentales con animales desafiados, no sucedía lo mismo con animales con infección de campo. Esta prueba que se pensó podría sustituir a la prueba de tuberculina tenía varios inconvenientes tales como incubación de células en medio de cultivo tisular por 3 a 5 días, el uso de nucleótidos radiactivos para detectar la proliferación, la complejidad de la misma y el costo (Wood y Rothel 1994).

Prueba de gama interferon

La prueba de γ -Interferón (INF- γ) fue desarrollada en Australia a finales de los 80's para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Wood *et al.*, 1991). La prueba se realiza en dos etapas: 1) se procede a la toma de muestras de sangre en tubos conteniendo heparina de litio, los cuales son transportados al laboratorio inmediatamente después del sangrado. En un lapso no mayor de 28 horas de haber realizado el sangrado son colocadas en alícuotas por duplicado y estimuladas con antígenos a probar (PPD bovino) y un juego con nil-antígeno como control negativo. Se incuban por 16 a 24 horas a 37°C, posteriormente se cosecha el plasma sobrenadante y se almacena hasta su análisis; 2) la segunda etapa los niveles de INF- γ son cuantificados en un ensayo de captura tipo ELISA. Al igual que la prueba de proliferación de linfocitos el índice de estimulación se determina al comparar la respuesta a un antígeno específico contra los controles no estimulados (Rothel *et al.*, 1990)

Este ensayo se utiliza para detectar tuberculosis bovina en diversos países y en los Estados Unidos de Norteamérica ha sido aprobado como prueba de diagnóstico suplementaria como parte del programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina. Estudios realizados han demostrado que la prueba de tuberculina en el pliegue caudal es significativamente más sensible que la de INF γ y que la sensibilidad de esta última mejora cuando los resultados son interpretados paralelamente con la de tuberculina (Whipple *et al.*, 1995).

Una prueba de detección de INF- γ que utiliza PPD aviar y PPD bovino está patentada con el nombre de Bovigam® (Prionics, Switzerland). Esta prueba ha sido evaluada en diversos estudios de distintos países. La sensibilidad de la prueba se reporta entre 73% y 100% con un valor medio de 87.6%. La especificidad va del 85 al 99.6% con una media de 96.6% (de la Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Si bien puede considerarse que la sensibilidad de esta prueba es comparable a la tuberculina, el aporte más importante de la misma es detectar animales en etapas tempranas de infección que la prueba intradérmica no

detecta (Pollock *et al.*, 2005), detectando aún aquellos infectados con bajas dosis de *M. bovis* de acuerdo a los resultados obtenidos por Dean *et al.*, 2005.

Tanto la prueba de INF- γ como la de tuberculina comparten la desventaja de su baja probabilidad de detectar animales infectados con un estado deprimido de su respuesta inmune celular (de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Pruebas que miden la respuesta humoral

Se han realizado diversos estudios para evaluar el diagnóstico de la tuberculosis bovina midiendo la producción de anticuerpos ante la infección (Pollock *et al.*, 2001). El inicio involucró pruebas como la floculación con bentonita, aglutinación de kaolina, prueba indirecta de fluorescencia y fijación de complemento. Todas estas tenían baja especificidad y sensibilidad y el único dato interesante de estos estudios fue el hecho de que la correlación entre títulos elevados de anticuerpos con severidad de la infección (Woods y Rothel 1994).

En la década de los 80's se reporta el uso del ensayo de inmunoadsorción de enzimas asociadas (ELISA) para el diagnóstico de tuberculosis bovina utilizando como antígeno PPD. Después de estudios extensivos se encontró una sensibilidad de 73.6% y una especificidad del 89.8% por lo que se recomienda como prueba complementaria a de la de tuberculina mientras que en el 2008 se reportó una sensibilidad del 72.60% y una especificidad del 96.43% (Aurtenetxe *et al.*, 2008)

Desde los primeros estudios serológicos se reconoció que existía reacción cruzada entre especies de micobacterias y que se requería desarrollar ensayos más específicos. Para eliminar este problema se identificaron y caracterizaron diversos antígenos únicos a *Mycobacterium bovis* que pueden ser útiles en el diagnóstico serológico (Whelan *et al.*, 2008) entre los cuales se encuentran ESAT-6, CFP-10, MPB70, MPB64, MPB83, entre otros. Con la finalidad de incrementar la sensibilidad de estos ensayos algunos investigadores

han utilizado una combinación de antígenos que responda a la variación de la respuesta humoral en bovinos (Fifis *et al*, 1992; Lyashchenko *et al.*, 1998).

A pesar de que las pruebas que miden la respuesta a anticuerpos ofrecen una ventaja en cuanto al precio y son fáciles de realizar, hasta el momento no han demostrado ser una alternativa a las pruebas de diagnóstico basadas en medir la respuesta de inmunidad celular (de la Rúa *et al.*, 2006).

La prueba de fluorescencia polarizada ha sido utilizada para inmunodiagnóstico en medicina veterinaria y tiene la ventaja de su fácil realización, poco tiempo de incubación y no requiere lavados ni pasos adicionales. Surujballi *et al.*, (2002) utilizaron como antígeno MPB70 etiquetado con fluoresceína para evaluar esta prueba la cual logró detectar 26 animales positivos de un total de 28 confirmados por cultivo. Asimismo reconoció como negativos todos los sueros positivos a *M. paratuberculosis*, por lo que no se presentó reacción cruzada. Joyel *et al.*, (2007) utilizaron como antígeno un polipéptido derivado de la proteína MPB70 que corresponde a secuencias de aminoácidos que han mostrado mayor reactividad con sueros controles de bovinos positivos, reportando una especificidad del 99.9% pero una sensibilidad del 69.2%.

Harrington *et al.*, (2008) realizaron un estudio donde comparan varias pruebas de diagnóstico de tuberculosis en cérvidos. Entre éstas se incluían FPA, un ensayo de flujo lateral que lleva un coctel de antígenos. Los resultados arrojaron una sensibilidad del 33.3 %, 72.5% respectivamente.

Deberán realizarse más estudios para mejorar el alcance de la prueba de FPA, aunque dada su especificidad, podría utilizarse como prueba auxiliar para separar a los animales negativos.

Control y erradicación

Los programas de control se basan en prevención y vigilancia. En etapa de prevención se pretende reducir la exposición de bovinos al patógeno disminuyendo con esto el riesgo de ser infectado. Esto se logra siguiendo algunas prácticas como son aplicación de tuberculina, mantener en cuarentena animales importados, manejo higiénico de agua y alimento, manejo adecuado de heces, entre otras labores. La vigilancia epidemiológica permitirá conocer la dinámica de la enfermedad realizando pruebas antes y después del sacrificio de los animales (Kanne y Thoen; 2004).

En países donde la prevalencia de la enfermedad es alta y no existe bolsa de indemnización, la utilización de la vacuna de *Mb*-BCG junto con un programa de buenas prácticas de manejo (pasteurización de calostro, desinfección de corraletas, separación de animales sanos y enfermos, entre otras) puede contribuir a disminuir la prevalencia de la enfermedad en los hatos (López et al., 2010).

Vacunas

La única vacuna con licencia para ser aplicada en humanos es la denominada Bacilo de Calmette Guerin (BCG) la cual contiene una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* aislado de una vaca con tuberculosis por los investigadores Calmette y Guerin del Instituto Pasteur. La cepa fue subcultivada cada tres semanas y después de trece años la cepa era incapaz de causar tuberculosis en animales de laboratorio. En 1928, BCG fue adoptada por el comité de Salud (predecesor de WHO) siendo ampliamente utilizada hasta después de la segunda guerra mundial (WHO, 2005).

La vacuna actual contra la tuberculosis en humanos pertenece a esta categoría. La BCG es una vacuna viva atenuada lograda después de 230 pasajes sucesivos en laboratorio de una cepa patogénica de *Mycobacterium bovis*. Estas vacunas microbianas atenuadas tiene la ventaja de desencadenar

todas las respuestas inmunitarias. Algunos estudios han demostrado que una sola dosis produce inmunidad por largo tiempo (Aronson, 2004) mientras que otros reportan que la protección desciende con el tiempo (Andersen, 2005).

El nivel de protección conferida por BCG es muy variable y en India se reporta que no confiere protección mientras que en el Reino Unido confiere una protección del 50-80% (Gordon, 1999).

La razón por la cual falla la BCG en humanos se ha debatido y se ha propuesto que: a) La exposición natural a *Mycobacterium* medioambiental tiene una importante influencia en la respuesta inmune, pudiendo ser antagónico (Buddle, 2002; de Lisle, 2005; Flaherty, 2006), b) se propone que BCG inhibe la apoptosis de células infectadas dando como resultado poca presentación antigénica en MHC tipo I y por consecuencia no hay interacción macrófago con CD8+ (Boom, 2007) y c) BCG no cuenta con la región de diferencia 1 (RD1) presente en la cepa de campo en la cual se codifican varias proteínas de infección temprana (6 kDal o ESAT 6) y CFP 10 (Maue, 2005). Además de no contar con esta región se han eliminado una serie de genes a través de los pasajes, dando diferencias genéticas entre la cepa original y las actuales pudiendo ser motivo de diferencias en el grado de protección (Mahairas, 1996; Behr, 1999, Gordon, 1999).

Estudios han descrito el desarrollo de cepas atenuadas de *M. tuberculosis*. Una mutante de *M. tuberculosis phoP* ha sido construida por la eliminación de un solo gen (Pérez, 2001), el cual está involucrado en la regulación de lípidos mycobacterianos implicados en la virulencia del *M. tuberculosis* (Gonzalo Asensio, 2006).

Las vacunas compuestas por subunidades tienen la ventaja sobre las que utilizan microorganismos vivos en términos de seguridad, dirigirlas al blanco preciso y fácil de manufacturar. Se componen de antígenos del microorganismo que han sido identificados previamente y se combinan con algún adyuvante.

Olsen (2004) estudió el efecto protector en cuyos de la fusión ESAT-6 y Ag85B administrada en vesículas catiónicas lipídicas basadas en bromuro de dioctadecylamonio. Los cuyos fueron inmunizados y desafiados 12 semanas después de la vacunación inicial. Los resultados obtenidos indican que el cóctel de las dos moléculas, así como las moléculas administradas por separado fallaron para dar suficiente protección.

Langermans (2004) realizó un estudio para evaluar la protección en macacos contra *Mycobacterium tuberculosis* usando una vacuna basada en una fusión de un antígeno proteico ETSAT-6 y Ag85B en dos diferentes adyuvantes, sus resultados demostraron que esta vacuna indujo respuestas protectoras por lo que es un buen candidato para futuras evaluaciones clínicas.

Otro estudio conducido por Agger (2006) utilizando Ag85B-ESAT-6 en un sistema de adyuvante catiónico IC31 demostró que se desarrollan niveles significativos de protección en ratón cuando se desafía por aerosol. Sin embargo respuestas celulares fuertes no se logran en bovinos con esta inmunización. La incorporación de IL 12 bovino recombinante a una vacuna de *M. bovis* CFP 10 con un adyuvante logró incrementar la respuesta antígeno-anticuerpo, con una débil respuesta de INF- γ específico al antígeno en bovino (Wedlock, 2000).

Una posible utilidad que puedan tener estas vacunas de subunidades sería el utilizarlas para reforzar la vacunación con BCG. Esta estrategia fue probada en terneros y se encontró que se inducen buenos niveles de protección con respuesta celular al desafío con *M. bovis* virulento (Skinner, 2003; Wedlock, 2005, Vordermeier, 2006).

MPB70 y MPB83 logran inducir CD4+ pero poco INF- γ el cual es requerido para la activación de los macrófagos y la consecuente eliminación de los microorganismos (Vordermeier, 2001). Cuando se aplicó un refuerzo con MPB70 únicamente se incrementó la respuesta de anticuerpos (Hewinson, 2003).

En otro estudio se aplicó Hsp65 y posteriormente se reforzó con BCG, encontrándose que la combinación daba mejores resultados que si se utiliza cada uno solo (Hewinson, 2003).

El uso de técnicas recombinantes ha sido explorado para desarrollar vacunas más efectivas. Un ejemplo es la vacuna rBCG30, la cual expresa y secreta la proteína Ag85B de 30 k Da la cual es un antígeno importante como se demostró al probar la efectividad de la misma ya que los animales que fueron inmunizados con la vacuna rBCG30 sobrevivieron más que los que sólo recibieron BCG (Howits, 2003; 2005).

Maue (2007) observó mejores respuestas cuando uso una combinación de BCG y ESAT-6:CFP10 DNA vacuna que cuando se administra BCG sola.

Una segunda aproximación es que una vacuna recombinante mejore la respuesta de las células CD8+. Hess *et al.*, (1998) construyeron una vacuna recombinante que permite que la BCG en fagosoma secrete listerolisina lo cual provoca un aumento de la permeabilidad de la membrana del fagosoma y los antígenos mycobacterianos pueden llegar al MHC tipo I para ser presentados a los linfocitos T CD8 y mejore la respuesta de CD8+, tal y como fue demostrado en ratones.

La adición de adyuvantes en vacunas contra la tuberculosis es con la finalidad de inducir una respuesta inmune celular fuerte. Estos han sido estudiados en combinación con vacunas a base de proteínas filtradas del cultivo y con vacunas de DNA entre otras.

Un estudio realizado para evaluar el efecto de diferentes adyuvantes sobre la respuesta inmune en bovinos vacunados con proteínas filtradas de cultivo fue realizado. Los adyuvantes utilizados fueron bromuro de amonio de dimetilaminoetil (DDA) y dietilaminoetil (DEAE)-dextrán y se comparó con animales vacunados con BCG. Los resultados concluyeron que se requieren adyuvantes más eficaces para promover respuestas de IFN- γ (Wedlock, 2002).

Liposomas catiónicos conteniendo lípidos micobacterianos tienen la habilidad de mantener las células de memoria inmunológica. La protección conferida por este adyuvante fue comparada con individuos inmunizados solo con BCG en un estudio conducido por Rosenkrands (2004) y los resultados indican que la liberación sostenida del antígeno favorece la estimulación continua del sistema inmune con nivel de memoria de largo plazo superior a la inducida solo por BCG.

Literatura citada

Agger E. M., Rosenkrands I., Weinreich O. A., Hatch G.; Williams A., Kritsch C., Lingnau K., Gabain A., Swetman A. C., Smith K. K., Andersen P. 2006 Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*. 24:5452-5460.

Ameni G., Miöprner H., Roger F., Tibbo M. 2000. Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 32:267-276.

Andersen P., Asskgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J., Heron I. 1991. Proteins Released from Mycobacterium tuberculosis during Growth. *Infec Immun* 59:1905-10.

Andersen P, Doherty T. M. 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol*; 3: 656-62.

Aronson N. E., Santosham M., Comstock G. W., et al. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska Natives: A 60-year follow-up study. *JAMA* 2004; 291: 2086-91.

Aurtenetxe O., Barral M., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C., Juste R. A. 2008. Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for antibodies against Mycobacterium bovis in European wild boar. *BMC Vet Res*.4:43.

Behr M. A., Wilson M. A., Gill , Salamon W. P H., Schoolnik G. K., Rane S., Small P. M. 1999. Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science*. Vol. 284:1520-1523.

Boom H. 2007. New TB vaccines: is there a requirement for CD8+ T cells? *J. Clin Invest*.117:2092-2094.

Buddle B. M., Skinner M. A., Wedlock D. N., Collins D. M., de Lisle G. W. 2002. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Vet Immunol Immunopathol*. 87: 177-85.

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

Chan J. T., Fujiwara P., Brennan M., McNeil S. J., Turco. 1989. Microbial glycolipids: posible virulence factor that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2453-7.

- Chan J. X., Fans D., Hunter S. W., Brennan P. J., Bloom R. B. 1991. Lipoarabinomannan, as possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* 59: 1755-61.
- Cousins D. V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., P Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D. M., Butler W. R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M. I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1305-14.
- Cosivi O., Grange J. M.; Daborn C. J., Raviglioni M. C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R. A., Huchzeimyer H. F., Cantor I., Meslin F. X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*. 4:59-70.
- Costello E., Egan J. W., Quigley F. C., O'Reilly P. F. 1997 Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet. Rec.* 141:222-4.
- Cousins D. V., Florisson N. 2005 A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24(3), 1039-1059.
- Daniel T. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory medicine*. 100:1862-1870.
- de Lisle G. W., Wards B. J., Buddle B. M., Collins D. M. 2005. The efficacy of live tuberculosis vaccines after pre-sensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)*; 85: 73-9.
- de la Rúa-Domenech R., Goodchild A. T., Vordermeier H. M., Hewinson R. G., Christiansen K. H., Clifton-Hadley R. S. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*. 81: 190-210.
- Dean D. S., Rhodes S. G., Coad M., Adam O. Whelan A. O., Cockle P. J., Clifford D. J., Hewinson R. G., Vordermeier H. M. 2005. Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Infect Immun*. 73:6467-71.
- Flaherty D. K., Vesosky B., Beamer G. L., Stromberg P., Turner J. 2006. Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *J Leukoc Biol*. 80: 1262-71.

Francis J. 1958. Tuberculosis in animals and Man. A study of Comparative Pathology. Castell, London.

Francis J., 1972. Route of infection in tuberculosis. *Vet. J.*, 48:578.

Francis J, Séller R. S., Wilkie I. W., O'Boyle D., Lumsden M. J., Frost A. J. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin. *Vet. Rec*; 103:420-425.

Frye G. H. Bovine tuberculosis eradication: the program in the United States. In: Thoen CO, Steele JH, eds. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames, Iowa State University Press, 1995.

Gannon B. W., Hayes C. M., Roe J. M. 2007. Survival rate of airborne *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*. 82:169-172.

Glickman M. S., Cox J. S., Jacobs W. R. Jr. 2000. A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Cell*, Vol. 5, 717–727.

González Llamazares O. R., Gutiérrez Martín C. B., Aranaz Martín A., Liébana E., Domínguez Rodríguez, Rodríguez Ferri E. F. 1999. Comparison of different methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin – or interferon – γ -reacting cattle in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 465-471.

Gonzalo A. J., Maia C., Ferrer N. L., Barilone N., Laval F., Soto C. Y., Winter N., Daffé M., Gicquel B., Martín C., Jackson M. 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2006; 281: 1313-6.

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

Grange M. J., Yates, D. M. (1994). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*. 40: 137-151.

Hess J., Miko D., Catic A., Lehmensiek V., Russell D. G., Kaufmann S. H. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5299-304.

Hewinson R. G., Vordermeier, H. M., Smith N. H., Gordon S. V. 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. *Veterinary microbiology*. 112:127-139.

- Hewinson R. G., Vordermeier H. M., Buddle B. M. 2003. Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics. *Tuberculosis*. Vol. 83:119-130.
- Hines N., Payeur J. B., Hoffman L. J. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTE MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *J. Vet Diagn Invest*; 18:243-50.
- Horwitz M. A., Harth G. 2003. A New Vaccine against tuberculosis Affords Greater Survival after Challenge than the Current Vaccine in the Guinea Pig Model of Pulmonary Tuberculosis. *Infect. Immu.* Vol. 71:1672–1679.
- Horwitz M. A., Günter H., Dillon B. J., Maslesa-Galic S. 2005. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. *Vaccine*. 24:1593-1600.
- Jolley M. E., Nasir M. S., Surujballi O. P., Romanowska A., Renteria T. B., De la Mora A., Lim A., Bolin S. R., Michel A. L., Kostovic M., Corrigan E. C. 2007. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Vet. Microbiology*. 120:113-121.
- Jubb K. V., Kennedy P. C., Palmer N. (1991). *Pathology of Domestic Animals*. 4 Ed. Vol. 2. Academic press inc. USA. pp 641-652.
- Kaneene J. B., Thoen C. O. 2004. Tuberculosis. *J Am Vet M A*. 224.
- Kato M., Fukushi L. 1969. Studies of a biochemical lesion in experimental tuberculosis in mice. X. Mitochondrial swelling induced by cord facto in vivo and accompanying biochemical change. *Am Rev Respiratory Dis* 100: 42-46.
- López-Valencia G., Rentería E. T., Williams J., Licea N. A., de la Mora V. A., Medina B. G. 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 88:44-9.
- Mahairas G. G., Sabo P. J., Hickey M. J., Singh D. C., Stover C. K. . 1996. Molecular Analysis of Genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol*. Vol. 178:1274-1282.
- Maue A. C., W. Ray Waters, William C. Davis, Mitchell V. Palmer, F. Chris Minion, Mark Estes D. M. 2005. Analysis of Immune Responses Directed toward a Recombinant Early Secretory Antigenic Target Six-Kilodalton Protein–Culture Filtrate Protein 10 Fusion Protein in *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. *Infect Immuno* 73.

Maue A. C., Waters W. R., Palmer M. V., Brian J. Nonnecke B. J., Minion F. C., Brown E. C., Norimine J., Foote M. R., Scherer C. F., Estes D. M. 2007. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* 25:4735–4746.

Moda G., Vignetta P., Fachenda L., Gloria M., Dondo A. 1999. A contribution to eradication of the bovine tuberculosis: the G-interferon test. *The international Journal of tuberculosis and Lung Disease* 3(9), S202-203.

Monaghan M. L., Doherty M. L., Collins J. D., Kazda J. F., Quinn P. J. 1994. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 40:111-24.

Neil S. D., Hanna J., Mackie D. P., Pollock J. M., Cassidy J. P., Clements R. A., Bryson T. D. G. 1994a. The diagnosis of tuberculosis by blood testing. *Proc Society Veterinary Epidemiology Preventative Medicine* 1-8.

Neil S. D., Cassidy J. P., Hanna J., Pollock J. M., Mackie D. P., Clements R. A., Walton E. G., Bryson T. D. G. 1994b. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle using an assay for bovine interferon – gamma. *Veterinary Record* 135, 134-135.

Neimann S., Richter E., Rusch-Gerdes S. 1999. Differentiation among Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of *M. bovis*. *J. Cl. Microbiol.* 30; 152-157.

Noll H., Bloch H., Asselineau J., Lederer E. 1956. The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* 20: 299-309.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-017-ZOO-2005), Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), Diario Oficial de la Federación, 08 de Marzo de 2005.

OIE (World Organization for Animal Health), 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. Available from: <http://www.oie.int>.

Olsen A. W., Williams A., Okkels L. M., Hatch G., Andersen P. 2004. Protective Effect of a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion of Antigen 85B and ESAT-6 in the Aerosol Guinea Pig Model. *Infect. Immun.* 72:6148-6150.

OPS/OMS (1992). Plan de Acción para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina en las Américas. HPV/TUB/113/92. pp.1 – 39.

Perez E., Samper S., Bordas Y., Guilhot C., Gicquel B., Martin C. An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 2001; 41: 179-87.

- Pollock J. M., McNair J., Bassett H., Cassidy J. P., Costello E., Aggerbeck H., Rosenkrands I., Andersen P. 2003. Specific Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 Identify Tuberculosis-Infected Cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1856-60.
- Pritchard D. G. (1988). A Century of Tuberculosis 1888-1988: Conquest and Controversy. *Journal of Comparative Pathology.* 99: 357-396.
- Pollock J. M., Buddle B. M., Andersen P. 2001. Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis.* 81:65-69.
- Pollock J. M., McNair J., Welsh M. D., Girvin R. M., Kennedy H. E., Mackie D. P., Neil S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81, 103-107.
- Rentería T. B.; Hernández De Anda J. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of calostrum and milk. *Preventive Veterinary Medicine.* 27: 23-27.
- Ritacco V., López B., De Cantor I. N., Barrera L., Enrico F., Nadera A. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci;* 50:365-367.
- Rosenkrands I., Agger E. M., Olsen A. W., Korsholm K. S., Andersen C. S., Jensen K. T., Andersen P. 2005. Cationic Liposomes Containing Mycobacterial Lipids: a New Powerful Th1 Adjuvant System. *Infec Immun.* Vol 73:5817-5826.
- Rothel J. S., Jones S. L., Corner L. A., Cox J. C., Wood P. R. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon – and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67, 134–137.
- Siddiqi K., Lambert M. L., Walley J. 2003. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis.* 3: 288–96.
- Skinner M. A., Buddle B. M., Wedlock D. N., Keen D., de Lisle G. W., Tascon R. E., Ferraz J. C., Lowrie D. B., Cockle P. J., Vordermeier H. M., Hewinson R. G. 2003. A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG Boost Vaccination Strategy for Cattle Induces Protection against Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun.* 71:4901-4907.
- Steele J.H. 1995. Regional and Country Status Report. En: C.O. Thoen.; J.H. Steele Eds. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Ames, Iowa. State University Press. pp 162-172.

Sturgill-Koszycki S; Schlesinger P. H.; Chakraborty P.; Haddix P. L.; Collins H. L.; Fok A. K.; Allen R. D.; Gluck S. L.; Heuser J.; Russell D. G. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263(5147): 678-81.

Surujballi O. P., Romanowska A., Sugdena E. A., Turcotte C., Jolley M. E. 2002. A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in cattle sera. *Vet Microbiology*. 87:149-157.

Teitelbaum R., Cammer M., Maitland M. L., Freitag N. E., Condeelis J., Bloom B. R.. 1999. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15190-5.

Thomson B. 2006. Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacteria tuberculosis* complex in formalin-fixed tissue. En: C.O. Thoen Ed. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Oxford, U.K . Blackwell publishing, Ltd. pp 63-67.

Tortoli, E., Lavinia F., Simonetti T. 1998. Early Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC Cultures by Ligase Chain Reaction. *J Clin Microb*. 36: 2791–2792.

Waddington K. 2003. “Unfit for human consumption” Tuberculosis and the problem of infected meat in late Victorian Britain. *Bull. Hist. Med*. 77:636-661.

Waddington K. 2004. To stamp out “So terrible a Malady” : Bovine tuberculosis and tuberculin testing in Britain, 1890-1939. *Medical History*. 48:29-48.

Weddle N. E., Livingstone P. G. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet Microbiol*; 40:23-29.

Whelan C., Shuralev E., O’Keeffe G., Hyland P., Kwok H., Snoddy. P., O’Brien A., Connolly M., Quinn P., Groll M., Watterson T., Call S., Kenny K., Duignan A., Hamilton M. J., Buddle B. M., Johnston J. A., Davis W. C., Olwill S. A., Clarke J. 2008. Multiplex Immunoassay for Serological Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*.15: 1834-1838.

Whipple D. L., Bolin C. A., Davis A. J., Jarnagin J. L., Johnson D. C., Nabors , R. S. Payeur J. B., Saari D. A., Wilson A. J., Wolf M. M. 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am J Vet Res*:56:(4):415-19.

World Health Organization. 2005. World Health Organization global tuberculosis control surveillance, planning, and financing. Geneva: World Health Organization.

Wood P. R., Corner L. A., Rothel J. S., Baldock C., Jones S. L., Cousins D., McCormick B. S., Francis B., Creeper J., Tweedle N. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 68 (9): 286-290.

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

Vordermeier H. M., Cockle P. J., Whelan O., Rhodes S., Chambers M. A., Clifford D., Huygen K., Tascon R., Lowrie D., Colston M. J., Hewinson R. G. 2001. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. *Vaccine*. 19:1246–1255.

Vordermeier H. M., Chambers M. A., Buddle B. M., Pollock J. M., Hewinson R. G. 2006. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *The veterinary Journal*. 171:229-244.

Wedlock D. N., Vesosky B., Skinner M. A., De Lisle G. W., Orme I. M., Buddle B. M. 2000. Vaccination of Cattle with *Mycobacterium bovis* Culture Filtrate Proteins and Interleukin-2 for Protection against Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun.* 68:5809-5815.

Wedlock D. N., Keen D. L., McCarthy A R., Andersen P., Buddle B. M. 2002. Effect of different adjuvants on the immune responses of cattle vaccinated with *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *Vet Immuno and Immunopathol* 86:79–88.

Wedlock D. N., Denis M., Skinner M. A., Koach J., de Lisle G. W., Vordermeier H. M., Hewinson R. G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk, L. A., Hecker R., Buddle B. M. 2005. Vaccination of Cattle with a CpG Oligodeoxynucleotide-Formulated Mycobacterial Protein Vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG Induces Levels of Protection against Bovine Tuberculosis Superior to Those Induced by Vaccination with BCG Alone. *Infec. Imun.* Vol. 73: 3540–3546.

Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis.

Bermúdez HR¹, Rentería ET¹, Medina BG¹, Hori-Oshima S¹, de la Mora VA¹ Valle, López VG¹, Yu WL², Pio GR¹, Herrera JC¹, Pujol C¹, Nielsen K².

.
¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja, México. Km. 3.5 Carr. San Felipe, Frac. Laguna Campestre s/n, cp 21386. Tel. 686 563 60 07, Fax 686 563 69 06, rosy3055@yahoo.com

². Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory (Fallowfield), 3851 Fallowfield Rd., Ottawa, Ontario, Canada K2H 8P9.

ABSTRACT

553 Dairy cattle carcasses were inspected at a slaughter house in Baja California, out of 298 showed gross tuberculosis-like lesions. Microscopic examination of tissues using H&E and acid fast staining revealed 268 suspect cases. Of the 268, 104 were culture positive, while 123 were PCR positive for *M. tuberculosis* complex. A total of 70 samples were culture and PCR positive and an additional 53 samples were PCR positives but culture negative. Thus PCR increases the rate of detection and will be a useful tool for control programs, especially when considering the lower sensitivity of diagnosis by bacteriological culture, the occupational risk, technical difficulties with the protocol and the prolonged time of incubation.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, diagnosis, histopathology, PCR.

INTRODUCTION

Mycobacterium bovis, is the causal agent of bovine tuberculosis (TB); it infects approximately 50 million animals all over the world, causing economic losses of approximately 3 billion dollars per year (Steele, 1995). The disease is zoonotic, human populations may be infected by direct contact with diseased animals and by the consumption of non-pasteurized milk and its derivatives. In 2003, the World Health Organization (WHO) estimated that approximately 8.8 million persons developed tuberculosis and 1.7 million persons died of this disease (WHO, 2005). In Mexico, 28% of milk is marketed without pasteurization and is used for the preparation of cheese and other dairy derivatives (NOM, 2005), which implies a high risk to public health. In Baja California, human pulmonary tuberculosis has the highest rate of human TB when compared to the other northern Border States with a rate of 58 cases/100,000 inhabitants (Epidemiological bulletin, 2000). In other countries it has been demonstrated that a reduction in bovine TB prevalence results in a lower risk exposure to human. The control method recommended in Mexico is the detection and slaughter of positive reactor animals (Epidemiological bulletin, 2000). One of the limitations in Mexico for TB eradication is that there is no economical compensation program that allows the reduction of economic loss due to the slaughter of tuberculosis animals (Corner., et al., 1990; Corner, 1994)

The eradication TB program started in 1974 at Baja California State; however not as until 1995 was the program supported by histopathological and bacteriological diagnosis. Actually several countries relies the diagnosis in the traditional tuberculin test, histopathological and PCR from formalin fixed tissues and in some cases follow the bacteriological process which is expensive and complicated and there are not enough facilities to perform it and the identification of the Mycobacterial organism using PCR can be give us several benefits.

The aim of this study was to correlation histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis.

MATERIAL AND METHODS

Tissue samples were collected at the postmortem inspection in an abattoir in Tijuana, Baja California from June 2006 to February 2007

Sampling procedures. Inspection included the entire carcass with emphasis on the lung and liver and the retropharyngeal, mandibular, parotid, mediastinal, tracheobronchial and hepatic lymph nodes; (NOM, 2005). Samples were removed from carcasses using sterile instruments, placed in sterile plastic bags and sent to the laboratory for processing. Tissue samples were split into three parts, one for histopathological examination and the remainder two subsamples were used for bacteriology and fresh tissue PCR.

Histopathology. Examination, the samples were formalin fixed, embedded in paraffin, and cut into 6 μ m sections, slides were prepared using standard hematoxylin-eosin (HE) stain method (Bolin et al., 1997) and evaluated microscopically by a veterinary pathologist; histological lesions were recorded as suspect, when granulomatous inflammation associated with central necrosis were present and the sample had no evidence of other non-mycobacterial etiologies. Acid-fast stain was applied to all positive suspect samples using the Ziehl-Neelsen staining procedure. If acid-fast bacilli were detected by these means, the sample was considered positive (Fitzgerald S. D. et al., 2000).

Bacteriology. Lymph nodes were trimmed of excess fat, macerated in phenol red nutrient broth (Becton-Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA) decontaminated in 2% NaOH for ten minutes, centrifuged for 20 min, and the supernatant fluid was decanted (Payeur et al., 2003). Stonebrick media were inoculated with the sediment. The inoculated media were incubated at 37 C for 12 weeks and examined for colony formation every week. The contaminated samples were discarded and inoculated once again. The growing colonies were

classified to species using standard growth and were PCR confirmed (Liébana et al., 1995; Schmitt et al., 1997)

Polymerase Chain Reaction (PCR) test for tissues and isolates. Frozen tissues were tested by PCR. Extraction of DNA from tissues was done using Qlamp® Mini kit (Qiagen Inc) following the manufacturer's instructions. PCR procedures were applied as previously described using primers: IS41, 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3' ; and IS43, 5' TCA GCC GCG TCC ACG CCG CCA 3' complementary to sequences flanking the repetitive insertion element IS6110 specific of the Tuberculosis complex species (Liebana et al 1995). Briefly the reaction consisted of 100 ng of DNA of each sample, 1X Taq buffer (Invitrogen Inc.), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxy-nucleotide triphosphates, 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen Inc), and 25 pM of each primer in a total volume of 50 µl. DNA was amplified using a Hybaid Express thermocycler, using 1 cycle at 94° C for 10 min, 30 cycles of the denaturing for 2 min at 94° C, alignment at 68° C for 2 min and an extension at 72° C for 2 min, finally 1 cycle at 72° C for 10 min. The expected amplified DNA band was 317 bp [15]; the AN5 strain and BCG were used as positive controls and water as negative control. PCR products were tested by electrophoresis in 1.5% agarose gels in 1X TAE buffer, stained with 5 µg/ml of ethidium bromide and observed by ultraviolet light (Transilluminator, 2000 Bio Rad Inc).

Statistical analysis

The sensitivity and specificity values were calculated with Epi info 6 software (CDC, Atlanta, GA).

RESULTS

A total of 553 dairy cattle were inspected at slaughter for presence of granulomatous lesions in lymphatic nodes at the abattoir in Tijuana, Mexico (Table 1). Of the 553 carcasses, 298 (54%) had tuberculosis-like gross lesions in the head and thoracic lymph nodes. Of the 298 animals 268 (90%) were classified as TB suspect by histopathology examination using H&E stained tissue sections. The tissues from those 268 animals were stained with Ziehl-Neelsen method for the presence of fast-acid resistant organism and 217 (81%) were positive. Additionally, culture of those 268 animal tissues were processed for bacteriology, 104 (39%) were culture positive and were identified as *M tuberculosis* complex by PCR means. Also, PCR was performed on 268 frozen tissues, 123 were positive (46%), of those, 70 (67.3%) were positives for both bacteriology and PCR and 53 (32.3%) were only positive for PCR (Table 2). There was not statistical difference between PCR and bacteriological proportions. The sensitivity for PCR was 67.32% using culture as reference (Table 2). Our results show that the PCR does increase the rate of detection of *M. bovis* compared with the culture.

Table 1. Results on positives animals

Animals	553
Number gross TB like lesions	298
Mycobacteriosis ^a	268
Culture positive ^b	104
PCR positive ^c	123

^a Confirmed by histopathology with H&E stain.

^B Colonies confirmed by PCR

^C On frozen tissue samples

Table 2. Comparison of *Mycobacterium bovis* identification by culture and tissue PCR

PCR ^b	Bacteriology ^a		Total
	Positive	Negative	
Positive	70 (67.3%)	53 (32.3%)	123
Negative	34 (32.7%)	111 (67.7%)	145
Total	104	164	268

^aStonebrick medium

^b Frozen tissue

DISCUSSION

Post-mortem examination of tissue of 553 dairy cattle resulted in 298 showing gross TB-like lesions with a total of 268 cases showing microscopic lesions typical of bovine TB containing acid fast bacteria. A total of 39% (104) were positive by bacterial culture of which 34 were PCR negative. However, PCR identified an additional 53 culture negative samples as positive for the *M. tuberculosis* complex for a total of 123 (46%) of the tissue samples. Of the 268 samples, 111 were negative by culture and PVR.

The culture of *M. bovis* is the gold standard, however, it is very time consuming, requires special equipment and highly qualified personnel. This, combined with low sensitivity as a result in some chronic cases with low number of viable microorganisms makes it a less than ideal diagnostic test (Corner et al., 1990; Kell and Young, 2000).

The diagnostic tests available have increased with the development of PCR techniques. Thus it is possible to identify *M. bovis* in any biological specimen without previous culture in both human and bovine samples (Cousins et al., 1992; Liébana et al., 1995). The use of PCR allows the identification of a specific sequence of the *M. tuberculosis* complex such the IS6110. Unlike other methods, PCR for IS6110 identifies the *M. tuberculosis* complex bacteria like *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *Mycobacteria africanum*, *Mycobacteria canetti*, *Mycobacteria*

microti, *Mycobacteria caprae* and *Mycobacteria pinnipedi* species, however the animal species and the geographic location of the animal provide a strong indication of which member of *M. tuberculosis* complex is involved in particular cases (Cousins et al., 2005). The availability of numerous commercial kits for DNA extraction from tissues and body fluids has made sample preparation simple. Combined with the lower cost of assay components and the widespread availability of multipurpose equipment, the PCR will be very useful in control programs of various infectious diseases.

REFERENCES

- Bolin, C. A., D. L. Whipple, K. V. Khanna, J. M. Risdahl, P. K. Peterson, and T. W. Molitor. 1997 Infection of Swine with *Mycobacterium bovis* as a Model of Human Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 176:1559-1566.
- Corner L. A., Melville L., McCubbin K., et al. Efficiency of Inspection Procedures for the Detection of Tuberculosis Lesions in Cattle. *Aus Vet J* 1990;67:389-392
- Corner L A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*; 40:53-63
- COUSINS D., S. D. WILTON., B. R. FRANCIS AND B. L. GOW. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of Tuberculosis. *J. Clin. . Microbiol.* 30:255-258.
- Cousins D. V. & N. Florisson. (2005) A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 24(3), 1039-1059.
- Epidemiological Bulletin, OPS, Vol.1, No. 9, Feb. 2000.
- Fitzgerald SD, Kaneene JB, Butler KL, et al.: 2000, Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest* 12:322–327.
- Kell, D.B., and Young, M. 2000 Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol* 3: 238–243
- Liebana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Villafranca, M., Gomez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suarez, G., Domingo, M., Dominguez, L., 1995. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organism in Bovine Tissue Sample by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 33-36.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-017-ZOO-2005), Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), 2005. Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Payeur JB, Jamagin JL, Marquardt JG, et al.: 1992. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, IA.
- Schmitt SM, Fitzgerald SD, Cooley TM, et al.: 1997, Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *J Wildl Dis* 33:749–758.

Steele, J.H., 1995. Regional and Country Status Report. In: Thoen CO, Steele JH, eds. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Ames, Iowa. State University Press, 162-172

World Health Organization. World Health Organization global tuberculosis control surveillance, planning, and financing. Geneva: World Health Organization. 2005.

Evaluation of a lateral flow assay for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle

Bermúdez HR¹, Rentería ET¹, Medina BG¹, Hori OS¹, de la Mora VA¹ Valle, López VG¹, Yu WL², Nielsen K²

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja, México. Km. 3.5 Carr. San Felipe, Frac. Laguna Campestre s/n, cp 21386. Tel. 686 563 60 07, Fax 686 563 69 06, email mvztomas60@yahoo.com

². Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory (Fallowfield), 3851 Fallowfield Rd., Ottawa, Ontario, Canada K2H 8P9.

Abstract:

A commercially available multiantigen lateral flow assay (LFA) for detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* was evaluated by testing dairy cattle in Baja California, México. Blood and tissue samples were obtained from 268 dairy cattle at a slaughter-house. The tissue samples were evaluated for histological, bacteriological and PCR evidence of *Mycobacterium bovis* while serum samples were evaluated by LFA. Of 107 culture positive samples, 70 (61.4%) were positive by PCR and 49 (45.8%) were positive by LFA. The PCR and LFA gave positive results with an additional 59 (36.6%) and 77 (47.8%) of the samples, respectively. The false negative rate for the PCR was 34.6% and 54.2% for the LFA.

Based on the data, the LFA utilized may be a useful as adjunctive animal test for bovine tuberculosis but it should be used in conjunction with other diagnostic tests.

Key words: *Mycobacterium bovis*, lateral flow assay, PCR, diagnosis, sensitivity, specificity.

Introduction:

Mycobacterium bovis is the cause of bovine tuberculosis (TB). It is also a pathogen for a number of other animal species. It causes economic losses (Steele, 1995) and its ability to spread to the humans constitutes a public health problem (WHO, 2005). Tuberculosis is difficult to control because of lack of diagnostic assays with sensitivity and sensitivity sufficient to detect all stages of infection. Bacteriological culture is considered the gold standard of TB diagnosis. Among the diagnosis tests based on measuring the cellular immunity, the tuberculin test which consists of an application (SID) of a purified protein derivative (PPD) is considered a suitable tool in the majority of the programs of TB control (Gonzalez-Llamazares et al., 1999; Cousins and Florisson, 2005). This test has the disadvantage that requires at least two visits to the farm with an interval of 3 days by a veterinarian, the animals have to be immobilized at each visit and the interpretation of the results can be subjective. Other tests that measure the cellular immunity include the gamma interferon test (Wood and Rothel, 1994; Jones, 1999; Wood et al, 1999; Lauzi et al., 2000; De la Rua-Domenech et al., 2006;) and the lymphocytes proliferation test (LPA) (Fitzgerald et al., 2000). A number of test for detection of antibody have been described recently (Amadori et al., 2002; Aagaard et al., 2006; Aranza et al., 2006; Jolley et al., 2007). Tests that measure the humoral immune response through measurement of antibodies have been characterized by some researchers as

potential methods to improve the bovine TB diagnosis (Lyashchenko, 1998, 2000). Nevertheless the low sensitivity of these tests has not permitted their use for the detection of TB in early phases of infection (Pollock, et al., 2001) The aim of this study was to utilize a combination of antigens commercially available for the diagnosis of bovine tuberculosis using a lateral flow assay.

Materials and Methods:

Test Samples: Tissue samples were collected from 268 dairy cattle in Tijuana, Baja California. All carcasses were inspected as part of the Federal Inspection program at the abattoir in Tijuana, Baja California. Tissues were collected from June 2006 to February 2007 and included blood and tissue.

10 mL of blood samples were collected in 15 ml sterile polypropylene tubes at slaughter and transported to the laboratory. The samples were centrifuged and the sera were stored in 2.0 mL aliquots and frozen until tested.

Medial retropharyngeal lymph nodes, together with the caudal mediastinal lymph nodes, were removed unsliced, placed in sterile bags into an isothermal container and delivered to the laboratory within 5 hours of slaughter. Adipose tissue was removed from lymph nodes and gross lesions were observed and recorded. Then 2 mm sections were obtained and observed for possible granulomatous lesions. Tissues were split into 3 subsamples. One was fixed in

10% buffered formalin for histopathology. The second and third were frozen at 80°C for bacteriology and PCR, respectively.

Histopathology. Formalin fixed tissues were embedded in paraffin, and cut into 6 µm sections. Histopathologic slides were prepared using standard haematoxylin-eosin (HE) stain method (Bolin et al., 1997). Slides were evaluated microscopically by a veterinary pathologist. Histological lesions were characterized as positives when granulomatous inflammation associated with central necrosis and no evidence of other non mycobacterial etiologies was observed. Acid-fast staining was applied to all positive samples using Ziehl-Neelsen staining procedure for the presence of mycobacterial bacilli (Fitzgerald et al., 2000)

Bacteriology. All samples were processed in a Class III safety cabinet using the protocol described by Payeur et al. (1992). Small pieces were minced and placed in a container with 50ml of phenol red broth. They were macerated for 2 minutes using a blender. Then, 7 ml of the macerated material was placed in 5ml of 0.5N NaOH for 5 minutes, 6.0 N HCl was added until the mixture became yellow and the samples were subsequently neutralized by adding 1.0 N NaOH. The material was centrifuged at 1650 RCF for 20 minutes, the pellicle was removed and the supernatant fluid decanted. Two slants of Stonebrick medium were inoculated with the sediment using sterile cotton tipped swab and incubated to 37°C. The inoculated culture media were observed each week for a period of 2 months for presence of mycobacterial colonies. The identification of tuberculosis complex

isolates from culture was carry out by molecular means (Cousins et al., 1991; Liébana et al., 1995).

PCR studies. DNA extraction from tissues were done using Qlamp ® Mini kit (Qiagen Inc) following the manufacturer's instructions. PCR procedures were applied as previously described (Liebana et al 1995). The primers were: IS41, 5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3'; and IS43, 5' TCA GCC GCG TCC ACG CCG CCA 3' complementary to sequences flanking the repetitive insertion element IS6110 specific of the Tuberculosis complex species. Briefly the reaction consisted of 100 ng of DNA of each sample, 1X Taq buffer (Invitrogen Inc.), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxy-nucleotide triphosphate, 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen Inc), and 25 pM of each primer in a total volume of 50 µl. DNA was amplified using a Hybaid Express thermocycler, using 1 cycle at 94° C for 10 min, 30 cycles of the denaturing for 2 min at 94° C, alignment at 68° C for 2 min and an extension at 72° C for 2 min, finally 1 cycle at 72° C for 10 min. The expected amplified DNA band was 317 bp [15]; the AN5 strain was used as a positive control. Water was used as negative control. PCR products were tested by electrophoresis in 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer, stained with 5 µg/ml of ethidium bromide and observed by ultraviolet light (Transilluminator, 2000 Bio Rad Inc).

Lateral flow Assay. A commercially available multiantigen lateral flow assay was used to detect antibodies against mycobacterial antigens in the bovine sera. Thirty microliters of serum and 3 drops of sample diluent were added to the

sample pad. A colored band observed in the test window was considered positive while no band was considered as negative.

Statistical analysis. The results of tissue PCR and lateral flow were compared with mycobacterial culture and *Mycobacterium bovis* identification by PCR. The assay sensitivity and specificity values were calculated using the Epiinfo 6 software (CDC, Atlanta, USA)

Results:

The results are summarized in Table 1.

Of a total of 268 animals, 107 were bacteriologically positive being 70 being both bacteriologically and PCR tissue positive. Another 59 PCR positive samples were bacteriologically negative and 37 were culture positive and PCR tissue negative

Utilizing the bacteriology results as gold standard, sensitivity and specificity were calculated for the LFA and the PCR (Table 1)

The PCR gave a sensitivity value of 65.45%, a false negative rate of 26.62% and a false positive rate of 45.74%, while the LFA gave a sensitivity value of 45.8% with false negative and false positive rates of 40.8% and 61.1%, respectively.

Compared to the PCR, the LFA gave results very similar to those obtained when the test was compared to bacterial culture. The LFA gave a sensitivity value of

48.84%, a false negative rate of 46.58 and a false positive rate of 50.0%. These data are presented in Table 2. In this case, the sensitivity and specificity values were marginally higher with corresponding minimal decreases in false reactions.

Table 1. Assessment of PCR and LFA against bacteriological culture for the diagnosis of bovine tuberculosis

Culture		+(107)	-(161)
PCR	+	70 (61.4%)	59 (36.6%)
	-	37 (34.6%)	102 (63.4%)
		+(107)	-(161)
LFA	+	49 (45.8%)	77 (47.8%)
	-	58 (54.2%)	84 (52.5%)

Table 2. Analysis of the LFA results against PCR data.

PCR	+(129)	-(139)
LFA +	63 (48.8%)	63 (45.4%)
LFA -	66 (51.2%)	76 (54.6%)

Discussion:

The purpose of this study was to evaluate the performance of a lateral flow assay using a multi-antigen cocktail for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. This test can be a useful tool because it can be used in the field without expensive equipment. The test detects specific antibodies of the IgM, IgG and IgA isotype (Lyashchenko et al., 2008) In this study the sensitivity and specificity values of the LFA were 45% and 52.5% compared to the gold standard of bacteriology isolation of *M. bovis*. The PCR in this study gave sensitivity and specificity values of 61.4% and 63.4%. The false positive rates of the LFA was 47.8% and 36.6% for the PCR while the false negative rates were 54.2 and 34.6% for the LFA and the PCR respectively. The specificity values are not likely to be accurate because of the biased sample selection.

These data agree with a report by Greenwald et al., (2003) in which the LFA was applied to 178 badgers sera, resulting a sensitivity value of 53% and a specificity value of 95%. Lyashchenko et al. (2008) tested sera from possums, badgers, wild boar and white tail deer, using the same rapid antibody detection assay reported a sensitivity range from 44.7% to 76.6% with the lowest for possum and the highest for wild boar. The specificity was from 85.7% to 98.9% with the lower for possum and the higher for deer. Waters et al. (2006) found that the sensitivity increased to a 96% when the LFA was applied to experimentally infected cattle.

Both PCR and LFA gave false negative results compared to bacteriological culture. This could very likely be a result of failure to recover live *Mycobacterium*

bovis from the tissues. A number of false positive results were also in evidence for both tests. These may be a result of interference in the test by the presence of non-TB mycobacterial species of bacteria.

These data combined suggest that the LFA, maybe a suitable adjunct test for the detection of TB not only for cattle but also in wildlife. However, because of its limited accuracy, it should be used in conjunction with other tests.

References:

1. Steele, J.H. Regional and Country Status Report. In: Thoen CO, Steele JH, eds. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Ames, Iowa. State University Press, **1995**, 162-172
2. World Health Organization. World Health Organization global tuberculosis control surveillance, planning, and financing. Geneva: World Health Organization. **2005**.
3. González-Llamazares O. R., Gutiérrez M. C., Alvares N. D., de la Puente R. A., Domínguez R. L., Rodríguez Ferri E. F. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferón gamma assay for detection and eradication for bovine tuberculosis in Spain. *Vet. Microbiol.* **1999**, 70, 55-66.
4. Cousins D. V., Florisson N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2005**, 24(3), 1039-1059.

5. Wood, P.R.; Rothel, J.S. In vitro immunodiagnostic assay for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* **1994**, 40 (1): 125-135.

6. Jones S. Interferony: A useful marker of cell mediated immunity. *Cell Focus*, **1993**, 8 (2), 1-2.

7. Wood, P.R.; Corner, L.A.; Rothel, J.S.; Baldock, C.; Jones, S.L.; Cousins, D.B.; McCormick, B.S.; Francis, B.R.; Creeper, J.; Tweedle, N.E. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet Journal.* **1991**. 68 (9): 286-290.

8. Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archeti, I. L., Poli, G., Bonizzi, L.. Evaluation of the specificity of the γ -interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet. J.* **2000**, 160: 17-24

9. De la Rúa-Domenech, R.; Goodchild, A.T.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Christiansen, K.H.; Clifton-Hadley, R.S. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin test, γ -interferon assay and others ancillary diagnostic techniques. *Research Veterinary Science.* **2006**, 81, 190-210.

10. Fitzgerald, S. D., Kaneene J. B., Butler K L, Clarke Kathy R., Fierke J. S., Schmitt S. M., Bruning-Fann C S., Mitchell R R., Berry D E and Janet Payeur. Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoiles virginianus*). J. Vet Diagn. Invest. **2000**, 12, 322-327.

11. Amadori, M., K. P. Lyashchenko, M. L. Gennaro, J. M. Pollock, and I. Zerbini. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. **2000**, 85, 379-389.

12. Aagaard, C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo A. J., Gutierrez-Pabello J. A., Suarez-Güemes F., McNair J., Cataldi A, Espitia C., Andersen P., Pollock J. M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. **2006**, 44, 4326-4335.

13. Aranaz, A., De Juan L, Bezos J., Álvarez J., Romero B., Lozano F., Paramio J. L., López-Sánchez J., Mateos A., Domínguez L. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium subsp. paratuberculosis*. Vet. Res. **2006**, 37, 593-606

14. Jolley M. E., Nasir M. S., Surujballi Om. P., Romanowska A., Rentería. T. B., De la Mora A., Lim A., Bolin S. R., Michel A. L., Kostovic M., Corrigan E. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Vet. Microbiol.* **2007**, 120, 113-121.

15. Lyashchenko K. P., Pollock J. M., Colangeli R., Gennaro M. L. Diversity of antigen recognition by serum antibody in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* **1998**, 66, 5344-5349.

16. Lyashchenko K. P., Singh M., Colangeli R., Gennaro M. L. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J. immunol. Meth.* **2000**, 242, 91-100.

17. Pollock J. M., Buddle B. M., Andersen P. Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis (Edinburg)*. **2001**, 81, 65-69.

18. Bolin C. A., Whipple D. L., Khanna K. V., Risdahl J. M., Peterson P. K., Molitor T. W. Infection of Swine with *Mycobacterium bovis* as a Model of Human Tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **1997**, 176, 1559-1566.
19. Payeur J.B., Jamagin J. L., Marquardt J. G., et al. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service. National Veterinary Services Laboratories, Ames, IA. **1992**.
20. Cousins D. V., Wilton S. D., Francis B. R. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* **1991**, 27, 187-195.
21. Liebana E., Aranaz A., Mateos A., Vilafranca M., Gomez-Mampaso E., Tercero J. C., Alemany J., Suarez G., Domingo M., Dominguez L. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organism in Bovine Tissue Sample by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* **1995**, 33, 33-36.
22. Lyashchenko K. P., Greenwald R., Esfandiari J., Chambers M. A., Vicente J, Gortazar C., Santos N., Correia-Neves N. , Buddle B. M., Jackson R., O'Brien D. J., Schmitt S., Palmer M. V, Delahay R. J., Waters W. R. Animal side serologic

assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Vet. Microbiol.* **2008**, 132, 283-292.

23. Greenwald R., Esfandiari J., Lesellier S., Houghton R., Pollock J., Aagaard C., Andersen P., Hewinson R. G., Chambers M., Lyashchenko K.. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagn. Microbiol. infect. Dis.* **2003**, 46, 197-203.

24. Waters W. R., Palmer M. V., Thacker T. C., Bannantine J. P., Vodermeier H. M., Hewinson R. G., Greenwald R., Esfandiari, J., McNair J., Pollock J. M., Andersen P., P. Lyashchenko K. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* **2006**. 13, 648-654.

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