

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

Instituto de Ciencias Agrícolas

Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**“CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO REPLICABLE EN  
*LACTOCOCCUS LACTIS* QUE EXPRESA EL ANTÍGENO  
MICOBACTERIAL HSP65”**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

**JOSÉ CARLOMÁN HERRERA RAMÍREZ**

DIRECTORES DE TESIS:

**DR. TOMÁS BENJAMÍN RENTERÍA EVANGELISTA**

**DR. GERARDO ENRIQUE MEDINA BASULTO**

La presente tesis titulada “Construcción de un Plásmido Replicable en *Lactococcus Lactis* que Expresa el Antígeno Micobacterial Hsp65”, realizada por el alumno José Carlomán Herrera Ramírez 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**

---

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista  
Director de Tesis

---

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto  
Co-Director de Tesis

---

Dr. Gilberto López Valencia  
Asesor

---

Dra. Rosa María Bermúdez Hurtado  
Asesor

---

Dr. Francisco Monge Navarro  
Asesor

## CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	2
Etiología .....	2
Epidemiología .....	2
Formas de Contagio .....	3
Patogenia .....	3
Factores de Virulencia .....	5
Zoonosis .....	6
Métodos de Diagnóstico .....	7
Normatividad Mexicana para el Diagnóstico de la TBB .....	7
<i>Diagnóstico bacteriológico</i> .....	7
<i>Diagnóstico histopatológico</i> .....	7
Bacteriología .....	7
Tuberculina .....	8
Serología .....	8
Técnicas Moleculares .....	9
Sensibilidad y Especificidad de Pruebas Diagnósticas .....	19
Prevención .....	11
Tratamiento .....	11
Métodos de Control y Erradicación .....	11
Vacunación .....	13
BCG .....	13
BCG recombinantes .....	15
Vacunas Proteicas .....	15
Vacunas de ADN .....	16
Vacunas Heterólogas .....	17
LITERATURA CITADA .....	19

Anexos

<i>“Expresión del Antígeno Micobacterial Hsp65 en la Bacteria Grado Alimenticio Lactococcus Lactis. (Expression of the Micobacterial Antigen Hsp65 In Food Grade Lactococcus lactis Bacterium)”</i> .....	25
<i>“Correlation Between Histopathological, Bacteriological and PCR Diagnosis of Bovine Tuberculosis”</i> .....	43

## INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis Bovina (TBB), es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), la cual es miembro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). (Vordermeier et al., 1999).

En países en desarrollo *M. bovis* es el agente causal en el 10% de casos de TBB en humanos (Thoen et al., 2006). 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 genera un alto riesgo para la salud pública. En Baja California la Tuberculosis pulmonar en humanos ocupa el primer lugar con respecto a los estados fronterizos con una tasa de 58 casos/100,000 habitantes (Boletín Epidemiológico-OPS, 2000). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), mediante la campaña de control nacional permanente de carácter oficial, basada en la detección y sacrificio de los animales positivos a la prueba de tuberculina utilizando el Derivado Proteico Purificado (PPD), bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-017-ZOO-2005), no ha logrado reducir ni erradicar la Tuberculosis en ganado de nuestro país.

En Gran Bretaña se analizó el incremento de la TBB en el mundo y se concluyó que el desarrollo de una vacuna en el ganado sería la mejor opción para el control de la TBB a largo plazo (Buddle, et al., 1999).

Si se reduce la infección de TBB en animales seguramente la presencia de TB en humanos se reducirá, también aumentaría la producción láctea, y el bienestar general del hato por lo que el presente estudio es de gran importancia.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## Etiología

La Tuberculosis Bovina (TBB) es causada por la bacteria *M. bovis*, la cual es un bacilo ácido resistente de lento crecimiento. Puede ser transmitido del ganado bovino a los humanos y, por esto, es considerada una zoonosis. Este microorganismo es miembro del Complejo *M. tuberculosis*, una designación que, aunque sin estatus taxonómico, incluye importantes patógenos animales y humanos. Otros miembros del complejo incluyen *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium microti*. Otros hospedadores adaptados a la variante de *M. bovis* ha sido designado como *Mycobacterium pinnipeddi* (adaptado a focas) y *M. caprae* en ovinos (Thoen et al., 2006<sup>1</sup>). *M. bovis* puede ser aislado de ganado doméstico y salvaje, así como de, cerdos, ovejas, borregos, tejones, liebres, humanos, primates no humanos, entre otros (Howard y Smith, 1999).

## Epidemiología

*M. bovis* es un patógeno obligado intracelular pero puede sobrevivir por periodos substanciales en el medio ambiente bajo condiciones favorables. Esta habilidad ha sido demostrada en estudios observacionales sobre la sobrevivencia del organismo en ambientes contaminados naturales o artificiales (Morris et al., 1994).

Aunque la tuberculosis en ganado se ha reconocido por mucho tiempo, muchos aspectos de su epidemiología aún no han sido elucidados. La falta de conocimiento, ha generado que aún en países desarrollados, como el Reino Unido e Irlanda no se haya llegado a la erradicación. El factor determinante más importante para la ocurrencia y diseminación de TBB en hatos ganaderos, es la cantidad de animales expuestos a animales infectados, el número de animales infectados en el hato, el número de animales jóvenes expuestos, las prácticas de manejo del hato actuales y las medidas tomadas para prevenir la diseminación de la enfermedad (Coetzer y Tustin, 2004). Un

obstáculo potencial en el control de la TBB en el Reino Unido es la existencia de tejones (*Meles meles*) como un reservorio silvestre, y la presencia de *M. bovis* en el medio ambiente donde el organismo puede sobrevivir de 4 hasta 15 meses (Courtenay et al., 2006).

Factores de riesgo evaluados en Inglaterra, mostraron que el movimiento de ganado hacia mercados o granjas de ventas incrementan el riesgo de TBB (OR: 3.26 y 1.93 respectivamente). Mientras que el esparcimiento de fertilizantes artificiales y abono de corral en la tierra de pastoreo, se asocian ambos con la disminución del riesgo de TBB (OR de 0.21 y 0.42 respectivamente) (Johnston et al., 2005). La presencia de reservorios silvestres, como es el caso de los tejones en Inglaterra, donde en un estudio realizado por 32 meses analizando tejones localizados en 16 de los 22 territorios, se encontró que el 11.5% excretaban *M. bovis*. Por lo que en la evaluación el ambiente como un potencial reservorio de *M. bovis* es un paso importante para entender la transmisión (Courtenay et al., 2006).

**Formas de Contagio:** Existen varias rutas de contagio para *M. bovis*, pero las primarias son la vía tracto respiratoria y gastrointestinal. Estudios experimentales involucran la exposición de animales a *M. bovis* vía diferentes rutas, tales como, intratraqueal, oral, intravenosa e intraperitoneal; que demuestran que la naturaleza y extensión de las lesiones tuberculosas varían según la ruta de infección; la cual se ve afectada según la forma en como *M. bovis* se disemina en el huésped infectado (Thoen et al., 2006<sup>1</sup>).

## Patogenia

La exposición del ganado a aerosoles de *M. bovis* es considerada la ruta más frecuente de infección; las lesiones al macro usualmente involucran los pulmones y los nódulos linfáticos torácicos. El ganado expuesto vía ingestión de comida o agua contaminada con *M. bovis* casi siempre desarrolla focos primarios en tejidos linfáticos asociado con el tracto intestinal. Otras micobacterias incluidas *Mycobacterium avium*

subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansassii*, *M. fortuitum* y *M. tuberculosis* pueden inducir sensibilidad a la prueba dérmica de tuberculina, pero no producen una enfermedad progresiva pulmonar en el ganado. La limpieza mucociliar por moco y epitelio ciliar en los pasajes respiratorios superiores proveen una defensa contra la infección por inhalación de micobacterias. Sin embargo, microorganismos en pequeñas partículas como polvo o gotas de agua no se afectan por capa mucociliar y pueden pasar a través de los bronquiolos terminales, y así tienen acceso a los espacios alveolares. Seguido a la exposición por aerosoles, *M. bovis* es transportado a los pasajes pequeños de aire donde son ingeridos por fagocitos. Después de la ingestión de los bacilos, los macrófagos mononucleares intentan destruir al organismo; sin embargo, el bacilo tuberculoso virulento posee la habilidad de escapar de la destrucción. La ingestión del bacilo tuberculoso por los fagocitos en fagosomas o vacuolas intracitoplasmáticas protege a los organismos de los componentes bactericidas en el suero. Tras la ingestión por los fagocitos, la micobacteria efectivamente previene la fusión del fagolisosoma y la acidificación. La respuesta celular intenta controlar la enfermedad resultando en la acumulación de un gran número de fagocitos, y finalmente la formación de lesiones macroscópicas, denominados tubérculos. Después de 10-14 días, en modelo murino, las respuestas desarrolladas por la inmunidad mediada por células (IMC) y los macrófagos del huésped tienen un decremento en la capacidad de destruir al bacilo intracelular. Las respuestas IMC son mediadas por los Linfocitos T, los cuales liberan linfocinas que atraen, inmovilizan y activan adicionalmente las células mononucleares de la sangre y médula ósea a los sitios donde la micobacteria virulenta o sus productos están. La hipersensibilidad celular contribuye al desarrollo de muerte celular y destrucción tisular (necrosis caseosa). En algunos casos ocurre licuefacción y formación de cavidades como resultado de acción enzimática en proteínas y lípidos. La ruptura de estas cavidades dentro de los bronquios permite la diseminación del bacilo por aerosoles. Macrófagos activados migran a las terminaciones de los nódulos linfáticos, tanto bronquial como mediastínico. Los nódulos linfáticos son más comúnmente infectados que otros tejidos debido a que los fluidos en un animal eventualmente pasan a través de los nódulos, donde la red de trabéculas atrapa al microorganismo. Las lesiones

primarias casi siempre están localizadas en un nódulo o nódulos y pueden ser extensas y firmes. La fibrosis del tejido conectivo se desenvuelve en la formación dinámica de un granuloma que probablemente contribuye a la localización de las lesiones. La formación del granuloma es un intento del hospedador por localizar el proceso de la enfermedad y permite que los mecanismos inflamatorios e inmunes destruyan al bacilo. Pocas lesiones pueden aparecer como en estado de regresión mientras comienzan a encapsularse por un bien organizado tejido conectivo, mientras que, algunas lesiones pueden contener al bacilo viable. Típicamente, la apariencia microscópica de un granuloma (tubérculo) es focal y tiene algunas áreas de necrosis caseosa en la región central encerrada por una zona de células epiteloides, linfocitos y algunos granulocitos. La mineralización puede estar presente en los centros necróticos; en lesiones avanzadas, algunos focos de mineralización pueden estar unidos. Células multinucleares gigantes, con núcleos en forma de herradura o anillo cerca del borde citoplásmico, son casi siempre vistos en la zona cercana del área necrótica (Thoen et al., 2006<sup>1</sup>).

Los mecanismos de respuesta inmune natural y adquirida de los bovinos son casi siempre efectivos en limitar la proliferación del bacilo tuberculoso y el desarrollo de la enfermedad progresiva. La eliminación de *M. bovis* del tejido depende, en parte, en la destrucción del bacilo en los macrófagos mononucleares que han sido activados por linfocinas. La evidencia que apoya este concepto está principalmente basada en información obtenida de estudios de animales pequeños de laboratorio utilizando cepas de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* (Chan et al., 1992).

**Factores de Virulencia:** La virulencia del bacilo tuberculoso produce un número de los llamados “factores y/o antígenos virulentos” algunos de los cuales antagonizan con las defensas normales del huésped, permitiéndole al organismo multiplicarse en el sitio de implantación primario, para una posterior diseminación hacia otros tejidos u órganos no infectados. Algunos de estos factores pueden ser asociados con el complejo de lípidos de la pared celular, los cuales protegen a la micobacteria de los efectos bactericidas de derivados activados del oxígeno dentro del fagolisosoma, o

pueden atacar la pared de la membrana fagosomal liberando al organismo dentro del citoplasma. Los antígenos polisacáridos tienden a inducir fuertes respuestas humorales lo que es de gran importancia taxonómica y diagnóstica, pero proveen poca o nula protección hacia el huésped. Por otra parte, antígenos proteicos tienden a inducir respuestas celulares, algunas de las cuales pueden ser protectoras. Algunas de estas proteínas muestran una homología cercana y son llamadas proteínas de choque, y se liberan tanto en células eucariotas como procariotas ante la exposición a un insulto medioambiental (Collins, 1994).

El procesamiento de los antígenos micobacteriales por los macrófagos y la presentación a los linfocitos T juega un papel fundamental en la liberación de las linfocinas apropiadas para la activación completa de los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas (Thoen et al., 2006)<sup>1</sup>.

**Zoonosis:** Históricamente *M. bovis* ha sido asociado con tuberculosis extrapulmonar en niños, usualmente ocurre debido al consumo de leche que no ha sido pasteurizada o hervida, proveniente de ganado infectado. A lo largo del tiempo se ha recopilado información sobre los casos de tuberculosis bovina en humanos en algunos países. En los años 90's y 2000's las principales causas de TB debido a *M. bovis* en países industrializados han sido: a) la reaparición de la tuberculosis debido a la inmigración; b) la presentación de la enfermedad debido a una reactivación o por infección primaria en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); c) casos en animales domésticos o mamíferos silvestres que pudieron transmitir la enfermedad al humano, d) contagio vía aérea de *M. bovis* en cuidadores de animales o trabajadores de la industria de la carne (Thoen et al., 2006<sup>2</sup>).

La infección al humano puede ocurrir al inhalar aerosoles o a través de leche contaminada. Los aerosoles son el resultado de las excreciones de los animales. Esta ruta conduce a una tuberculosis respiratoria (Biet et al., 2005).

## Métodos de Diagnóstico

Existen diversos métodos para el diagnóstico de la TBB, directos (necropsia, histopatología, bacteriología) e indirectos (estimulación inmune, serología, biología molecular).

**Normatividad Mexicana para el Diagnóstico de TBB:** Acorde a lo establecido de forma oficial en México, la toma de muestras para estudios histopatológico y bacteriológico, se realiza cuando un animal es positivo a la prueba de tuberculina y en la necropsia no presenta cambios que sugieran la infección del animal, entonces se debe enviar al laboratorio, nódulos de la cabeza como los retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos y tonsilas, así como los mediastínicos y mesentéricos, perfectamente identificadas (NOM-031-ZOO-1995). Se efectúa como sigue:

**Diagnóstico bacteriológico:** a) Examen directo: Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopía de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante. b) Examen indirecto: Cultivo, aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-031-ZOO-1995).

**Diagnóstico histopatológico:** Se deberá utilizar la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y nueva fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso (NOM-031-ZOO-1995).

**Bacteriología:** Los principales factores que influyen en el éxito del aislamiento de

*M. bovis* de especímenes clínicos son: el medio de cultivo, el procedimiento de descontaminación y las condiciones de incubación. Las cepas de *M. bovis* requieren medios enriquecidos para crecer. El medio utilizado es a base de huevo (Stonebrink y Lowensteins-Jensen con piruvato), o agar basado y enriquecido con suero y/o sangre, también llamado B83. La descontaminación de especímenes es frecuentemente necesaria ya que permite el aislamiento de *M. bovis* sin la contaminación por otros microorganismos. Se utiliza para esto, generalmente, hexadecylpyridinium chloride (HPC) al 0.075%, Benzalkonium chloride al 0.25%, ácido oxálico al 5.0% e hidróxido de sodio al 2%. La identificación de aislamientos de *M. bovis* requiere tradicionalmente de conocer las características de la morfología y tinción de las colonias, junto con pruebas bioquímicas (Corner, 1994).

**Tuberculina:** Dado que la respuesta IMC es dominante en la inmunidad antimicobacteriana temprana (48 – 72hrs post inoculación del Derivado Proteico Purificado (PPD) (De la Rúa-Domenech et al., 2006), la estimulación de las células T de memoria con antígenos micobacteriales proveen un medio para el diagnóstico temprano de la infección por *M. bovis*. La prueba de Tuberculina es la más frecuentemente utilizada, provee una medición de la IMC dependiente de la hipersensibilidad de tipo retardado reaccionando a la tuberculina. La variabilidad mostrada en relación a la especificidad y sensibilidad de la prueba dérmica y la necesidad de una detección temprana de la infección por *M. bovis*, ha conducido en la búsqueda de pruebas alternas (Pollock et al., 2006). En el estándar internacional del diagnóstico antemortem de TBB, la aplicación de un pequeño volumen de tuberculina bovina dentro de la piel, se conoce como prueba intradérmica simple, la cual puede aplicarse en la región media cervical o en la base de la cola. La prueba intradérmica simple comparativa, implica la aplicación simultánea de tuberculina bovina y aviar lado a lado dentro de la piel en el cuello del animal (De la Rúa-Domenech et al., 2006).

**Serología:** La prueba Gamma Interferón (IFN- $\gamma$ ) de laboratorio para detectar respuestas IMC ha sido utilizada para determinar la respuesta de linfocitos de animales infectados con *M. bovis*. En esta prueba se estimula *in vitro* con antígenos

micobacteriales. El desarrollo de la prueba IFN- $\gamma$  ha contribuido significativamente al diagnóstico de la tuberculosis bovina, y puede detectar animales infectados antes del inicio de la respuesta dérmica de la hipersensibilidad de tipo retardado (Pollock et al., 2006). Esta prueba evalúa la IMC mediante la detección de IFN- $\gamma$  en respuesta a un antígeno específico bajo un sistema de cultivo con sangre completa, ante antígenos *M. bovis* PPD, ya que estos antígenos están presentes en los linfocitos en el cultivo de sangre. La producción de IFN- $\gamma$  de las células es detectada con base a un anticuerpo monoclonal mediante un Ensayo de Unión Inmunoabsorbente de Enzima (ELISA) (Díaz et al., 2003).

**Prueba de Fluorescencia Polarizada:** Empleada para realizar el inmunodiagnóstico en diversas enfermedades, goza de varias ventajas como su fácil ejecución, poco tiempo de espera y no requiere de lavados ni pasos adicionales. Surujbali y colaboradores en el 2002 utilizaron como antígeno la proteína MPB70 marcada con fluoresceína para evaluar esta prueba pudiendo detectar 26 animales positivos de un total de 28 que previamente habían sido confirmados por cultivo bacteriológico.

**Pruebas de Flujo Lateral:** Utilizada para efectuar el diagnóstico de TBB empleando varios antígenos en membranas de nitrocelulosa para la detección de anticuerpos contra antígenos micobacteriales en suero (Bermúdez et al., 2012).

**Técnicas Moleculares:** La biología molecular ha desarrollado herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento. Una región repetitiva (DR) presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*, que flanquea la secuencia IS6110 es la más comúnmente empleada. Esta región consiste en una serie de secuencias idénticas de 36 pares de bases (pb). Separadas entre sí por regiones variables de 34 o 41 pb. Esta región es detectada en aquellas muestras procesadas bajo esta técnica (Díaz et al., 2003).

La identificación de micobacterias no tuberculosas basada en pruebas fenotípicas

conduce mayormente a errores en la identificación, por lo que el método de PCR asociado al análisis de restricción enzimática (PRA-hsp65), permite la identificación acertada de micobacterias con una precisión de 90.3% para esta técnica en comparación al 77.9% de las técnicas fenotípicas (Chimara et al., 2008).

Por otra parte el estudio del gen *hupB* para la diferenciación de *Mycobacterium tuberculosis* de *M. bovis*, en un estudio realizado por Mishra y colaboradores en 2005, para su uso como análisis de rutina en muestras clínicas que no requieran de análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), en el que se observó que en dicho gen existe una diferencia de 27 pares de bases al final del extremo C, con una concordancia del 99% con una significancia estadística de  $P > 0.001$ ).

**Sensibilidad y Especificidad de Pruebas Diagnósticas:** En el caso de las pruebas tuberculina e IFN- $\gamma$ , los valores de sensibilidad y especificidad varían de forma tal que, Monaghan et al., 1994, estimó que la sensibilidad de la primera variaba entre 68-95% y la especificidad entre 96 y 99%, mientras que, Lilenbaum et al., 1999 después de realizar una comparación entre la prueba de tuberculina e IFN- $\gamma$ , determinó que la sensibilidad relativa de 88.3% y la especificidad relativa del 100% respectivamente.

González y colaboradores en 1999, luego de realizar una evaluación de las pruebas de tuberculina e IFN- $\gamma$  comparadas con la prueba de oro para tuberculosis (aislamiento de *M. bovis*) obteniendo una sensibilidad de 80.2 y 84.9% respectivamente. Mientras que un estudio realizado por Ryan et al., 2000, muestra que la prueba de IFN- $\gamma$  presenta una sensibilidad y especificidad de 85 y 93% respectivamente. Gormley y colaboradores en 2006 determinaron los valores de IFN- $\gamma$  obteniendo (88% sensibilidad y 95% de especificidad) y prueba de tuberculina (74% de sensibilidad y 99.9% de especificidad). Cagiola et al., 2004, en un estudio sobre el análisis de los posibles factores que afectan la especificidad de IFN- $\gamma$  y prueba de tuberculina, en el que obtuvo los siguientes resultados, la especificidad para IFN- $\gamma$  de 97.3% y 96.8% para la prueba de tuberculina. Luego de la revisión y análisis de diversos experimentos, es claro que, aún existe una variación de la sensibilidad y

especificidad de la prueba de PCR entre laboratorios (Zumarraga et al., 2005).

## **Prevención**

El principal propósito en el control de la tuberculosis es eliminar el riesgo de infección hacia los humanos, el diagnóstico mediante pruebas debe realizarse en asociación con la vacunación, donde animales vacunados no deban reaccionar a la prueba de tuberculina o pruebas diagnósticas alternas. BCG es actualmente la vacuna comercialmente disponible contra la tuberculosis, su eficacia en humanos varia desde 80 a 0%. Gran cantidad de estudios se han hecho respecto a esta vacuna, por otra parte estudios sobre otras alternativas, tal como, vacunas de ADN realizados en modelos de pequeños animales, no han mostrado resultados sobresalientes, ejemplos de algunas proteínas micobacteriales expresadas en estas vacunas son: MPB70, MPB83, Hsp65, Hsp70 y Apa. Una excepción en los resultados de las vacunas de ADN, fue cuando se combinaron con la proteína coestimuladora ESAT-6, mostrando un efecto en la reducción de lesiones tuberculosas y en el conteo bacteriológico (Buddle et al., 2006).

## **Tratamiento**

Existen diversas drogas para combatir la TBB, tal como, Rifampicina, Isoniazida y Estreptomycin, M. tuberculosis tiene la habilidad de mutar los genes que son el objetivo de estas drogas y crear resistencia a ellos (Sechi et al., 2001). El tratamiento de la TBB en animales no se sigue usualmente en los Estados Unidos y otros países debido a la naturaleza crónica de la enfermedad, su potencial efecto zoonótico y el costo del tratamiento.

## **Métodos de Control y Erradicación**

Históricamente la experiencia de Estados Unidos (EU) y Canadá sobre la

erradicación de la TBB se mostró similar en muchos parámetros: prevalencia inicial de la enfermedad, programas iniciales, de progreso y filosofías subyacentes en las políticas del programa. En el caso de EU, en 1917 el programa inicio como un programa de erradicación con la aprobación de indemnización a propietarios que eliminaran sus animales enfermos y nunca desviaron su meta de la erradicación. Iniciaron proveyendo de “estatus de acreditación por área” basados en programas que median la prevalencia y “hatos acreditados libres” estableciendo fuentes para proveer animales libres de TBB. Durante 50 años se mantuvieron vigilando, tiempo durante el cual se redujo del 5% a menos del 0.3%. Utilizando la prueba de Tuberculina, probaron el 15% del ganado de cada estado por año. El estatus de Estado Acreditado Libre se proveía difícilmente debido a que se requerían de 5 años consecutivos confirmados como libre de TBB y de cumplir con las reglas del Métodos Uniformes de Erradicación de Tuberculosis Bovina (UMR). La importación de becerros desde México incrementa potencialmente la exposición del ganado residente. Canadá inició su programa de erradicación en 1923 con un 4% de prevalencia y tras aplicar el sistema de indemnización junto a su programa de detección lograron llegar a una prevalencia del 0.11%. De las 10 provincias que constituyen Canadá, 8 son áreas libres (Essey y Koller, 1994).

Hay tres puntos cruciales a los que el control debe enfocarse: 1) Prevención: esta generalmente aplicada a aquellas medidas designadas a excluir la enfermedad de poblaciones no afectadas. 2) Control: describe los esfuerzos directos seguidos para reducir la frecuencia de la enfermedad en niveles biológicamente y/o económicamente justificable o que generen las menores consecuencias. 3) Erradicación: describe los esfuerzos para eliminar organismos patógenos seleccionados de un área determinada y son usualmente dirigidos a interferir con la historia natural de un organismo infeccioso y no permitir su diseminación o provocar su eliminación (Collins, 2006).

Actualmente en sitios donde la producción es predominantemente de tipo ganado vacuno de producción de carne y leche, donde todos los animales mayores de 6 semanas son probados anualmente con la prueba intradérmica comparativa cervical. De acuerdo a los estatutos normativos en cada país, pero como regla oficial, animal

probado con resultado positivo, deberá ser sacrificado y el hato involucrado estará sometido a restricciones de movilidad. Los animales reactivos serán sometidos a una exhaustiva inspección sanitaria en rastro, tomando muestras de nódulos linfáticos y tejidos apropiados para confirmación histológica y bacteriológica (Abernethy et al., 2006).

Los programas basados en pruebas regulares de tuberculina y remoción de animales infectados han sido exitosos en erradicación o la marcada reducción de la tuberculosis bovina en hatos infectados en muchos países industrializados. Sin embargo, estos programas no son viables o aceptables en muchos países en vías de desarrollo debido al alto costo implicado en su implementación y a la falta de subsidios que permitan el reemplazo de los animales sacrificados y en estos países la tuberculosis bovina continua siendo un alto riesgo para la salud pública y la producción de leche (Buddle et al., 2006).

## **Vacunación**

**BCG:** Recientes avances en el estudio inmunológico y molecular sobre la micobacteria han incrementado enormemente las opciones de vacunas contra la TB bovina. Dentro de las cuales se encuentran principalmente las vacunas vivas atenuadas como la BCG y otras cepas atenuadas de *M. bovis*, aunque más recientemente ha surgido el desarrollo de vacunas basadas en proteínas de las micobacterias o su ADN (Buddle, 2003).

*M. bovis* Bacilo Calmette-Guerin (BCG) es la vacuna más utilizada en humanos en el mundo con un estimado de 3 mil millones de dosis que han sido administradas desde que se descubrió y se realizaron las primeras pruebas en los años 1920's. BCG es una cepa viva atenuada de *M. bovis* y fue originalmente derivada de vacas con mastitis tuberculosa. A pesar de su extensa utilización, la eficacia de BCG varia enormemente en estudios en humanos y animales entre el 0 y 80% de protección (Aldwell et al., 2003).

La vacuna BCG ha sido utilizada por más de 70 años y muestra actualmente una eficacia variable demostrada en varios experimentos cuidadosamente controlados, que sugieren que la capacidad de BCG para prevenir la Tuberculosis (TB) del tipo primaria adulta esta severamente limitada. En años recientes nuevas vacunas, incluyendo cepas BCG recombinantes, vacunas de ADN y otras, han sido desarrolladas y evaluadas activamente en animales (Repique et al., 2002).

Una vacuna para ganado debe inducir protección sin hacer reaccionar a los animales a la prueba intradérmica de tuberculina cuando se expone a *M. bovis*. La vacunación por si misma no debe inducir una respuesta de la prueba de tuberculina a menos que otra prueba de diagnóstico se desarrolle para distinguir los animales vacunados de los infectados con *M. bovis*. La seguridad para los seres humanos y la mínima reacción en el sitio de vacunación en ganado son también consideraciones importantes (Buddle et al., 2002; Skinner et al., 2001). BCG por sí misma se ha utilizado como sistema de entrega para antígenos recombinados y, mientras que la mayor parte de los antígenos estudiados hasta la fecha se comparten entre BCG y *M. tuberculosis*, las estrategias podrían ser consideradas fácilmente por las cuales BCG es sobre producido en grandes cantidades para obtener un antígeno de interés particular. La importancia de defender diversos sistemas de entrega es ilustrada por el caso de Hsp65. La inmunización de ratones con la proteína Hsp65 en coadyuvante dio lugar a una protección no significativa, en tanto, la inmunización con la misma proteína expresada en varias células transfectadas produjeron protección contra desafío subsecuente *in vivo* (Young y Duncan, 1995).

La vacuna viva de BCG está normalmente liofilizada, la muerte de BCG asociada con la deshidratación y rehidratación puede influir en su eficacia protectora, ya que la BCG muerta tiene una pequeña eficacia protectora. Para determinar lo anterior se seleccionó un grupo de ciervos rojos (*Cervus elaphus*) saludables, posteriormente fueron infectados con una cepa de *M. bovis* en dosis de  $1 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), luego fueron vacunados con dos dosis con diferente concentración en UFC ( $10^4$  -  $10^8$ ), a intervalos de 6 semanas, luego se analizaron obteniéndose los

resultados siguientes: los animales vacunados con una dosis baja de BCG viva ( $10^4 - 10^7$  UFC), se produjo una protección significativa contra la infección ( $P < 0.05$ ), comparado con los no vacunados, por otra parte los vacunados con una dosis alta ( $10^8$  UFC), protegió contra la enfermedad más no contra la infección, mientras que el grupo vacunado con dosis liofilizadas mostraron resultados similares que aquellos vacunados con cepas vivas, por otra parte el grupo de animales vacunados con cepas muertas no indujeron protección contra la enfermedad o infección (Griffin et al., 2000).

**BCG recombinantes:** Las vacunas recombinantes BCG (rBCG) pueden ser útiles para el desarrollo de más efectivas vacunas micobacteriales que las BCG actualmente utilizadas. Esto, a través de dos estrategias, una es produciendo una gran cantidad de antígenos protectores autólogos y dos, alterando la permeabilidad de las membranas de los fagosomas en las células hospedadoras (Ohara y Yamada, 2001).

Aunque la evolución divergió genómicamente a *M. bovis* de *M. tuberculosis*, la producción de proteínas de bajo peso molecular como ESAT-6 induce una potente respuesta inmune. El uso de vacunas recombinantes de BCG ha generado resultados tales como: inducción de la proliferación esplenocítica y producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a PPD, lo cual indica una vacunación satisfactoria (Pym et al., 2003).

Actualmente existen nuevos tipos de preparados incluyendo rBCG y otras. Por lo que en un estudio construyeron una rBCG que expresa ESAT-6 (rBCG-1) y otra fusionada con Hsp60 (rBCG-2), evaluando la virulencia, la respuesta inmunológica humoral y celular; se retaron ratones de entre 6 y 8 semanas de edad libres de TB e infectados posteriormente con  $10^6$  UFC de *M. bovis* BCG, rBCG-1, rBCG-2 y *M. tuberculosis* H37Rv. Las rBCG's no mostraron virulencia obvia en un modelo murino, los niveles de IFN- $\gamma$  de rBCG-1 fueron estadísticamente mayores que BCG, mientras que no hubo diferencia estadísticamente significativa al compararse con rBCG-2 (Bao et al., 2003).

**Vacunas Proteicas:** El concepto de usar vacunas proteicas contra TB es atractivo

debido a que la vacunación no debe inducir reactividad a la prueba dérmica de tuberculina y la eficacia de las vacunas no se puede influenciar por la sensibilización anterior de micobacterias ambientales. La vacuna proteica reduce la media de lesiones pulmonares de TB en desafíos en bovinos e induce una no reactividad a la prueba dérmica de tuberculina. Sin embargo estos animales pueden presentar una prevalencia de extensión extra torácica de la enfermedad comparada con los no vacunados o vacunados con BCG (Hewinson et al., 2003).

Un estudio realizado en 72 vacas Holstein Friesian de seis meses de edad, libres de TB. Fue puesta a prueba una vacuna con EPF (Extracto de Proteínas Filtradas) e Interleucina-2 (IL-2), para determinar la capacidad de estimular la respuesta inmune y la protección contra una infección intratraqueal de *M. bovis*, observándose que después de cinco semanas del experimento el grupo vacunado mostró un alto nivel de EPF – IL-2 presentó una mayor producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 que el grupo control y el vacunado con BCG (Wedlock et al., 2000).

**Vacunas de ADN:** El plásmido CMV4.65 que codifica la proteína de choque térmico 65 (Hsp65) ha mostrado que induce protección y respuesta inmune terapéutica contra infecciones por *M. tuberculosis* en modelo murino cuando son inyectados repetidamente vía intramuscular (Johansen et al., 2003).

Los efectos terapéuticos de la vacuna ADN, muestran estadísticamente una reducción significativa en el número de bacterias, incremento específico en la respuesta de producción de Gamma Interferon (IFN- $\gamma$ ) y resistencia a re-infección en un ensayo en ratones hembras de 6 semanas de edad. En un ELISA de un lavado de células alveolares, se encontró substancialmente más IL-12 en respuesta a la estimulación no específica después de la vacunación terapéutica con Hsp65 (Lowrie, 2006).

En un estudio realizado en ratones de entre 6 a 8 semanas de edad infectados con *M. tuberculosis* resistente a fármacos, el grupo tratado con 100 $\mu$ g vía intramuscular de la vacuna ADN-Hsp65 mostró una reducción en la cantidad de UFC en el primer mes

de  $2.62 \times 10^5$  a  $0.09 \times 10^5$  en el sexto mes con una significancia estadística de ( $P < 0.001$ ), mientras que los no vacunados mostraron un incremento en la cantidad de UFC de  $5.58 \times 10^5$  a  $13.45 \times 10^5$  evaluado en el mismo periodo (Silva et al., 2005).

En un grupo de 48 vacas Holstein Friesian sanas de entre 5 y 6 meses de edad, vacunadas con BCG, vacuna de ADN que codifica Hsp65 y no vacunadas; se encontró que la cantidad de IFN- $\gamma$  formado fue superior en el grupo vacunado con ADN, que en el grupo vacunado con BCG y no vacunado; con valores de  $1.76 \pm 0.17$ ,  $1.27 \pm 0.08$  y  $1.65 \pm 0.15$  Log<sub>10</sub> en el número de células formadoras de IFN- $\gamma$  por  $10^6$  células mononucleares sanguíneas periféricas respectivamente por grupo, respecto a las células específicas a Hsp65 con un  $P < 0.01$  a las 10 semanas post vacunación (Skinner et al., 2003). La eficacia demostrada en un estudio realizado por Lima et al., 2003, muestran que la aplicación de la vacuna de ADN Hsp65 vía intramuscular reduce de forma significativa  $P < 0.01$ , la cantidad de UFC de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en pulmones de ratones infectados experimentalmente con esta cepa.

La vacuna de ADN induce una fuerte respuesta inmunomediada de CD4+ y CD8+ en ratones, por un lado los estudios con la vacuna ADN HSP65 sugieren que la protección celular es fuerte, es decir, ya que IFN- $\gamma$  es producido predominantemente por células T CD4+ Th1, lo que viene de la activación bajo la influencia de IL-12. Mientras que las células T CD8+ son moléculas CPH tipo I son restringidas por los efectos de las citocinas como IFN- $\gamma$  que también exhibe actividades citotóxicas, y dado que la inmunización con la vacuna ADN Ag85A sólo estimula fuertemente la respuesta por células CD8+, resulta deficiente en efecto antimicrobacteriano, debido a la no estimulación de las respuestas celulares (Buddle et al., 2002; Huygen, 2003).

**Vacunas Heterólogas:** Estudios muestran que la utilización de 100 $\mu$ g de hsp65-ADN vía intramuscular en ratones induce una respuesta inmune innata y adquirida estadísticamente significativa ( $P > 0.01$ ), así como una reducción en la cantidad de UFC en el 100% de los animales que recibieron 3 inmunizaciones (Lowrie et al., 1999, Lima et al., 2003, Lowrie D. B., 2006).

Actualmente el sistema de vacunación empleando *L. lactis* como vector para la expresión de proteínas y ADN, ha sido empleado con éxito, tanto por los efectos profilácticos como terapéuticos en diferentes modelos animales, como en un estudio donde fue empleado contra el papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16) en ratones mostrando una reducción del 35% de la presentación de cáncer inducido por este virus (Bermúdez-Humarán et al., 2011). *L. lactis* recombinante empleado en inmunizaciones vía oral en ratones induce una respuesta inmune celular estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en ensayos contra antígenos HA1 del virus influenza aviar en comparación al efecto de administrar *L. lactis* sin recombinar (Lei et al., 2011). El utilizar vacunas que permitan la expresión de proteínas heterólogas como la desarrollada por Azevedo et al (2012), estudio en el cual produjeron aproximadamente 7mg/L de Hsp65 recombinante de *Mycobacterium leprae*, concluyendo su potencial en aplicaciones que van desde las biotecnológicas, médicas e inclusive terapéuticas.

## LITERATURA CITADA

- Azevedo M. S. P., C. S. Rocha, N. Electo, D. S. Pontes, J. B. Molfetta, E. D. C. Goncalves, V. Azevedo, C. L. Silva and A. Miyoshi. 2012. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *J. Genetics and Molecular Research*. 11(2):1146-1157.
- Abernethy D. A., G. O. Denny, F. D. Menzies, P. McGuckian, N. Honhold and A. R. Roberts. 2006. The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*.
- Aldwell F. E., L. Brandt, C. Fitzpatrick and I. M. Orme. 2005. Mice fed lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG are protected against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infection and Immunity*. 73(3):1903-1905.
- Bao L. W., C. H. Zhang and X. Wang. 2003. Virulence, immunogenicity and protective efficacy two recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strains expressing the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infection and Immunity*. 71(4):1656-1661.
- Bermúdez-Humarán L.G., K. Pascale, J. M Chatel and P. Langella. 2011. Lactococci and Lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *J. Microbial Cell Factories*. 10(Suppl 1):54.
- Biet F., M. L. Boschioli, M. F. Thorel and L. A. Guilloteau. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *J. Vet. Res*. 36:411-436.
- Boletín Epidemiológico Pan American Health Association. 2002-2005. <http://www.paho.org/hia/archivosvol2/paisesing/United%20States%20Mexico%20Borden%20Area%20English.pdf>
- Buddle B. M. 2003. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. *J. Tuberculosis*. 81(1/2):125-132.
- Buddle B. M., D. N. Wedlock and M. Denis. 2006. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. *J. Veterinary Microbiology*. 112:191-200.

- Buddle B. M., M. A. Skinner, D. N. Wedlock, D. M. Collins and G. W. De Lisle. 2002. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *J. Veterinary Immunology and Immunopathology*. 87:177-185.
- Buddle B. M., N. A. Parlane, D. L. Keen, F. E. Aldwell, J. M. Pollock, K. Lighbody and P. Andersen. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *J. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 6(1):1-5.
- Cagiola M., F. Feliziani, G. Severi, P. Pasquali and D. Rutili. 2004. Analysis of Possible Factors Affecting the Specificity of the Gamma Interferon Test in Tuberculosis-Free Cattle Herds. *J. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11(5):952-956.
- Chan J., Y. Xing, R. S. Magliozzo and B. R. Bloo. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med*. 175:1111-1122.
- Coetzer J. A. W and R. C. Tustin. 2004. *Infectious Diseases of Livestock*. (3<sup>rd</sup> Ed.). Oxford University Press. South Africa, Cape Town.
- Collins F. M. 1994. The immune response to mycobacterial infection: Development of new vaccines. *J. Veterinary Microbiology*. 40:95-110.
- Collins J. D. 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *J. Veterinary Microbiology*. 112:369-381.
- Corner L. A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J. Veterinary Microbiology*. 40:53-63.
- Courtenay O., L. A. Reilly, F. P. Sweeney, V. Hibberd, S. Bryan, A. Ul-Hassan, C. Newman, D. W. Macdonald, R. J. Delahay, G. J. Wilson and E. M. H. Wellington. 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis?. *J. Biology Letters*. 2:460-462.
- De la Rua-Domenech R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of tuberculin tests,  $\gamma$ -interferon assay and other ancillary diagnosis techniques. *J. Res. Vet. Sci*.
- Díaz O. F., R. V. Banda, L. M. Jaramillo, C. D. Arriaga, D. S. González y C. C. Estrada. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando

técnicas inmunológicas y moleculares. J. Vet. Méx. 34(1):13-26.

- Essey M. A and M. A. Koller. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. J. Veterinary Microbiology. 40:15-22.
- González O. R., C.B Gutiérrez, D. Alvarez, V. A De la Puente, L. Domínguez and E. F. Rodríguez. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- $\gamma$  assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. J. Veterinary Microbiology. 70:55-66.
- Gormley D., M. B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill and J. D. Collins. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam<sup>®</sup>) assay. J. Veterinary Microbiology. 112:171-179.
- Griffin J. F. 2000. Veterinary Tuberculosis Vaccine Development. J. Clinical Infectious Disease. 30(3): S223–8.
- Hewinson R. G., H. M. Vordermeier and B. M. Buddle. 2003. Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics. J. Tuberculosis. 83:119-130.
- Howard J, L and R. A. Smith. 1999. Current Veterinary Therapy 4. Food Animal Practice. Pp. 341-344. W. B. Saunders Company. United States of America.
- Huygen K. 2003. Minireview. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of Mycobacterial diseases. J. Infection and Immunity. 71(4):1613-1621.
- Johansen P., C. Raynaud, M. Yang, M. J. Colston, R. E. Tascon and D. B. Lowrie. 2003. Anti-mycobacterial immunity induced by a single injection of *M. leprae* HSP65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles. J. Immunology Letters. 90:81-85.
- Johnston W. T., G. Gettinby, D. R. Cox, C. A. Donnelly, J. Bourne, R. Clifton-Hadley, A. M. Le Fevre, J. P. McInerney, A. Mitchell, W. I. Morrison and R. Woodroffe. 2005. Herd-level risk factors associated with tuberculosis breakdowns among cattle herds in England before the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. J. Biology Letters. 1:53-56.
- Lei H, Z. Sheng, Q Ding, J, Chen, X. Wei, D. M. K Lam and Y Xu. 2011. Evaluation of Oral Immunization with Recombinant Avian Influenza Virus HA1 Displayed on the Lactococcuslactis Surface and Combined with the Mucosal Adjuvant Cholera Toxin

Subunit B. J. Clin. Vaccine Immunol. 18(7):1046.

- Lilenbaum W., J. C. Schettini, G. N. Souza, E. R. Ribeiro, E.C. Moreira and L. S. Fonseca. 1999. Comparison between a  $\gamma$ -IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. J. Vet. Med. 46:353-358.
- Lima K. M., S. A. Dos Santos, R. R. Santos Jr., I. T. Brandão, J. M. Rodrigues Jr. and C. L. Silva. 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. J. Vaccine. 22:49-56.
- Lowrie D. B. 2006. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: Where are we now?. J. Vaccine. 24(12):1983-1989.
- Lowrie D. B., R. E. Tascon, L. D. Bonato, M. F. Lima, L. H. Faccioli, E. Stravropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling and C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. J. Nature. 400:269-271.
- Lyashchenko K., A. O. Whelan, R. Greenwald, J. M. Pollock, P. Andersen, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier. 2004. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Specific to Tuberculosis. J. Infection and Immunity. 72(5):2462-2467.
- Monaghan M. L., M. L. Doherty, J. D. Collins, J. F. Kazda and P. J. Quinn. 1994. The tuberculin test. J. Veterinary Microbiology. 40:111-124.
- Morris R. S., D. U. Pfeiffer and R. Jackson. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. J. Veterinary Microbiology. 40:153-177.
- NORMA Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995). Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
- NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
- Ohara N. and T. Yamada. 2001. Recombinant BCG vaccines. J. Vaccine. 19:4089-4098.
- Pollock J. M., J. D. Rodgers, M. D. Welsh and J. McNair. 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. J. Veterinary Microbiology. 112:141-150.
- Pollock J.M., B. M. Buddle and P. Andersen. 2001. Towards more accurate diagnosis of

bovine tuberculosis using defined antigens. *J. Tuberculosis*. 81:65-69.

Pym A. S., P. Brodin, L. Majlessi, R. Brosch, C. Demangel, Ann Williams, K. E. Griffiths, G. Marchal, C. Leclerc and S. T. Cole. 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *J. Nature Medicine*. 9(5):533-539.

Repique C. J., A. Li, F. M. Collins and S. L. Morris. 2002. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: Effect of DNA vaccination on reactivation of disease and reinfection with a secondary challenge. *J. Infection and Immunity*. 70(7):3318-3323.

Ryan T. J., B. M. Buddle and G. W. De Lisle. 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *J. Research in Veterinary Science*. 69:57-61.

Sechi L. A., S. Zanetti, M. Sanguinetti, P. Molicotti, L. Romano, G. Leori, G. Delogu, S. Boccia, M. La Sorda and G. Fadda. 2001. Molecular Basis of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Sardinia, Italy. *J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(6): 1645-1648.

Silva C. L., V. L. D. Bonato, A. A. M. Coelho-Castelo, A. O. De Souza, S. A. Santos, K. M. Lima, L. H. Faccioli and J. M. Rodrigues. 2005. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *J. Gene Therapy*. Doi:10.1038/sj.gt.3302418:1-7.

Skinner M. A., B. M. Buddle, D. N. Wedlock, D. Keen, G. W. de Lisle, R. E. Tascon, J. C. Ferraz, D. B. Lowrie, P. J. Cockle, H. M. Vordermeier and R. G. Hewinson. 2003. A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *J. Infection and Immunity*. 71(9):4901-4907.

Skinner M. A., D. N. Wedlock and B. M. Buddle. 2001. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *J. Rev. Sci. Tech*. 20(1):112-132.

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

- Thoen<sup>1</sup> C., O., J. H. Steele and M. J. Gilsdorf. 2006. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. (2<sup>nd</sup> Ed.). Blackwell Publishing.
- Thoen<sup>2</sup> C., L. Philip and I. deKantor. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *J. Veterinary Microbiology*. 112:339-345.
- Vordermeier H. M., S. G. Rhodes, G. Dean, N. Goonetilleke, K. Huygen, A. V. S. Hill, R. G. Hewinson and S. C. Gilbert. 2004. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacilli Calmette Guérin. *J. Immunology*. 112:461-470.
- Vordermeier H. M., P. C. Cockle, A. Whelan, S. Rhodes, N. Palmer, D. Bakker and R. G. Hewinson. 1999. Development of Diagnosis Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* infection in Cattle. *J. Clinical and diagnostic Laboratory immunology*. 6(5):675-682.
- Wedlock D. N., B. Vesosky, M. A. Skinner, G. W. De Lisle, I. M. Orme and B. M. Buddle. 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and Interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *J. Infection and Immunity*. 68(10):5809-5815.
- Young B. D. and K. Duncan. 1995. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *J. Annual Rev. Microbiol*. 49:641-673.
- Zumarraga M. J., V. Meikle, A. Bernardelli, A. Abdala, H. Tarabla, M. I. Romano and A. Cataldi. 2005. Use of touch down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *J. Vet. Diagn. Invest*. 17:232-238.

**“EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO MICOBACTERIAL HSP65 EN LA BACTERIA GRADO ALIMENTICIO *LACTOCOCCUS LACTIS*. (EXPRESSION OF THE MICOBACTERIAL ANTIGEN HSP65 IN FOOD GRADE *LACTOCOCCUS LACTIS* BACTERIUM)**

”

Herrera Ramírez JC<sup>a</sup>., Chávez de la Mora A<sup>a</sup>., De la Mora Valle A<sup>a</sup>., López Valencia G<sup>a</sup>., Bermúdez Hurtado RM<sup>a</sup>., Rentería Evangelista TB<sup>a</sup>. y Medina Basulto GE<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.

## Resumen

La Tuberculosis Bovina es una enfermedad zoonótica de distribución mundial de importancia para la salud pública y la industria ganadera. En años recientes se han probado diversas vacunas experimentales contra la enfermedad, obteniéndose resultados variables. Un caso es la vacuna BCG, la cual se utiliza extensamente en humanos y ha sido probada en ganado bovino mostrando resultados variables en relación a la protección (0 – 80%) contra *Mycobacterium bovis* (Thoen et al., 2006, Fine P. E., 1995). En el presente estudio se utilizó la bacteria grado alimenticio *L. lactis* como vector de expresión de la proteína micobacterial Hsp65. Para ello, se llevó a cabo la construcción de un plásmido replicable en la cepa NZ9000 de *L. lactis* (pVElepr), la cual expresó la proteína Hsp65 de *M. leprae* y fue reconocida por anticuerpos comerciales anti-Hsp65. La cepa NZ9000-pVElepr se aplicó en becerros negativos a la prueba de la tuberculina y se monitoreó la respuesta inmune, observándose, que ésta no aumentó significativamente, sin embargo, no se observaron lesiones en ninguno de los grupos en estudio, lo que sugiere que la cepa NZ9000 de *L. lactis* puede llegar a proteger contra el desarrollo de la infección.

## Abstract

Bovine tuberculosis is a zoonotic disease distributed worldwide of very importance for public health and the livestock industry. Several experimental vaccines against this disease have been tested in recent years, yielding varying results. One case is the BCG vaccine, which has been used extensively in humans and tested in cattle showing mixed results related to protection (0-80%) against *Mycobacterium bovis* (Thoen et al., 2006, P. E. Fine, 1995). In this study we used the food grade bacterium *L. lactis* as expression vector of the mycobacterial protein Hsp65. For this purpose, was conducted the construction of a replicable plasmid in strain NZ9000 *L. lactis* (pVElepr), which expressed the protein Hsp65 of *M. leprae* and was recognized by traded anti-Hsp65 antibodies. The strain NZ9000-pVElepr was applied to calves that were negative to tuberculin test and the immune response was monitored, showing that this was not significantly increased, but no injury was observed in any of the study groups,

suggesting that NZ9000 strain of *L. lactis* may protect against the development of infection.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, Hsp65, vacunación, *Lactococcus*.

Key words: Bovine tuberculosis, Hsp65, vaccination, *Lactococcus*.

## Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en México impacta económicamente reduciendo la producción de leche en la ganadera bovina en un 17%, aunado al hecho que del total nacional producido sólo el 28% de la leche se pasteuriza (Modificación NOM-031-ZOO-1995). En hatos de ganado bovino lechero en Baja California, como los ubicados en Tijuana, Baja California, México, la TBB es un problema por la alta prevalencia (16.5%) acorde a Secretaria Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria en el 2012, indicativo que las acciones contempladas en la NOM-031-ZOO-1995 no han sido suficientes para reducir significativamente la enfermedad; lo que genera la necesidad de implementar una serie de alternativas para lograr la disminución de la TBB a mediano plazo. Los estudios sobre vacunación en ganado bovino empleando la vacuna BCG ha mostrado reducir la severidad y cantidad de lesiones ( $P > 0.05$ ), empleando  $5 \times 10^3$  y  $10^6$  UFC de ésta para posteriormente retar experimentalmente utilizando *M. bovis* patógeno a una dosis de ( $5 \times 10^3$  UFC) (Buddle et al., 1995, Buddle et al., 2003. Por su parte Lopez y colaboradores en 2009 observaron que emplear BCG a razón de  $1 \times 10^6$  en condiciones de campo, la frecuencia de TBB en aquellos vacunados es del 9.7% comparado al 22.7% de los no vacunados.

Una alternativa en la estrategia inmunológica contra diversos patógenos es la utilización de bacterias Gram - positivas grado alimenticio o comensal, en particular el modelo de bacterias ácido lácticas (LABs), que han mostrado en algunos estudios inducir la respuesta inmune sistémica y en mucosas (Bermúdez-Humarán et al., 2011; Bahey-El-Din et al., 2010). Entre el grupo de LABs se encuentra *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) secuenciada genómicamente de forma completa (Bolotin et al., 2001), adicionalmente se han estudiado diversos plásmidos para la expresión de proteínas heterólogas inducibles por nisina (preservativo natural grado alimenticio) seleccionables con antibióticos, por lo que éste tipo de sistemas se perfilan como una excelente alternativa para la obtención de vacunas vivas recombinantes grado alimenticio, con adecuada eficiencia y uso extensivo (Santos Pontes et al., 2011; Nouaille et al., 2003).

El interés del presente estudio en emplear una chaperonina altamente conservada del género *Mycobacterium* como Hsp65, es por su importante rol sobre las células presentadoras de antígenos en la iniciación de la respuesta inmune innata y adquirida, a pesar que su actividad inmuno-estimuladora ha sido cuestionada (Azevedo et al, 2012). Estudios muestran que la utilización de 100µg de hsp65-ADN vía intramuscular en ratones induce una respuesta inmune innata y adquirida estadísticamente significativa ( $P > 0.01$ ), así como una reducción en la cantidad de UFC en el 100% de los animales que recibieron 3 inmunizaciones (Lowrie et al., 1999, Lima et al., 2003, Lowrie D. B., 2006). Actualmente el sistema de vacunación empleando *L. lactis* como vector para la expresión de proteínas y ADN, ha sido empleado con éxito, tanto por los efectos profilácticos como terapéuticos en diferentes modelos animales, como en un estudio donde fue empleado contra el papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16) en ratones mostrando una reducción del 35% de la presentación de cáncer inducido por este virus (Bermúdez-Humarán et al., 2011). *L. lactis* recombinante empleado en inmunizaciones vía oral en ratones induce una respuesta inmune celular estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en ensayos contra antígenos HA1 del virus influenza aviar en comparación al efecto de administrar *L. lactis* sin recombinar (Lei et al., 2011). Azevedo y colaboradores en 2012 empleando un modelo similar al propuesto en el presente estudio, produjeron aproximadamente 7mg/L de Hsp65 recombinante.

Con base en lo anterior el presente estudio tuvo como objetivo construir una cepa de *L. lactis* que exprese la proteína micobacteriana Hsp65, para su posterior caracterización. Adicionalmente se realizó un breve estudio experimental para evaluar si posee la capacidad de inducir una respuesta inmune innata y adquirida en becerros, sometidos a un subsiguiente reto experimental.

## Materiales y Métodos

Lugar de Estudio: Laboratorios de Tuberculosis y Brucelosis, Biología Molecular y Unidad Experimental del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, en la ciudad de Mexicali, Baja California, México.

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento: *L. lactis* cepa NZ9000 fue cultivada en medio Difco M17, suplementado con 0.5% de glucosa (GM17) a 30°C sin agitación. Cuando se requirió, fue adicionado 10µg/mL de cloranfenicol al medio. Las cepas de *Escherichia coli* DH5α fueron cultivadas aeróbicamente a 37°C en medio Luria-Bertani conteniendo 100µg/mL de ampicilina o 10µg/mL de cloranfenicol, cuando fue necesario.

Construcción del Plásmido: Inicialmente se amplificó a partir de ADN cromosomal de *Mycobacterium leprae* (proveído por el laboratorio de inmunología molecular y biotoxinas, CICESE, Ensenada, BC. México) conteniendo la secuencia codificante del gen hsp65 de 1627 pares de bases (GenBank: M14341.1), empleando el vector pCR – Blunt II – TOPO® (Invitrogen), insertada en *E. coli*, como huésped de clonación. La selección se efectuó en placas de agar con extracto de levadura-triptona (LB) adicionadas con 50µg/ml de Kanamicina.

Subclonación en el vector pVE5547 (Cortes-Perez et al., 2003, Dieye et al., 2001). Se realizó una subclonación mediante la utilización de una enzima de alta fidelidad (iProof™ High Fidelity DNA Polymerase, BioRad), amplificando nuevamente por PCR el gen hsp65 con los sitios NheI y Sall (oligonucleótidos pveleprcF: 5'-TGGGAGGAAAATTACAAA-3' y pveleprcR: 5'-CTTCTAAAGC TAGCAAGTCC-3'), insertándose el fragmento amplificado (hsp65) en el plásmido pVE5547 previamente digerido parcialmente con las mismas enzimas de restricción y purificado por el método S.N.A.P.™ Miniprep Kit (Invitrogen Inc.), obteniéndose un fragmento de 4791pb.

Subclonación en el vector pSEC/E7 replicable en *L. lactis*. (Bermúdez-Humarán et al., 2002) Una vez incluido el segmento de hsp65 en el vector pVE5547, fue transferido al vector pSEC/E7 mediante digestión con las enzimas de restricción BglII–NheI,

Seleccionando un fragmento de 3403 pb para su transformación final. Dando lugar a la formación del plásmido pVElepr replicable en *L. lactis*. Figura 1.

Western blot para determinación de expresión de Hsp65: Para analizar el perfil proteico en las cepas inducidas se realizó análisis electroforético de las fracciones de sobrenadante y biomasa bacteriana. Las fracciones fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 0.1 % de acuerdo al método descrito por Laemmli, 1976. Se utilizó en presencia de un gel concentrador al 5% y un gel separador al 8 % de acrilamida. Colocando 5 µg de cada fracción proteica en los carriles correspondientes y proteínas con peso molecular conocido (PROMEGA, cat V849A), los corrimientos se realizaron a 100 volts usando una solución amortiguadora de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1 %. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.2 %.

Para la inmunoelectrotransferencia se empleó el método descrito por Towbin et al. (1979). Después de la electroforésis se incubó el gel en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3) durante 1 h. La transferencia a membranas de nitrocelulosa, se realizó en un aparato Trans-Blot SD semi Dry Tranfer Cell (Bio Rad) a temperatura ambiente con voltaje constante (25 V) durante 1 h, en amortiguador de transferencia. Transferido el gel a la membrana de nitrocelulosa, se bloquearon los sitios reactivos libres con leche descremada al 5% en PBS durante 1.5 h a 37 °C, posteriormente las membranas se lavaron con PBS con Tween 20 al 0.01% (PBS-T) 5 veces, 5 min cada lavado. Se utilizo como anticuerpo primario IgG antihsp65 (Stressgen) a una dilución 1:1000 incubando una hora a temperatura ambiente, después con anticuerpo secundario IgG conejo anti IgG ratón acoplado a peroxidasa (SIGMA) a una dilución 1:4000 por una hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron reveladas para su análisis.

Animales de Estudio: 12 Becerros (3 meses de edad, raza Holstein friesan, machos castrados). Obtenidos de un hato de la región con historial de 30 años libre a TBB, los cuales fueron probados con la prueba de tuberculina intradérmica dando como resultado negativo a la misma.

Experimento en Animales de Estudio: 3 animales vacunados con *L. lactis* pSEC/E7 (grupo control), 3 animales vacunados con *L. lactis* pVElepr (grupo vacunado "V") con una dosis de  $2 \times 10^6$  UFC (1 vía intranasal y 1 vía intramuscular en el cuello), seguida de 2 dosis a intervalos de 2 semanas empleando la misma ruta y dosis; de igual forma se agruparon de grupos adicionales con las mismas condiciones que los dos anteriores diferenciados en que a los 2 meses del experimento fueron retados vía intratraqueal con *M. bovis* cepa 138 de campo (Martínez-Vidal et al., 2011) a una dosis de  $1 \times 10^4$  UFC, conformando así los grupos control retado "Control + R" y vacunados retados "V + R" respectivamente. Se colectó muestra sanguínea a intervalos de 28 días durante 6 meses. Se aplicó la prueba de tuberculina intradérmica doble comparativa al inicio del estudio (animales negativos a la prueba), previa a reto y a los 3 meses; aplicada bajo los principios establecidos en Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995), así como a los protocolos establecidos por el comité de Bioética del IICV en lo referente a procedimientos de experimentación en modelos animales in vivo, mismo que cuenta con las instalaciones y equipo apropiado para mantener los estándares de bioseguridad requeridos por el experimento.

Evaluación de Anticuerpos: Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos en placas de 96 pozos (Maxisorp NUNC™). Las placas fueron revestidas con 10ng/ pozo de proteína hsp65 de *M. bovis* recombinante comercial (Biotechnologies, Stressgen) en solución buffer carbonato – bicarbonato pH 9.6 (1.53gr/L NaCO<sub>3</sub>, 2.93gr/L NaHCO<sub>3</sub>, ajustado con Ácido Clorhídrico 37%) a 4°C por 24 horas. Luego bloqueadas con 200µl/ pozo de leche sin grasa al 3% en PBS estéril – Tween 20 a temperatura ambiente. Cada suero en el estudio fue adicionado a razón de 1:100, empleando 50µl/ pozo por 2 horas a 37°C. Para la detección de anticuerpos específicos se empleó anti IgG bovino de ratón, (Sigma) a razón de 1:20,000 por 2 horas a 37°C. Se le adicionó a cada pozo 50µl/ pozo de solución TMB (20ml buffer de citrato pH 4.0, 100µl TMB stock (0.1grs TMB, 10ml DMSO), 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%), la reacción se detuvo tras 15 minutos, con solución ácida 50µl/ pozo de 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La densidad óptica (DO) fue medida en espectrofotómetro a 450nm. La titulación de anticuerpos fue definida como el valor obtenido por pozo menos la desviación estándar de la muestra blanco.

Ensayo de Gamma Interferón (IFN). Para la determinación de  $\gamma$  - IFN, se cultivó sangre completa heparinizada en tubos de borosilicato a razón de 750 $\mu$ l, adicionando 50 $\mu$ l de antígeno (CSL, Australia) por muestra, se incubó a 37°C con humedad relativa ambiental por 24 horas, se colectó el sobrenadante y se determinó el nivel de  $\gamma$ -IFN por medio del paquete ensayo inmunoenzimático BOVIGAM (CSL, Melbourne, Australia).

Examinación Postmortem: Al finalizar el estudio (9 meses) los animales fueron enviados a un rastro de tipo inspección federal (TIF), para su sacrificio e inspección. Tras la inspección tipo federal, se colectaron para una segunda revisión en laboratorio: pulmones, ganglios retrofaríngeos y cadena ganglionar mediastínica. Se almacenaron en bolsas de biológicos identificados por animal y almacenados a 4°C para su transporte. Los tejidos fueron examinados posteriormente en su exterior en búsqueda de lesiones, seccionados (0.5 – 1cm) de grosor; los ganglios linfáticos fueron a su vez procesados para un estudio histopatológico (tinción Ziehl Neelsen para bacilos ácido alcohol resistentes y tinción hematoxilina – eosina).

(a) Pulmones: fueron examinados individualmente los lóbulos pulmonares (apical izquierdo, cardíaco izquierdo, diafragmático izquierdo, apical derecho, cardíaco derecho, diafragmático derecho y accesorio derecho). Para cada lóbulo, se aplicó el siguiente sistema de score: 0, sin lesiones visibles; 1, sin lesiones macroscópicas, pero aparecen lesiones al corte; 2, 3-5 lesiones macroscópicas con diámetro  $\leq$  de 10mm; 3, 4-6 lesiones con diámetros  $\leq$  de 10mm; 4, 1 lesión macroscópica distintiva con diámetro  $\leq$  de 10mm; 5, lesiones macroscópicas coalescentes. El score de los lóbulos individuales fue sumado para calcular la calificación pulmonar.

(b) Nódulos linfáticos: La severidad de la patología macroscópica observada en los nódulos linfáticos individuales fue evaluada bajo el siguiente sistema de score: 0, sin necrosis o lesiones visibles, 1, pequeños focos (1 a 2 mm de diámetro); 2, varios pequeños focos, o área necrótica de al menos 5 por 5 mm; 3, múltiples áreas necróticas de al menos 5 por 5 mm distribuidos a lo largo del nódulo, o un área necrótica que afecte el 5% del nódulo. El score individual de los nódulos linfáticos fue

sumado para calcular el score de nódulos linfáticos. Tanto el score de nódulos linfáticos como el pulmonar fueron considerados para determinar el score total patológico por animal. La calificación fue determinada por el mismo operador para todos los animales y así asegurar la consistencia en la misma.

Análisis Estadístico: Empleando el paquete estadístico MINITAB, se establecieron las diferencias estadísticas entre grupos en relación a las respuestas inmunes humoral y celular mediante la media  $\pm$  desviación estándar, mediante una prueba de *t* student, donde la significancia estadística fue determinada con una  $P > 0.05$ . Por su parte las correlaciones entre la respuesta inmune y el grado de lesiones fueron determinadas por un análisis no paramétrico (Prueba de Spearman Rank).

## Resultados

La cepa construida utilizando *L. lactis* NZ9000 “*L. lactis*/pVElepr” (Figura1) fue analizada para determinar la expresión de Hsp65 por Western blot (Figura2), mostrando la expresión de Hsp65 como una banda de 70 kDa la cuál no esta presente en la cepa *L. lactis*/pSEC/E7, con lo cual se demostró la capacidad de expresión y el carácter antigénico de la proteína Hsp65 expresada en *L. lactis*/pVElepr construido.

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la medición de anticuerpos específicos anti-hsp65 por espectrofotometría a 450nm, demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control y vacunado sin retar ( $P > 0.05$ ) con una desviación estándar de 0.045 y 0.079 respectivamente, de igual forma se determinó que tanto el grupo control “*L. lactis* pSEC/E7”, como el grupo vacunado “*L. lactis*/pVElepr”, mostraron que tampoco mantienen diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) con una desviación estándar de 0.101 y 0.093 respectivamente, aunque pudo apreciarse una leve activación de la respuesta inmune humoral contra antígenos hsp65 al final del estudio (muestreos 7 y 8).

Por su parte el ensayo de gamma interferón para la evaluación de la estimulación en la respuesta inmune celular durante el estudio, mostró que no hay diferencia estadística entre los grupos vacunado “V” y control ( $P > 0.05$ ) con una desviación estándar de 0.159. La misma tendencia fue observa en los grupos Control + R y V + R, aunque comparando aquellos que fueron vacunados, aquellos que fueron retados, mostraron una tendencia a mantener una respuesta inmune celular superior a los vacunados no retados (muestreos 6, 7 y 8).

Análisis de lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles con Tuberculosis bovina. Durante la inspección en rastro TIF no se detectaron lesiones visibles por lo que el 100% de los animales, por lo que fueron clasificados tanto en el apartado de pulmones analizados como en nódulos linfáticos revisados con 0 y 0 respectivamente, de igual forma la evaluación microscópica de los tejidos tampoco mostró lesión sugestiva a proceso inflamatorio.

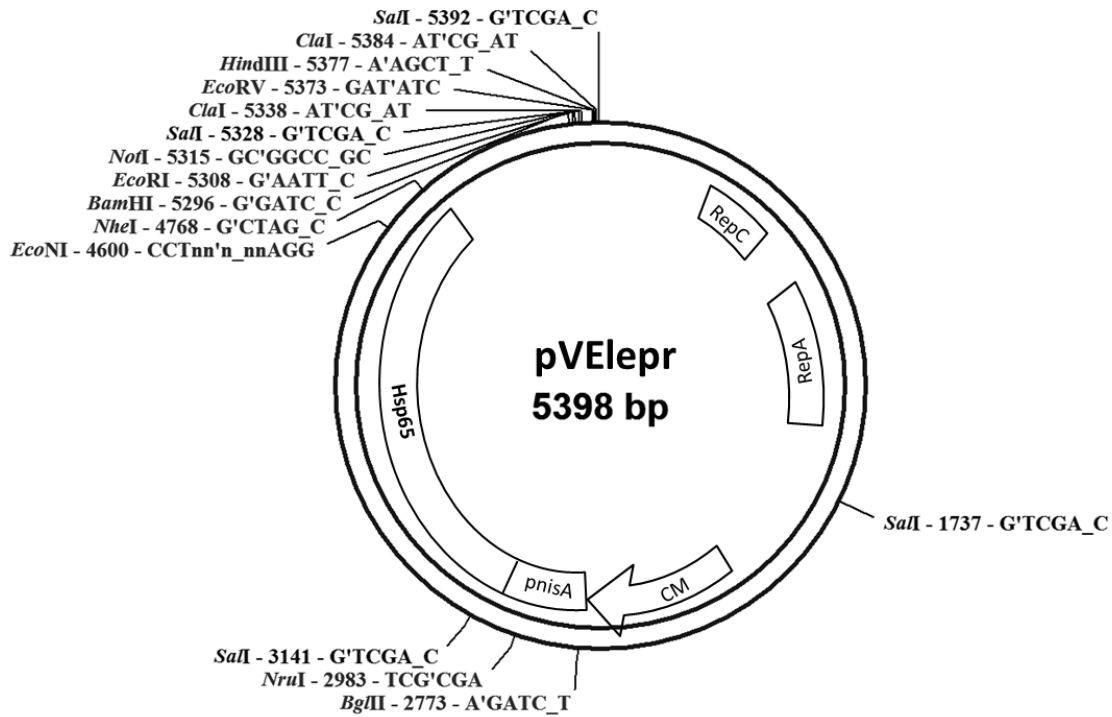
## Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio distan de ser parecidos a aquellos donde fue utilizado hsp65-ADN como inductor de la respuesta inmune innata y adquirida en ratones inmunizados y posteriormente retados ( $10^5$  UFC de *M. tuberculosis H37Rv*), donde se pudo determinar que utilizarlo a razón de 100µg vía intramuscular, permite una estimulación estadísticamente significativa de ambas respuestas inmunes ( $P > 0.01$ ) al compararlas con aquellos donde no se empleó, así como una reducción en la cantidad de UFC ( $P > 0.001$ ) (Lima et al., 2003, Lowrie et al., 1999). De manera similar difiere a los resultados obtenidos por Bermúdez-Humarán y colaboradores en 2011, donde se empleó un sistema similar al presentado por este estudio utilizando a *rL. lactis* mostrando exitosamente ser profiláctico y terapéutico contra HPV-16. En este estudio la expresión de la proteína antigénica Hsp65 utilizando *L. lactis/pVElepr* como vector apreciado en la Figura 1, probó ser antigénica al ser reconocida por anticuerpos específicos anti-hsp65 (Sigma, USA), mostrado en la Figura 2. Pero la expresión y capacidad inmunogénica luego de la administración oral e intramuscular de *L. lactis/pVElepr* no resultó ser suficiente para lograr una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos *L. lactis/pVElepr* y *L. lactis/pSEC/E7*, demostrando con ello que al parecer no posee un carácter inmunogénico o que la expresión fue muy baja, al haberse obtenido una estimulación similar tanto en la respuesta humoral como celular y tanto en los grupos retados como no retados. Lo anterior probablemente debido a la presencia de chaperoninas compatibles como es el caso de *groEL* de 60kDa contenidas en la superficie de *L. lactis* (Bolontin et al., 2001) u otro factor inespecífico no previsto en el experimento. Un dato relevante parece ser el hecho de que la administración de *L. lactis* NZ9000 es suficiente para inducir tanto una respuesta inmune humoral como celular, lo cual no ha permitido la diferenciación inmunogénica entre los grupos en estudio.

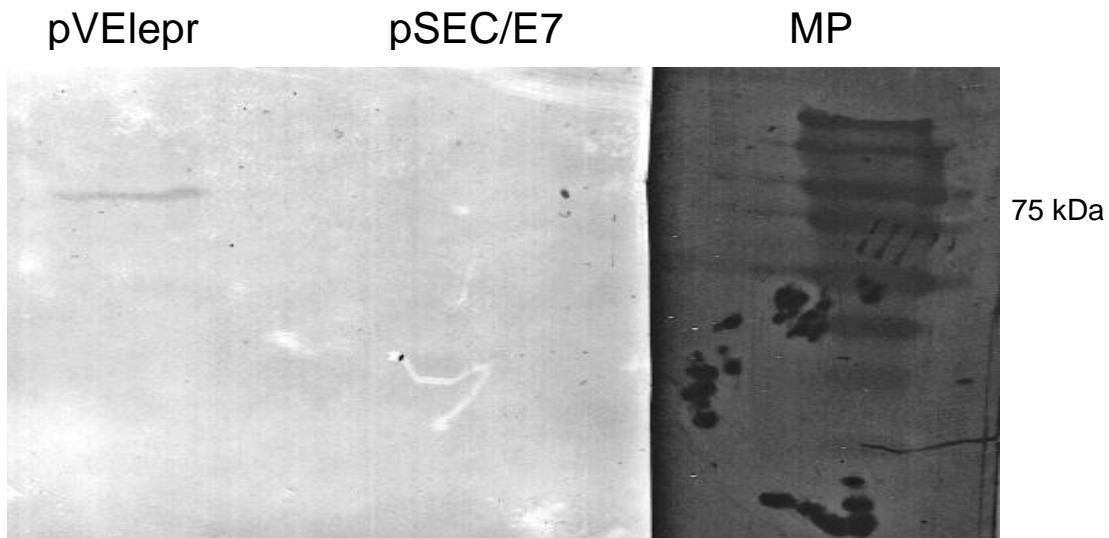
Un aspecto importante en relación a la dosis infectiva, es que pudo evidenciarse el establecimiento de la infección luego de realizar la prueba de tuberculina doble comparativa al final del estudio en el que todos los grupos que fueron retados con la cepa de campo *Mycobacterium bovis* 128 resultaron positivos tras la infección y se

mantuvieron en ese estatus inmunológico hasta el final del estudio, en comparación con los animales de los grupos no retados los cuales se mantuvieron como negativos a la misma prueba inmunológica durante todo el estudio (datos no mostrados), se pudo evidenciar tras la observación que dicha dosis infectiva no fue suficiente para inducir lesión macroscópica o microscópica alguna en los órganos analizados, por lo que una reevaluación de la cantidad de UFC necesarias para garantizar el reto en los animales en estudio deberá ser llevada a cabo. Apreciamos la necesidad de efectuar nuevos experimentos empleando la construcción elaborada en el presente estudio utilizando un mayor número de unidades experimentales, un grupo sin *L. lactis* y una dosis infectiva superior, con lo cual poder poner a prueba la efectividad protectora e inmunogenicidad proveída por la aplicación de *L. lactis*/pVElepr en protocolos que buscan como propósito general el control y posible erradicación de la tuberculosis bovina.

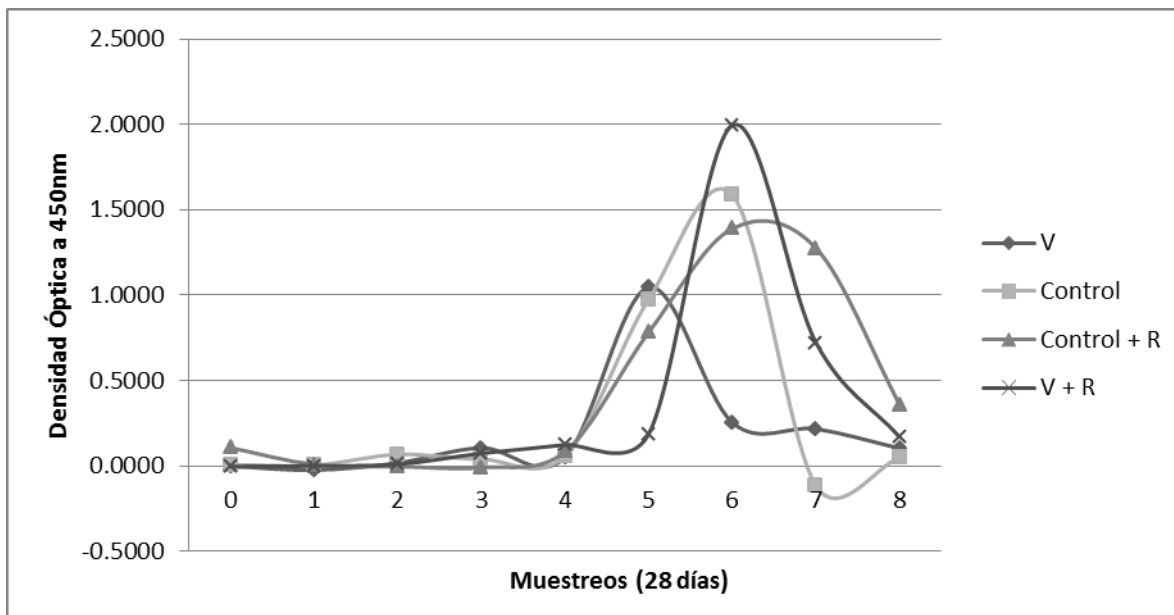
## Anexos



**Figura 1.** Plásmido final construido, replicable en *L. lactis*.



**Figura 2.** Fracción de sobrenadante resultado de la lisis. Se utilizó la cepa *L. lactis* pSEC/E7 (plásmido primario) como control negativo. La proteína hsp65 fue expresada por la cepa mencionada y reconocida en sobrenadante por anticuerpo anti-Hsp65 de *M. bovis* comercial a las 3 horas post inducción. La proteína inducida muestra un peso aproximado de 70 kDa.



**Figura 3.** Medición de la Respuesta Inmune Celular IFN- $\gamma$ .

## Literatura Citada

- Azevedo M. S. P., C. S. Rocha, N. Electo, D. S. Pontes, J. B. Molfetta, E. D. C. Goncalves, V. Azevedo, C. L. Silva & A. Miyoshi. 2012. Cytoplasmic and extracellular expression of pharmaceutical-grade mycobacterial 65-kDa heat shock protein in *Lactococcus lactis*. *J. Genetics and Molecular Research*. 11(2):1146-1157.
- Bahey-El-Din M., C. G. M Gahan & B. T. Griffin.2010. *Lactococcus lactis* as a Cell Factor for Delivery of Therapeutic Proteins. *J. Current Gene Therapy*. 10:34-45.
- Bermúdez-Humarán L.G., P. Langella, A. Miyoshi, A. Gruss, R. Tamez-Guerra, R. Montes de Oca-Luna & Y. Le Loir. 2002. Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *J. Applied and Environmental Microbiology*. 68(2):917-922.
- Bermúdez-Humarán L.G., K. Pascale, J. M Chatel & P. Langella. 2011. *Lactococci* and *Lactobacilli* as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *J. Microbial Cell Factories*. 10(Suppl 1):54.
- Bolontin A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Waissenbach, S. D. Ehrlich & A. Sorokin. 2001. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. *J. Genome Res*. 11:731-753.
- Buddle, B.M., G. W. De Lisle, A. Pfeiffer & F. E. Aldwell. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *J. Vaccine*. 13: 1123-1130.
- Buddle, B.M., D. N. Wedlock, L. A. Parlane, A. L. Corner, G. W. De Lisle & M. A. Skinner. (2003). Revaccination of neonatal Calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis Induced by a single vaccination. *J. Infection and Immunity*. 71: 6411-6419
- Cortes-Perez, N. G., L. G. Bermudez-Humaran, Y. Le Loir, C. Rodriguez-Padilla, A. Gruss, O. Saucedo-Cardenas, P. Langella, & R. Montes-de-Oca-Luna. 2003. Mice immunization with live *lactococci* displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol.Lett*. 229:37-42.
- Fine PE. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*. 346:1339–1345.

- Laemmli, U.K. 1976. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lei H, Z. Sheng, Q Ding, J, Chen, X. Wei, D. M. K Lam & Y Xu. 2011. Evaluation of Oral Immunization with Recombinant Avian Influenza Virus HA1 Displayed on the *Lactococcus lactis* Surface and Combined with the Mucosal Adjuvant Cholera Toxin Subunit B. *J. Clin. Vaccine Immunol.* 18(7):1046.
- Lima K. M., S. A. Dos Santos, R. R. Santos Jr., I. T. Brandão, J. M. Rodrigues Jr. & C. L. Silva. 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *J. Vaccine.* 22:49-56.
- Lopez-Valencia G., E. T. Renteria, J. J. Williams, N. A. Licea, V. A. De la Mora & M. G. Basulto. 2009. Evaluación en Campo de la Vacuna de *Mycobacterium bovis* BCG contra la Tuberculosis Bovina. *J. Research in Veterinary Science.*
- Lowrie D. B. 2006. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: Where are we now?. *J. Vaccine.* 24: 1983–1989.
- Lowrie D. B., R. E. Tascon, L. D. Bonato, M. F. Lima, L. H. Faccioli, E. Stravropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling & C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *J. Nature.* 400:269-271.
- Lyashchenko K., A. O. Whelan, R. Greenwald, J. M. Pollock, P. Andersen, R. G. Hewinson & H. M. Vordermeier. 2004. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Specific to Tuberculosis. *J. Infection and Immunity.* 72(5):2462-2467.
- Martínez-Vidal C., O. S. Hori, V. A. De la Mora, H. R. M. Bermúdez, E. T. B. Rentería, V. G. López, L. L. J. Galván, & B. G. E. Medina. 2011. VNTR for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle slaughtered in Baja California, Mexico. *J. RevMexCiencPecu.* 2(4):393-401.
- MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).27 de Agosto de 1998.
- NORMA Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995). Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacteriumbovis*).
- Nouille S., L. A. Ribeiro, A. Miyoshi, D. Pontes, Y. Le Loir, S. C. Oliveira, P. Langella & V. Azevedo. 2003. Heterologous protein production and delivery systems for

*Lactococcus lactis*. J. Genetics and Molecular Research. 2(1):102-111.

Pan American Health Association. 2007. Health in the Americas. Volume II – Countries. <http://www.paho.org/hia/archivosvol2/paisesing/United%20States%20Mexico%20Border%20Area%20English.pdf>

Rodriguez J. M. J., L. K. De Melo, Coelo C. A. A., Deperón B. M. V., Dos Santos S. A., L. H. Faccioli & Lopes S. C. 2004. Could a DNA vaccine be useful in the control of tuberculosis?\*. J. Brasileiro de Pneumologia 30(4):468-476.

Santos Pontes D., M. S. P. de Azevedo, J. M. Chatel, P. Langella, V. Azevedo & A. Miyoshi. 2011. *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. J. Protein Expression and Purification. 79: 165-175.

Secretaria de Salud. 2001. Programa de Acción: Tuberculosis. México, D.F. [http://www.salud.gob.mx/docprog/estrategia\\_2/tuberculosis.pdf](http://www.salud.gob.mx/docprog/estrategia_2/tuberculosis.pdf)

Secretaria Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2012. <http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=4369>

Tangchun W & R. M. Tanguay. 2006. Antibodies against heat shock proteins in environmental stresses and disease: friend or foe?. J. Cell Stress & Chaperones. 11(1):1-12.

Towbin H., T. Staehelin & J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. J. Proc. Natl. Acad. Sci. 76(9):4350-4354.

Thoen C. O., J. H. Steele & M. J. Gilsdorf. 2006. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. Blackwell Publishing, 2da Ed.

World Health Organization, 2010. Tuberculosis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

Vordermeier M. H., D. B. Lowrie & R. G. Hewinson. 2003. Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. J. Veterinary Microbiology. 93:349-359.

**“Correlation Between Histopathological, Bacteriological and PCR Diagnosis of Bovine Tuberculosis”**

H.R. Bermudez<sup>1</sup>, E.T. Renteria<sup>1</sup>, B.G. Medina<sup>1</sup>, S. Hori-Oshima<sup>1</sup>, De La Mora VA Valle<sup>1</sup>, V.G. Lopez<sup>1</sup>, W.L. Yu<sup>2</sup>, G.R. Pio<sup>1</sup>, J.C. Herrera<sup>1</sup>, C. Pujol<sup>1</sup> and K. Nielsen<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup> Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory (Fallowfield), 3851 Fallowfield R., Ottawa, Ontario, Canada K2H 8P9.

## **ABSTRACT**

About 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 and 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). 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). 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 tuberculous 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.

## MATERIALS AND METHODS

Tissue samples were collected at the postmortem inspection in an abattoir in Tijuana, Baja California from June 2006-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 carcass, placed in sterile plastic bags and were sent to the laboratory for processing. Tissue samples were split in 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 µm 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 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 10 min, centrifuged for 20 min and the supernatant fluid was decanted (Payeur et al., 1992). 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 (Liebana 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<sup>®</sup>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 MgCl<sub>2</sub>, 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 was used as a positive control. BCG was used as positive control 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<sup>-1</sup> of ethidium bromide and observed by ultraviolet light (Transilluminator, 2000 Bio Rad Inc).

### **Statistical analysis**

The statistical difference in the proportion ( $p < 0.5$ ) between the PCR and bacteriological results were estimated using Med Cal software. The sensitivity and specificity values were calculated with Epi info 6 (CDC, Atlanta, GA).

## RESULTS AND DISCUSSION

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 and 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 1).

There was not statistical difference between PCR and bacteriological proportions. The sensitivity for PCR was 67.32% using culture as reference (Table 2). The results show that the PCR do not increased the rate of detection of *M. bovis* compared with the culture but this technique will be useful for detect *M. bovis* in control programs because its rapidity, lower price and lower risk. 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.

**Table 1. Results on positives animals**

<b>Factors</b>	<b>Values</b>
Animals	553
Number gross TB like lesions	298
Mycobacteriosis <sup>a</sup>	268
Culture positive <sup>b</sup>	104
PCR positive <sup>c</sup>	123

<sup>a</sup> Confirmed by histopathology with H&E stain.

<sup>b</sup> Colonies confirmed by PCR

<sup>c</sup> On frozen tissue samples

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

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

<sup>a</sup> Stonebrick medium

<sup>b</sup> 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; Liebana 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 and Florisson, 2005). The availability of numerous commercial kits for DNA extraction from tissues and body fluids has made sample preparation simple.

## **CONCLUSION**

From this study, it is observed that 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. Risdhal, 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., McCubbing 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 Wild Dis* 33:749-758.
- Steele, J.H., 1995. Regional and Country Status Report. In: Thown CO, Steele JD, 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.