

# Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares

## Identification of *Mycobacterium bovis* infected cattle by immunological and molecular methods

Fernando Díaz Otero\*,\*\*  
Víctor Banda Ruiz\*  
Laura Jaramillo Meza\*,\*\*  
Camila Arriaga Díaz\*  
Dante González Salazar\*  
Ciro Estrada-Chávez\*

### Abstract

Diagnosis of bovine tuberculosis (TB) is usually performed by the tuberculin intradermal test, which allows detection of cattle that have been exposed to *Mycobacterium bovis*. However, in herds where control of TB is based on the identification and removal of reactors to this test, some animals in advanced stages of the disease and with open lesions do not show reactivity to tuberculin (anergic), and might remain in the herd, thus constituting a potential source of infection in susceptible cattle. The objective of this study was to use alternative methods of diagnosis to identify positive TB bovines that are not detected by the intradermal test. A dairy herd of 277 bovines, which had been under supervision by the National TB Control and Eradication Campaign in Mexico (CANETB), was selected. A serologic survey was carried out to determine the presence of antibodies against components of the culture filtrate protein extract (CFPE) by immunoenzymatic methods (ELISA). Eleven samples were considered positive as they showed optical density (OD) values equal or higher than the cut-off value (OD = 0.300). These animals were analyzed again by ELISA, using both *M. bovis* and *M. avium* CFPE, in order to confirm infection. In addition, production of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was also determined in whole blood samples using a commercial kit. DNA obtained from nasal swabs of the same animals was analyzed by spoligotyping. Results obtained in these assays indicated that 8/11 were positive to ELISA, 7/11 showed production of IFN- $\gamma$ , and 6/11 were positive by spoligotyping. Tests used in this study identified several anergic animals in this herd. It is considered that these methods could be useful in the control of TB in areas of low prevalence (<1%), since the intradermal test does not detect bovines in an advanced stage of the disease. These alternative methods could be used together with the tuberculin test for a more reliable diagnosis of tuberculosis.

**Key words:** BOVINE TUBERCULOSIS, DIAGNOSIS, ELISA, IFN- $\gamma$  SPOLIGOTYPING, DAIRY CATTLE.

Recibido el 7 de diciembre 2001 y aceptado 16 de mayo de 2002.

\* Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA, Carretera México-Toluca, Km 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

\*\* Departamento de Bacteriología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: Fernando Díaz Otero, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Departamento de Biotecnología Aplicada, Carretera México-Toluca, Km 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F., Teléfono 55701720, Fax: 55704073, E-mail: diof0009@servidor.unam.mx

## Resumen

La prueba intradérmica de la tuberculina es el método utilizado generalmente para la detección de animales que han estado en contacto con *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, en explotaciones donde se lleva a cabo un control de la tuberculosis bovina (TB) con esta prueba, la mayoría de los animales reactivos se eliminan, pero algunos animales no reactivos que se encuentran en fases terminales de la enfermedad, con lesiones abiertas, permanecen dentro del hato y constituyen un foco potencial de infección para la población susceptible. El objetivo del presente trabajo fue utilizar métodos alternos a la prueba intradérmica, para identificar animales que no son detectados por esta prueba. Se seleccionó un hato lechero de 277 animales, considerados dentro de la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis (CANETB). Se obtuvo suero de toda la explotación y se determinó la presencia de anticuerpos contra componentes del extracto proteínico del filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis* en un primer estudio. Once animales se consideraron positivos, ya que presentaron valores de densidad óptica (DO) iguales o mayores que el punto de corte (DO = 0.300). Para confirmar la infección, se obtuvieron muestras de suero de estos animales, en las cuales se determinó, nuevamente mediante ELISA, la presencia de anticuerpos contra CFPE de *M. bovis* y se compararon con los producidos contra *M. avium*; asimismo, se determinó la producción de IFN- $\gamma$  en muestras de sangre completa de estos animales, empleando un paquete comercial, y se analizó el ADN obtenido de muestras de exudado nasal por medio del método de *spoligotyping*. Los resultados de estas pruebas mostraron que 8/11 fueron positivos a ELISA, 7/11 fueron positivos a IFN- $\gamma$  y 6/11 positivos en *spoligotyping*. Las pruebas alternativas propuestas en este trabajo identificaron animales anérgicos por lo que se considera que podrían ser muy útiles para el control de la TB en zonas donde la prevalencia sea menor a 1%, ya que con la prueba intradérmica es difícil detectar animales en etapas finales de la enfermedad. Por tanto, las pruebas complementarias utilizadas representan una alternativa viable para realizar un diagnóstico más confiable.

**Palabras clave:** TUBERCULOSIS BOVINA, DIAGNÓSTICO, ELISA, IFN- $\gamma$  SPOLIGOTYPING, GANADO LECHERO.

## Introduction

Tuberculosis in humans is caused by *Mycobacterium tuberculosis* yet there is a risk of contracting the disease from the etiological agent that causes tuberculosis in cattle, *M. bovis*.<sup>1</sup> Bovine tuberculosis (TB) has been controlled in many countries by maintaining a strict identification and slaughter policy upon those animals that react positively to the tuberculin test. Furthermore, the incidence of *M. bovis*-induced tuberculosis in humans has decreased following the pasteurization of milk.<sup>2</sup> It has been shown that 30% of tuberculous cows shed *M. bovis* through the respiratory tract.<sup>3</sup> The level of *M. bovis* infection in animals depends on various factors, such as the number of organisms excreted, exposure time, proximity of the affected animal and the size of the particle that contains the viable mycobacteria.<sup>4</sup>

The use of the intradermal test, which employs a purified protein derivative (PPD) as an antigen, has been an indispensable tool for detecting cattle infected with *M. bovis*.<sup>5</sup> However, its sensitivity is insufficient, as is its specificity, given that infections caused by other mycobacteria, such as *M. avium*, *M. paratuberculosis* or atypical mycobacteria, also react.<sup>6</sup>

## Introducción

La tuberculosis en humanos es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, pero existe el riesgo de contraer esta enfermedad por *M. bovis*, agente etiológico de la tuberculosis del ganado.<sup>1</sup> La tuberculosis bovina (TB) se ha controlado en muchos países mediante la identificación y sacrificio de animales reactivos a la tuberculina. Además, la incidencia de tuberculosis humana causada por *M. bovis* ha disminuido debido a la pasteurización de la leche.<sup>2</sup> Se ha demostrado que 30% de vacas tuberculosas expulsan *M. bovis* a través del tracto respiratorio.<sup>3</sup> El grado de infección por *M. bovis* en los animales depende de varios factores, como el número de organismos excretados, el tiempo de exposición, el grado de cercanía de un animal afectado y el tamaño de la partícula que contiene las micobacterias viables.<sup>4</sup>

El empleo de la prueba intradérmica usando el derivado proteínico purificado (PPD) como antígeno, ha sido una herramienta indispensable para detectar ganado bovino infectado con *M. bovis*.<sup>5</sup> Sin embargo, su sensibilidad es insuficiente, así como su especificidad, debido a infecciones por otras micobacterias como *M. avium*, *M. paratuberculosis* o micobacterias atípicas.<sup>6</sup> Otro problema de la prueba intradérmica reside en que no detecta ani-

Another problem with this intradermal test is that it cannot detect animals that do not present delayed-type hypersensitivity (DTH) towards *M. bovis*, the so-called anergic animals, be it from disseminated infection or due to a recent infection, since in these cases cellular immunity is depressed or in a developmental phase.<sup>7</sup> Anergic animals are extremely susceptible to infections caused by intracellular microorganisms.<sup>8</sup> In cattle, several factors associated with a diminished cell-mediated immune response have been described, such as the administration of corticosteroids,<sup>9</sup> infections with bovine viral diarrhoea,<sup>10</sup> gestation and lactation.<sup>11</sup> These animals appear to produce low levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) both in cells stimulated by different fractions of *M. bovis* antigens and by bovine PPD under *in vitro* conditions.<sup>12</sup>

Research carried out on the immunological aspects of tuberculosis have found that cell-mediated immunity has an important role in the resistance against this illness.<sup>13</sup> In the 1990's, a simple and quick test to detect cattle with TB was developed.<sup>14</sup> This test evaluated cellular immunity via the detection of IFN- $\gamma$  produced in response to a specific antigen in a whole blood culture. In general, an animal infected with *M. bovis* has circulating lymphocytes that recognize the mycobacteria antigens present in the PPD, and, as a result, they secrete IFN- $\gamma$  that can be detected via an immunoenzymatic assay that uses monoclonal antibodies.<sup>15</sup>

In other studies, molecular biologists have developed tools such as the polymerase chain reaction (PCR) that can be used to diagnose intracellular bacterial diseases that are hard to culture. In spoligotyping, PCR is used to amplify a direct repeat region (DR), which flanks the IS6110 sequence and is only present in members of the *M. tuberculosis* complex.<sup>16</sup> This region consists of a series of identical 36 base pairs (bp) DR's, alternating with 34- to 41-bp unique spacer sequences.<sup>17</sup> The products of the amplification are hybridized with synthetic oligonucleotides, which are fixed on a nylon membrane and which correspond to the spacer sequences of the DR's. This method has been employed in typifying isolates and, not long ago, was used on clinical samples for diagnostic purposes. In this study it was used to detect mycobacteria DNA in nasal swab samples.<sup>18</sup>

The objective of the present study was to detect anergic animals (those that did not present cellular immunity) in a dairy herd considered to be free of bovine tuberculosis, by using diagnostic methods different from the intradermal tuberculin test. To this end, the presence of antibodies against mycobacteria antigens was determined using ELISA;<sup>19</sup> the

males sin hipersensibilidad tardía (HT) hacia *M. bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una infección diseminada o con una infección reciente, debido a que en estos casos la inmunidad celular se encuentra deprimida o en proceso de desarrollo.<sup>7</sup> Los animales anérgicos son extremadamente susceptibles a infecciones por microorganismos intracelulares.<sup>8</sup> En bovinos se han descrito factores asociados con la disminución de la respuesta inmune mediada por células, tales como la administración de corticosteroides,<sup>9</sup> infecciones con el virus de diarrea viral bovina,<sup>10</sup> la influencia del estado de gestación y lactancia.<sup>11</sup> Estos animales, al parecer, producen niveles bajos de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), tanto en células estimuladas con diferentes fracciones de antígenos de *M. bovis*, como con PPD bovino bajo condiciones *in vitro*.<sup>12</sup>

En investigaciones efectuadas sobre los aspectos inmunológicos de la tuberculosis se ha encontrado que la inmunidad mediada por células participa de manera relevante en la resistencia a esta enfermedad.<sup>13</sup> En la década de los noventa del siglo pasado, se desarrolló una prueba simple y rápida para detectar bovinos tuberculosos,<sup>14</sup> esta prueba evalúa la inmunidad celular mediante la detección del IFN- $\gamma$  en respuesta a un antígeno específico bajo un sistema de cultivo con sangre completa. En general, un animal infectado con *M. bovis*, tiene en la sangre linfocitos que reconocen antígenos micobacterianos presentes en el PPD; como resultado inducen la secreción del IFN- $\gamma$ , que puede ser detectado por un ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos monoclonales.<sup>15</sup>

Por otra parte, 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. En el método conocido como *spoligotyping* se amplifica por PCR, una región repetitiva (DR) presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*, que flanquea la secuencia IS6110.<sup>16</sup> Esta región consiste en una serie de secuencias idénticas de 36 pares de bases (pb), separadas entre sí por regiones variables de 34 a 41 pb.<sup>17</sup> Los productos de amplificación se hibridan con oligonucleótidos sintéticos, fijados a una membrana de nailon, que corresponden a las regiones espaciadoras de DR. Este método se ha empleado en la tipificación de aislados, no hace mucho se ha utilizado esta técnica en muestras clínicas con fines diagnósticos; en este trabajo se usó en la detección de ADN de micobacterias en muestras de exudado nasal.<sup>18</sup>

El objetivo del presente trabajo fue detectar animales anérgicos (ausencia de la inmunidad celular) en un hato lechero considerado libre de tuberculosis bovina, mediante métodos de diagnóstico diferentes a la prueba intradérmica. Para dicho fin se determinó mediante ELISA,<sup>19</sup> la presencia de anticuerpos contra antígenos micobacterianos; se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  en muestras de sangre estimuladas con PPD bovino, PPD

*in vitro* production of IFN- $\gamma$  was evaluated in blood samples that had been stimulated with bovine PPD, avian PPD, as well as non-stimulated samples; as well as confirming the presence of *M. bovis* DNA from nasal swabs by using spoligotyping.

## Material y methods

### Study animals

The study was carried out on a dairy farm with 277 Holstein-Friesian cows that had been maintained under the National TB Control and Eradication Campaign in Mexico (CANETB). During the five years prior to the study all animals found to be positive to the simple caudal intradermal tuberculin test (bovine PPD) were eliminated; the herd was considered to be free of TB given that the intradermal tuberculin tests from the previous year had all been negative. At the beginning of the study, a double comparative tuberculin test (bovine and avian PPD) was carried out and no positive reactors were discovered. Sera were obtained from all the animals following the tuberculin test, these were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$ . For the second sampling, 11 animals with high antibody levels against *M. bovis* culture filtrate protein extract (CFPE), evaluated via an ELISA and considered suspicious for being anergic, were selected. Both sera and whole blood without anticoagulant were collected from these animals in order to test for IFN- $\gamma$ , and nasal swab samples were collected in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) for spoligotyping.

### Antigens employed in ELISA

To obtain mycobacterial CFPE from *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4, these were cultured in Dorsett-Henley medium for six weeks.<sup>20</sup> At the end of the incubation period the bacterial mass was eliminated by filtration, using asbestos and cellulose filters,\* followed by 1.2, 0.45 and 0.22  $\mu\text{m}$  millipore filters.\*\* The proteins present on the residual liquid were precipitated with 80% ammonium sulfate at constant stirring and  $4^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. The precipitate was centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  for 60 minutes at 20 000  $g^{***}$  and then resuspended in 10 ml of PBS with a pH of 7.2. This was then exhaustively dialyzed in dialysis bags,<sup>†</sup> taking the cut-off point at 3 500 kDa at  $4^{\circ}\text{C}$  for 48 h with PBS. The material obtained was designated the culture filtrate protein extract (CFPE). The protein content of the CFPE was determined using Bradford's method,<sup>21</sup> the concentration was adjusted to 35.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and this was then stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

aviar y sin estimular bajo condiciones *in vitro*, y se confirmó la presencia de ADN de *M. bovis* en exudado nasal mediante spoligotyping.

## Material y métodos

### Animales de estudio

El estudio se realizó en una explotación lechera con 277 animales de la raza Hostein-Fresian, que se ha mantenido bajo la Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis (CANETB). Durante el transcurso de cinco años previos se eliminó a todo animal reactor a la tuberculina simple caudal (PPD bovino) y se consideraba hato libre de TB, ya que las pruebas de tuberculina realizadas en el último año habían sido negativas. Al inicio de este estudio se aplicó la tuberculina doble comparativa (PPD bovino y aviar), y no se encontraron reactores positivos. Se obtuvo suero de todos los animales después de la tuberculina y se conservó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En un segundo muestreo se seleccionaron 11 animales con altos títulos de anticuerpos contra el extracto proteínico del filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*, evaluados por ELISA y sospechosos de ser bovinos anérgicos. Además de obtener suero de estos animales, se tomó sangre con anticoagulante para la prueba de IFN- $\gamma$  y muestras de exudado nasal en solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2) estéril para realizar el spoligotyping.

### Antígenos empleados en el ELISA

Para la obtención del CFPE de las micobacterias de *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4, se cultivaron en medio líquido de Dorsett-Henley durante seis semanas.<sup>20</sup> Al final del periodo de incubación la masa bacteriana se eliminó por medio de filtración, empleando filtros de asbesto y celulosa,\* y posteriormente en filtros millipore\*\* de 1.2, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ . Las proteínas presentes en el líquido residual se precipitaron con sulfato de amonio al 80%, con agitación constante a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El precipitado se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos a 20 000  $g^{***}$  y fue resuspendido en 10 ml de PBS pH 7.2; posteriormente fue dializado exhaustivamente en bolsas de diálisis,<sup>†</sup> con un punto de corte de 3 500 kDa a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas con PBS. El material obtenido se designó como extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE). El contenido de proteína de los CFPE se determinó por medio del método de Bradford,<sup>21</sup> la concentración se ajustó a 35.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

\*Carlson Ford 1/1250 BK90 Seitz K2.

\*\*Millipore Corp., Bedford, Mass.

\*\*\*Beckman rotor JS-13.1.

†Spectra/Por N° 3787D-40.

## ELISA technique

In the first analysis, a simple ELISA using only *M. bovis* was carried out. The second analysis used a comparative ELISA of both *M. bovis* and *M. avium* CFPE. For sensitizing the wells\* 5 µg of protein/100 µl per well, were used, in a carbonate solution (0.1 M, pH 9.6). The wells were maintained at room temperature for 24 hours, the solution was discarded and the wells were then washed three times with 0.3% PBS-Triton X-100, then three times with 0.1% PBS-Tween-20. Then 100 µl of the blocking solution (2% low-fat milk with 0.1% PBS-Tween) was placed in the wells, then incubated for 1 h at 37°C and then washed six times with 0.1% PBS-Tween. Duplicate sera were used at a 1:100 dilution in blocking solution and incubated for 1 h at 37°C. The wells were washed once more and 100 µl of protein-G\*\* in a 1:10 000 dilution in blocking solution, was added, and then incubated for 1 h at 37°C. After another five washes, 100 µl of revealer (10 ml citrate-phosphate buffered solution, pH 4.5, 4 µg of ortho-fenilendiamine and 4 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per well, were added. The reaction was interrupted after 20 min to add 50 µl/well of stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M). The wells were read at a 492 nm wavelength, comparing them with a 650 nm reference filter.<sup>22</sup>

The antibody response to *M. bovis* CFPE was analyzed by establishing an average cut-off optical density (OD)<sub>492</sub> value plus two standard deviations (SD) ( $P < 0.0005$ ) in a group of 30 healthy animals, who came from a low TB incidence area (Sonora, Mexico) and who had undergone tuberculin, IFN-γ and PCR tests in blood and nasal swab samples, as well as *post mortem* and bacteriological analysis. All the tests employed confirmed the absence of tuberculosis and *M. bovis* infection. Furthermore, the same cut-off value was established, calculating said value with the results obtained from the test herd which was also considered to be free of TB (data not shown).<sup>23</sup> Serum from a bovine that had lesions and was shown to be positive for *M. bovis* both through histopathology and bacterial isolation, was used as the positive control.

## IFN-γ test

Heparinized blood from 11 animals selected through a simple ELISA was obtained. The blood was distributed in 1.5 ml aliquots under sterile conditions onto microplates with 24 wells that had been stimulated with 100 µl of *M. bovis* PPD, 100 µl of *M. avium* PPD (both containing 300 µg/ml of protein) and one control well, with no antigen. The microplates were incubated at 37°C for 24 h in a humidified atmosphere and

## Técnica de ELISA

En la primera exploración se realizó un ELISA simple en la que sólo se empleó el CFPE de *M. bovis*. En el segundo muestreo se practicó ELISA comparativo, empleando CFPE de *M. bovis* y *M. avium*. Para la sensibilización de las placas\* se usaron 5 µg de proteína/100 µl por pozo, en solución de carbonatos (0.1 M) pH 9.6. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas, se descartó la solución y posteriormente se lavaron tres veces con PBS-Tritón X-100 al 0.3% y tres veces con PBS-Tween-20 al 0.1%. Se colocaron 100 µl de la solución bloqueadora (leche descremada al 2% en PBS-Tween al 0.1%), las placas se incubaron durante una hora a 37°C y se lavaron seis veces con PBS-Tween al 0.1%. Los sueros se trabajaron por duplicado a una dilución de 1:100 en solución bloqueadora e incubando una hora a 37°C. Nuevamente se lavaron las placas y se agregaron 100 µl de proteína-G\*\* 1:10 000 en solución bloqueadora, incubando una hora a 37°C. Después de lavar nuevamente cinco veces, se agregaron 100 µl por pozo de solución de revelado (10 ml solución amortiguadora de citratos-fosfatos pH 4.5, 4 µg de orto-fenilendiamina y 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La reacción se interrumpió a los 20 min adicionando 50 µl/pozo de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm, comparando con un filtro de referencia de 650 nm.<sup>22</sup>

La respuesta de anticuerpos a CFPE de *M. bovis* se analizó estableciendo como valor de corte la densidad óptica (DO)<sub>492</sub> promedio más dos desviaciones estándar (DS) ( $P < 0.0005$ ) de un grupo de 30 animales sanos, provenientes de una zona de baja incidencia de TB (Sonora, México), a los cuales se les realizó pruebas de tuberculina, IFN-γ, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de sangre y exudado nasal, así como inspección *post mortem* y análisis bacteriológico. Todas las pruebas empleadas confirmaron la ausencia de tuberculosis o infección de *M. bovis*. Asimismo, se estableció el mismo criterio de valor de corte, pero calculando dicho punto con los resultados del hato problema considerado también libre de TB (datos no mostrados).<sup>23</sup> Como testigo positivo se utilizó suero de un bovino que presentaba lesiones y en el que se demostró mediante histopatología y aislamiento bacteriológico la presencia de *M. bovis*.

## Prueba de IFN-γ

Se obtuvo sangre heparinizada de once animales seleccionados por ELISA simple. La sangre se distribuyó en condiciones de esterilidad en placas de 24 pozos a razón

\* Nunc-Immuno Plate MaxiSorp.

\*\*Sigma, P-8170, recombinant protein conjugated with peroxidase.

\*\*\* Miniblotter 45 Immunetics, Cambridge, MA, USA.

5% CO<sub>2</sub>.<sup>24</sup> Following this, plasma was harvested and stored at -70°C before assay. Plasma assays were done in duplicate to determine levels of IFN-γ using a commercial package.\* The test was carried out and interpreted following the manufacturer's instructions. 100 μl/well of 1:2 diluted plasma was added to the microplates sensitized to the bovine anti-IFN-γ antibody and incubated at room temperature for 60 min. The results of the diagnosis were calculated considering the average DO<sub>450</sub> of the samples incubated without antigen, with bovine and avian PPD for each animal. Plasma incubated with bovine PPD was compared against the negative IFN-γ control. The results of the samples stimulated with bovine PPD were compared against those stimulated with avian PPD.

### Spoligotyping method

The nasal exudate samples were obtained using a sterile swab and kept at -70°C prior to evaluation. DNA was extracted from each nasal exudate sample using the Van Soolingen method.<sup>25</sup> The positive controls were *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* AN5 DNA, the negative control was *M. avium* DN4 DNA and Milli-Q water. The Kamerbeek *et al.*<sup>17</sup> spoligotyping methodology was followed. The oligonucleotides primers were: DRa 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3' marked with biotin and DRb 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC -3'. The reaction was continued until a final volume of 50 μl, with the following concentrations: DNTP 10 mM, 1.5 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 pM of each of the initiators, 0.625 U Taq polymerase\*\* and 100 ng of DNA of each of the problem samples, were obtained. A 30 cycle amplification was carried out under the following conditions: 1 min at 96°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C. For the hybridization, each of the amplification products (20 μl) was mixed with 150 μl of 2X SSPE buffer (NaCl 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M, EDTA 0.02M [pH 7.4]) supplemented with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). To denature, the mixture was heated for 10 min at 100°C and immediately cooled in ice. The nylon membranes with their different spacers (donated by D. van Soolingen)<sup>25</sup> were washed with 250 ml of SSPE-0.1% SDS for 5 min at 60°C and placed in a miniblotted chamber.\*\*\* For hybridization, the amplification products were added to the slots and incubated at 60°C for 1 h. Following this, the nylon membrane was placed in a hybridization tube, washed with 250 ml of SSPE-0.5% SDS for 10 min at 60°C and incubated in the presence of streptoavidin-peroxidase\* conjugate in a 1:4 000 dilution, in SSPE-0.6% SDS for 45 min at 42°C and was then rinsed at room temperature. Chemoluminescence was used as a revealer, and thus 20 ml of the detection reagent (ECL)\*\* was

de 1.5 ml de sangre por pozo, estimulados con 100 μl de PPD de *M. bovis*, 100 μl de PPD de *M. avium* (ambos PPD a 300 μg/ml de proteína) y un pozo sin antígeno como testigo. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.<sup>24</sup> Posteriormente se cosechó el plasma y se conservó a -70°C hasta su evaluación. Los plasmas obtenidos fueron ensayados por duplicado para determinar el nivel de IFN-γ, mediante un paquete comercial.\* La prueba se realizó e interpretó conforme a las disposiciones del fabricante. Se agregaron 100 μl/pozo de los plasmas diluidos 1:2, en las placas sensibilizadas con el anticuerpo anti-IFN-γ bovino y se incubó a temperatura ambiente por 60 min. Los resultados del diagnóstico se calcularon considerando los promedios de DO<sub>450</sub> de las muestras incubadas sin antígeno, con PPD bovino y con PPD aviar de cada animal. Los plasmas incubados con PPD bovino se compararon contra el testigo de IFN-γ negativo de la prueba. Los resultados de las muestras estimuladas con PPD bovino se compararon con las estimuladas con PPD aviar.

### Método de spoligotyping

Las muestras de exudado nasal se obtuvieron por medio de un hisopo estéril y se mantuvieron a -70°C hasta su evaluación. De cada muestra de exudado nasal se extrajo el ADN por el método de Van Soolingen.<sup>25</sup> Como testigos positivos se empleó ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AN5, y como testigo negativo ADN de *M. avium* DN4 y agua Milli-Q. Para el análisis por spoligotyping se siguió esencialmente el método descrito por Kamerbeek *et al.*<sup>17</sup> Los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron: DRa 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3' marcado con biotina y el DRb 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC -3'. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl a las siguientes concentraciones de: DNTP 10 mM, 1.5 mM Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 pM de cada uno de los iniciadores, 0.625 U Taq polimerasa\*\* y 100 ng de ADN de cada muestra problema. Se amplificó por 30 ciclos bajo las siguientes condiciones: 1 min a 96°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. Para la hibridación, cada producto de amplificación (20 μl) se mezcló con 150 μl de amortiguador 2X de SSPE (NaCl 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M, EDTA 0.02M pH 7.4) en 0.1% dodecilsulfato de sodio (SDS) y para desnaturalizar, la mezcla se calentó por 10 min a 100°C y se enfrió inmediatamente en hielo. Las membranas de nailon con los distintos espaciadores (donados por D. van Soolingen)<sup>25</sup> se lavaron con 250 ml de SSPE en 0.1% SDS durante 5 min a 60°C, y se colocaron en una cámara miniblotted.\*\*\* Para la hibridación, los productos de amplificación se añadieron a los carriles y se incubó a 60°C

\* BOVIGAM, Bovine Gamma Interferon Test CSL Veterinary.

\*\* Perkin- Elmer.

\*\*\* Miniblotted 45 Immunetics, Cambridge, MA. USA.

added, and then incubated for 1 min at room temperature. Finally, the membrane was covered with transparent plastic and exposed to radiographic\*\*\* film for 5 min in a darkroom.<sup>26</sup>

## Histopathology

The animals used in the study originated from a private herd that was considered to be negative by the CANETB, making it impossible, therefore, to obtain slaughterhouse results from all of them. However, those animals that resulted to be positive through ELISA or spoligotyping studies, but negative to IFN- $\gamma$  analysis (Group 1), underwent complete *post mortem* inspection to confirm the utility of the different tests. Lymph nodes (parotid, retropharyngeal, mandibular, traqueobronchial and mediastinal), lung and intestinal samples were obtained given the increased probability of locating in these the granulomatous lesions suggestive of tuberculosis.<sup>27</sup> The tissue samples were processed and examined carefully under the microscope.<sup>28,29</sup>

## Results

In the first analysis of 277 animals, evaluated using only a simple ELISA with *M. bovis* CFPE, 11 animals were detected to have high levels of antibodies. Eight of these has OD values above the cut-off point (OD<sub>450</sub> 0.300), the other three were close to this value (Figure 1).

The three types of diagnostic tests employed (comparative ELISA, IFN- $\gamma$  and spoligotyping) produced a heterogeneous response in the animals selected. The results were defined into three main groups based on the patterns obtained (Table 1). In three animals (B141, B162 and B269) there was a negative response to the intradermal tuberculin test and to IFN- $\gamma$ . The titers against *M. bovis* CFPE were above the 0.300 OD<sub>450</sub> and *M. bovis* DNA was obtained from nasal exudates using spoligotyping. This type of response defined Group 1. On post mortem inspection and histopathology of the animals in Group 1, no lesions indicative of TB were found.

In Group 2, animals 264, B324 and 1056 were found to be positive in all three tests. While in Group 3, animal B277, B326 and 371 showed positivity to ELISA and IFN- $\gamma$ , but were negative to spoligotyping. In only one of them were high levels of antibodies found (B326).

Two animals had high levels of antibodies against *M. avium*. One of them (2013) was also positive to IFN- $\gamma$  and B264 was negative to all the tests carried out in the second analysis (Table 1).

durante una hora. Posteriormente, la membrana de nailon se colocó en un tubo de hibridización, se lavó con 250 ml de SSPE en 0.5 % SDS durante 10 min a 60°C, y se incubó en presencia del conjugado de estreptoavidina/peroxidasa\* a una dilución 1:4000, en SSPE/0.6% de SDS durante 45 min a 42°C; después de la incubación se lavó a temperatura ambiente. Para revelar se usó quimioluminiscencia, para lo cual se añadieron 20 ml de reactivo de detección (ECL),\*\* y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Por último, la membrana se cubrió con plástico transparente y fue expuesta a película de rayos X\*\*\* durante 5 min en cuarto oscuro.<sup>26</sup>

## Estudio histopatológico

Los animales utilizados en el estudio provenían de un hato comercial, considerado negativo por la CANETB, lo que impidió dar seguimiento a rastro a todos ellos. Sin embargo, los animales positivos en ELISA y spoligotyping, pero negativos al análisis de IFN- $\gamma$  (grupo 1), fueron sometidos a una inspección *post mortem* para confirmar la utilidad de las pruebas. Se seleccionaron nódulos linfáticos (parotídeos, retrofaríngeos, mandibulares, traqueobronquiales y mediastínicos) y muestras de tejido de pulmones e intestino, por la probabilidad de encontrar en ellos lesiones granulomatosas, sugestivas a tuberculosis.<sup>27</sup> Los tejidos fueron procesados y se revisaron mediante un minucioso análisis histopatológico.<sup>28,29</sup>

## Resultados

En el primer sondeo de los 277 animales valorados por ELISA simple, con CFPE de *M. bovis*, se encontraron once animales con títulos altos de anticuerpos. Ocho de ellos con valores de DO por encima del punto de corte (0.300 DO<sub>450</sub>), y tres cercanos a este valor de corte (Figura 1).

Con las tres pruebas de diagnóstico empleadas (ELISA comparativo, IFN- $\gamma$  y spoligotyping) el patrón de respuesta fue heterogéneo en los animales seleccionados. Los resultados fueron definidos en tres principales grupos de acuerdo con los patrones obtenidos (Cuadro 1). En tres animales (B141, B162 y B269) se observó una negatividad a la prueba intradérmica y a la de IFN- $\gamma$ . Los títulos hacia el CFPE de *M. bovis* fueron superiores a 0.300 DO<sub>450</sub> y se pudo revelar la presencia de ADN de *M. bovis* a partir del exudado nasal por spoligotyping; este modelo de respuesta definió al grupo 1. A la inspección *post mortem* y en el análisis histopatológico de los animales del grupo 1, no se encontraron lesiones indicativas de TB.

\* Boehringer.

\*\* Amersham Pharmacia Biotech. UK.

\*\*\* Eastman Kodak Company, Rochester, NY N° 603 1876.

The DNA identified in the six individuals found to be positive through spoligotyping (Table 1: Groups 1 and 2) corresponded to *M. bovis*, given that we obtained similar patterns lacking the 39 and 43 spacer regions (Figure 2). Though differences were seen in all the patterns, they were grouped in two genetically different families, as evidenced by the SPSS statistical program for Windows 8.0.

## Discussion

The diagnosis of TB, obtained through interdermal tuberculin testing and bacterial isolation is not completely efficient in the control and eradication of the illness in cattle.<sup>30</sup> It is thus necessary to employ different complementary tests both during an eradication campaign and when undertaking epidemiological studies in areas where TB is endemic.

The present study selected animals with high antibody titers against *M. bovis* CFPE identified through a simple ELISA, from a bovine herd considered to be TB-free by international standards.<sup>31</sup> Following this, a comparative ELISA determined the level of antibodies against *M. bovis* and *M. avium*

En el grupo 2, los animales 264, B324 y 1056 fueron positivos en las tres pruebas. En el grupo 3, los animales B277, B326 y 371 mostraron ser positivos para ELISA e IFN- $\gamma$ , pero negativos por spoligotyping. Sólo uno de ellos tuvo títulos altos de anticuerpos (B326).

Dos animales mostraron altos títulos de anticuerpos preferentemente hacia *M. avium*. Uno de ellos (2013) fue también positivo a IFN- $\gamma$ ; el B264 fue negativo en todas las demás pruebas efectuadas en el segundo sondeo (Cuadro 1).

El ADN identificado en los seis bovinos positivos por spoligotyping (Cuadro 1: grupos 1 y 2) correspondió a *M. bovis*, ya que se obtuvieron patrones característicos que muestran la ausencia de las regiones espaciadoras 39 al 43 (Figura 2). Aunque se observaron diferencias en todos los patrones, se agruparon solamente en dos familias genéticas diferentes, de acuerdo con el análisis realizado por el programa estadístico SPSS para Windows 8.0.

## Discusión

El diagnóstico de la TB, obtenido por la prueba intradérmica y el aislamiento bacteriológico no es completamente eficiente para el control y erradicación de la

**Cuadro 1**  
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO COMPLEMENTARIAS A LA TUBERCULINA APLICADAS A LOS ANIMALES SELECCIONADOS POR ELISA SIMPLE (CFPE *M. bovis*)  
RESULTS OF THE COMPLEMENTARY DIAGNOSTIC TESTS APPLIED ON ANIMALS SELECTED USING A SIMPLE ELISA (*M. bovis* CFPE)

Groups	Num.	Comparative ELISA				
		<i>M. bovis</i> *		<i>M. avium</i>	Spoligotyping	IFN-g**
1	B141	0.502	+	0.146	+	-
	B162	0.460	+	0.19	+	-
	B260	0.386	+	0.32	+	-
2	264	0.403	+	0.14	+	+
	B324	0.356	+	0.351	+	+
	1056	0.367	+	0.277	+	+
3	B277	0.298	+	0.239	-	+
	B326	0.525	+	0.439	-	+
	371	0.371	+	0.373	-	+
	*** 2013	0.296	-	0.523	+	+
	*** B264	0.188	-	0.544	+	-

\*The antibody response to *M. bovis* and *M. avium* CFPE was established using an average optical density (OD)<sub>492</sub> plus two standard deviations (SD) obtained in 30 healthy animals.

\*\*Animals stimulated with bovine PPD that had values higher than 0.083 D<sub>450</sub> were considered positive to IFN-g

\*\*\* Preferentially reactive to *M. avium* CFPE.



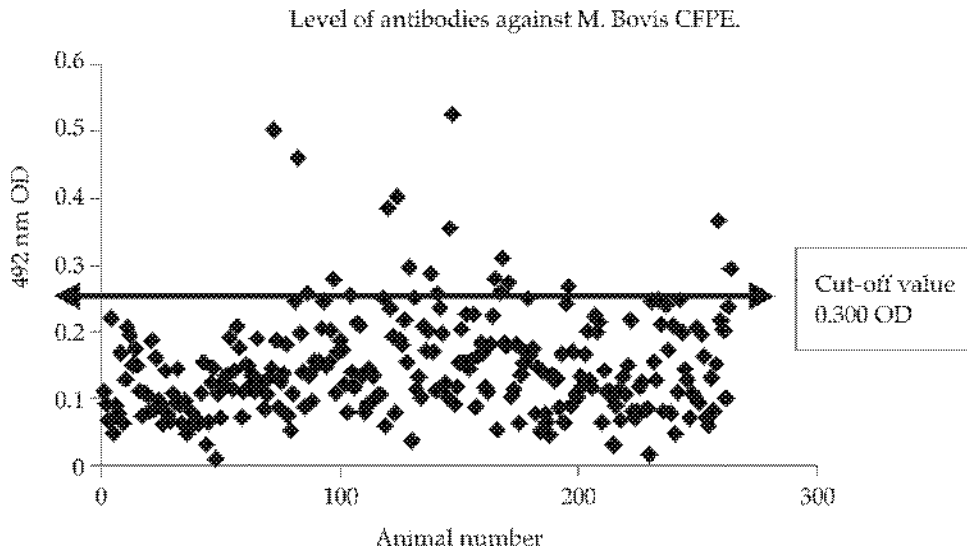
CFPE in animals initially identified via simple ELISA. The antigens employed in this study for the ELISA tests were *M. bovis* and *M. avium* CFPEs commonly used during TB diagnosis.<sup>32,33</sup> It is important to mention that the animals used in this study had been negative to the tuberculin test at the start of the experiment; however, the herd is located in a TB high incidence region and it is unknown whether there is sufficiently strict control of cattle movement to avoid infection from an external source.

Three animals (Group 1) were identified as negative by tuberculin intradermal and IFN- $\gamma$ , but had high levels of antibodies against *M. bovis* CFPE. Previously it has been seen that occasionally animals with high titers against bovine PPD can present lesions that are compatible with tuberculosis.<sup>34</sup>

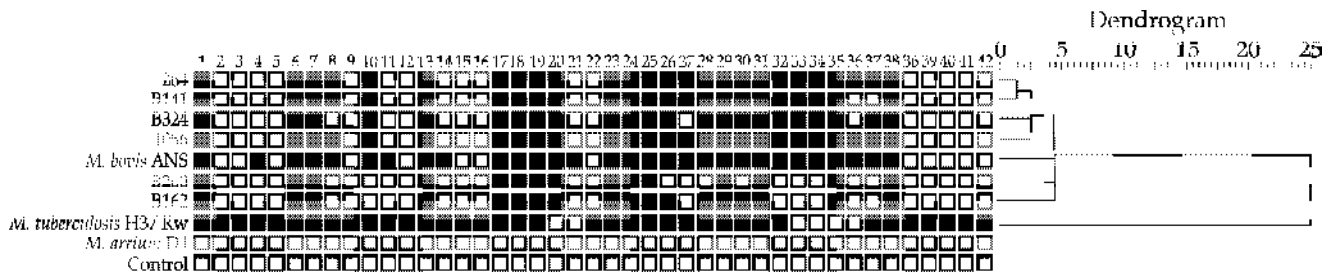
On comparison of Groups 1 and 2, an active cellular immune response (CIM) is seen in the latter, which is confirmed by IFN- $\gamma$ . Therefore, it is thought that animals

enfermedad en los bovinos.<sup>30</sup> Por ello es necesario el empleo de pruebas complementarias durante las actividades propias de una campaña, así como para realizar estudios epidemiológicos en países donde la TB es endémica.

En el presente trabajo se seleccionaron animales con altos títulos de anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis*, identificados por ELISA simple, en una explotación de bovinos lecheros considerada libre de TB bajo los criterios internacionales.<sup>31</sup> Posteriormente, mediante ELISA comparativa se determinó el nivel de anticuerpos contra proteínas de CFPE de *M. bovis* y *M. avium* en los animales inicialmente identificados por ELISA simple. Los antígenos empleados en este estudio para la prueba de ELISA fueron las preparaciones de CFPE de *M. bovis* y *M. avium*, que han sido comúnmente empleados en el diagnóstico de TB.<sup>32,33</sup> Es importante mencionar que todos los animales empleados en este trabajo eran negativos a tuberculina al inicio del experimento. Sin embargo, el establo se encuentra en una región de alta incidencia de TB, y no se



**Figura 1.** Respuesta de anticuerpos obtenida mediante ELISA simple con CFPE de *M. bovis*, del primer muestreo exploratorio de 277 animales. El valor de corte se obtuvo de un grupo de animales sanos, considerando el promedio de las densidades ópticas (DO)<sub>492</sub> más 2 DS. Antibody response obtained using a simple ELISA with *M. bovis* CFPE during the first sampling of 277 animals. The cut-off value was obtained from a group of healthy animals considering the average optical density (OD)<sub>492</sub> plus two standard deviations.



**Figura 2.** Patrón y dendrograma de spoligotyping obtenidos de exudado nasal proveniente de seis bovinos, seleccionados a partir de una ELISA comparativa, considerando el valor de corte (0.300 DO<sub>450</sub>). Los testigos positivos fueron *M. bovis* AN5, *M. tuberculosis* H37Rv; y los negativos *M. avium* DN4 y control de agua.

Dendrogram and pattern obtained through spoligotyping for nasal exudates from six cows, selected based upon a comparative ELISA test, considering a cut-off value of 0.300 OD<sub>450</sub>. The positive controls were AN5 *M. bovis* and H37 Rv *M. tuberculosis*; the negative controls were DN4 *M. avium* and water.

in both groups carry mycobacteria, but only those in Group 2 are in a stage prior to anergy, given that they still present an active CIM (positive IFN- $\gamma$ ). The evolution of *M. bovis* infection in animals depends on various factors: agent exposure time or contact-time with shedders, size of the particles that contain the viable mycobacterium and number of bacteria inhaled or infective dose.<sup>4</sup> In clinical practice, the loss of the delayed-type hypersensitivity response (DTH) to mycobacterial antigens indicated deficient T cell function, a situation which is called anergy (Group 1). It has been proposed that the CIM and DTH are independent responses; the CIM (protective immunity) is directed primarily by cytokines, while DTH is so by chemokines.<sup>35</sup> Based on this, we propose that in animals that were negative to the intradermal tuberculin test but positive to IFN- $\gamma$  both responses manifested independently.

The use of spoligotyping permitted us to identify six animals as potential *M. bovis* carriers, which were considered positive by ELISA and were included in Groups 1 and 2. Using molecular methods it has been demonstrated that 30% of tuberculous cows shed the disease through the respiratory tract.<sup>36</sup>

In order to eliminate the possibility of disseminated tuberculosis in those animals without a CIM response, identified by ELISA and spoligotyping (Group 1), all the cattle in this group were examined *post mortem*, but no visible or microscopic lesions suggestive of TB were found. In the past, naturally-infected cows have been denominated nonvisible-lesion reactors.<sup>37</sup> Nevertheless, the presence of bacteria in the upper respiratory tract, without concurrent positive intradermal reaction or lesions, has been described both in cattle with an active CIM and in those without.<sup>38</sup>

Animals from Group 3 did not have *M. bovis* DNA in their nasal swabs, but presented both a CIM as well as humoral activity against this bacterium. To date very little is known about bovine resistance to tuberculosis,<sup>39</sup> and there is the possibility that some animals that have been in contact with the mycobacterium could develop protective immunity and resist infection. This might be the case in animals from Group 3 who all come from a herd which is practically TB-free, where exposure to the bacillus is unlikely and where the infective dose is low.

On the other hand, two of the 11 cows initially identified by simple ELISA had antibodies that were preferentially directed against *M. avium* CFPE antigens. This suggests a problem of mycobacteriosis, caused by atypical mycobacteria,<sup>40</sup> accompanied by crossed reactivity. This reactivity is due to the fact that the bacteria in the *M. tuberculosis* complex share antigens with this type of mycobacterium, which is common in the environment.

sabe si existe un control de movimiento de ganado suficientemente estricto para evitar la posible infección del hato por una fuente externa.

Tres animales (grupo 1) fueron negativos a las pruebas de tuberculina e IFN- $\gamma$  pero presentaron altos títulos de anticuerpos hacia el CFPE de *M. bovis*. Al respecto, se ha observado que en ocasiones animales con títulos elevados contra PPD bovino pueden presentar lesiones compatibles a tuberculosis.<sup>34</sup>

Al comparar el grupo 1 con el 2 se observó una respuesta inmune celular (IMC) activa en este último, confirmada por el IFN- $\gamma$ . Por tanto, se considera que los animales de ambos grupos son portadores de la micobacteria, pero los animales del grupo 2 se encuentran en una etapa posiblemente previa al estado de anergia, ya que todavía presentan IMC activa (IFN- $\gamma$  positiva). La evolución de la infección por *M. bovis* en animales depende de varios factores: Tiempo de exposición al agente o el contacto con animales excretores, tamaño de partícula que contiene micobacterias viables y número de bacterias inhaladas o dosis infectiva.<sup>4</sup> En la práctica clínica, la pérdida de la respuesta de la hipersensibilidad tardía (HT) a antígenos micobacterianos es indicio de una función deficiente de células T, situación conocida como anergia (grupo 1). Se ha planteado que la IMC y la HT son dos respuestas independientes; la IMC (inmunidad protectora) está dirigida principalmente por citocinas, mientras que la HT por las quimiocinas.<sup>35</sup> Con base en lo anterior, se sugiere que en los animales que fueron negativos a la prueba intradérmica, pero positivos a IFN- $\gamma$ , las dos respuestas se manifiestan de manera independiente.

El empleo de *spoligotyping* permitió definir como posibles portadores de *M. bovis* a seis animales, considerados como positivos por ELISA, incluidos en los grupos 1 y 2. Mediante métodos moleculares se ha llegado a demostrar que 30% de vacas tuberculosas son fuente diseminadora de la enfermedad a través del tracto respiratorio.<sup>36</sup>

Con la intención de descartar el estado de tuberculosis diseminada en los animales sin respuesta IMC, identificados por ELISA y *spoligotyping* (grupo 1), todos los bovinos de este grupo fueron examinados *post mortem*, pero no se encontraron lesiones visibles o microscópicas sugestivas a TB. Existen antecedentes de bovinos infectados naturalmente que han sido denominados reactores pero sin lesiones visibles.<sup>37</sup> No obstante, la presencia de la bacteria en el tracto respiratorio superior, sin reacción a la prueba intradérmica y sin lesiones, ha sido descrita tanto en bovinos con una respuesta IMC activa como en aquellos carentes de ella.<sup>38</sup>

Los animales del grupo 3 no registraban ADN de *M. bovis* en exudado nasal, pero presentaban tanto IMC como una respuesta humoral activa en contra de esta bacteria. Hasta el momento se conoce muy poco acerca de

ELISA has been shown to be one of the most specific diagnostic tests for TB, even when using an antigen such as bovine PPD.<sup>41-44</sup> This study initially used *M. bovis* CFPE, which is more sensitive than the PPD, possibly because of a greater number of antigens. The specificity of the humoral immune response towards *M. bovis* was confirmed using its response against *M. avium* antigens. The CFPE used for the ELISA, prepared from *M. bovis* and *M. avium*, have been commonly used to measure the humoral immune response in TB.<sup>32</sup> The main advantage of ELISA is that it identifies infected animals that are non-reactive to the intradermal tuberculin test and to IFN- $\gamma$ . However, due to its low sensitivity ( $60\% \pm 10$ ) it does not identify all the infected animals, and, as such, is not recommended as a sole test for TB diagnosis.

The IFN- $\gamma$  test is a well-established method for TB diagnosis and has been used in parallel with the intradermal tuberculin test, where sensitivity rises to 95.2%.<sup>24</sup> The IFN- $\gamma$  test has been shown to identify naturally infected animals given that these have a negative intradermal tuberculin test result.<sup>38</sup> This diagnostic tool has greater sensitivity and specificity than the intradermal tuberculin test and shows greater correlation with the pathology; however, one of its inconveniences is that it does not detect anergic animals, a problem it shares with the intradermal tuberculin test.

Comparing different diagnostic methods for TB, especially molecular techniques against bacteriological tests, is difficult, in part because the number and viability of the mycobacteria required by each process is different. Initially, spoligotyping was developed to differentiate the mycobacteria complex isolates. However, this technique can be done *post mortem* (paraffin embedded tissues and cultures),<sup>17</sup> and *ante mortem* (nasal exudates, milk and blood).

Some authors have proposed the use of ELISA in high prevalence regions, in order to carry out an epidemiological sweep and simultaneously identify those animals with disseminated tuberculosis.<sup>45</sup> ELISA is able to differentiate antibodies against *M. bovis* and the *M. avium* complex (mycobacteriosis), and, as such, could also be used in low prevalence regions for the identification of *M. bovis* carriers.

The results obtained in the present study show that spoligotyping can be used as a complementary diagnostic test along with ELISA, in low prevalence regions and herds during the process of eradication, in order to identify those animals that are *M. bovis* carriers but who were negative to the intradermal tuberculin test. Furthermore, spoligotyping has been shown to be sensitive and specific, as well as allowing diagnosis confirmation in just a few days.

Comparing molecular methods with routine diagnostic tests, such as bacterial isolation, is difficult

la resistencia a la tuberculosis en bovinos,<sup>39</sup> y existe la posibilidad de que algunos animales que hayan estado en contacto con la micobacteria desarrollen una inmunidad protectora y resistan la infección. Tal podría ser el caso de estos animales (grupo 3), provenientes de un hato prácticamente libre de TB donde la exposición al bacilo es poco probable y la dosis de infección es baja.

Por otro lado, dos de los once bovinos identificados inicialmente por ELISA simple poseían anticuerpos dirigidos preferentemente contra antígenos del CFPE de *M. avium*. Lo anterior sugiere un problema de micobacteriosis, ocasionado por micobacterias atípicas,<sup>40</sup> acompañado de una reactividad cruzada. Esta reactividad se debe a que las bacterias del complejo *M. tuberculosis* comparten antígenos con este tipo de micobacteria, comúnmente presente en el ambiente.

El ELISA ha demostrado ser una de las pruebas más específicas para el diagnóstico de la TB, aun empleando un antígeno como el PPD bovino.<sup>41-44</sup> En este trabajo se empleó inicialmente para esta prueba el CFPE de *M. bovis*, el cual tiene una mayor sensibilidad que el PPD, posiblemente debido a la mayor cantidad de antígenos. La especificidad de la respuesta inmune humoral de los animales hacia *M. bovis* se confirmó comparando su respuesta hacia antígenos de *M. avium*. Los CFPE empleados para ELISA, preparados a partir de *M. bovis* y de *M. avium*, han sido comúnmente utilizados para medir la inmunidad humoral de la TB.<sup>32</sup> La principal ventaja del ELISA es que identifica animales infectados no reactivos a la tuberculina e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, debido a su baja sensibilidad ( $60\% \pm 10$ ) no identifica a todos los animales infectados, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TB.

La prueba de IFN- $\gamma$  es un método bien establecido para el diagnóstico de TB, y se ha visto que si se emplea conjuntamente con la prueba de tuberculina se incrementa la sensibilidad hasta 95.2%.<sup>24</sup> La prueba de IFN- $\gamma$  ha demostrado identificar animales infectados naturalmente ya que presentan una prueba intradérmica negativa.<sup>38</sup> Esta herramienta de diagnóstico presenta mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de tuberculina, y correlaciona mejor con la patología; sin embargo, uno de los inconvenientes es que no detecta a animales anérgicos, como tampoco la prueba de tuberculina.

La comparación de los diversos métodos de diagnóstico de la TB, en especial de las técnicas moleculares con los aislamientos bacteriológicos, resulta difícil; entre otros motivos porque el número y la viabilidad de las micobacterias requeridas en cada proceso es diferente. Inicialmente la prueba de spoligotyping se desarrolló como método de tipificación de cultivo de micobacterias. Sin embargo, se sabe que esta metodología es realizable en muestras obtenidas *post mortem* (tejido embebido en parafina y cultivo),<sup>17</sup> y *ante mortem* (exudado nasal, leche y sangre).

given that the number and viability of the mycobacteria required in these tests are different. Spoligotyping was able to show the presence of *M. bovis* DNA in nasal exudate samples, making bacterial isolation unnecessary. It is important to point out that the genetic analysis found during spoligotyping showed two different groups, thus suggesting two sources of infection in the herd.

The tools employed in this study aid in the location of animals that cannot be detected by traditional methods, especially in farms where the infection is apparently controlled. The utility of all three methods is demonstrated here, showing that they are all efficient at finding antibodies against *M. bovis*, detecting IFN- $\gamma$  and identifying *M. bovis* DNA in animals that have tested negative in the intradermal tuberculin test. These tools will help us reach true eradication in a shorter time period, given that it will be possible to avoid the appearance of reactors in TB-free herds (recurrence) employing programmed follow-up.

Future studies must corroborate the diagnostic association using spoligotyping and ELISA in TB-free herds, thus determining their utility in identifying animals that are carriers for *M. bovis*.

## Acknowledgments

The authors wish to thank MVZ Dosetti G. for valuable help in the collection of sera and in the application of field tests, as well as the "Productora Nacional de Biológicos Veterinarios" for donating the *M. bovis* and *M. avium* CFPE. As well as thanking Dr. D Van Soolingen for contributing the membranes. This study was financed in part by the "Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología" in Mexico, project numbers 29137-B and 28637-G.

## Referencias

1. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;4:1-14.
2. Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* 1994;40:137-157.
3. Szezyk R, Svenson SB, Hoffner SE, Bolske, G, Wahlsstrom, H, Englund L, *et al.* Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in human and animals in Sweden. *J Clin Microbiol* 1995;33:3183-3185.
4. Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, Reilly PF. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 1998;155:245-250.
5. Weddle NE, Livingstone PG. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet Microbiol* 1994;40:23-39.
6. Francis J, Seiler RS, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuber-

Algunos autores han propuesto la instrumentación del ELISA en zonas de prevalencia alta, para realizar un barrido epidemiológico y al mismo tiempo para identificar animales con tuberculosis diseminada,<sup>45</sup> ya que se pueden determinar de manera diferencial anticuerpos contra *M. bovis* y contra antígenos del complejo *M. avium* (micobacteriosis), motivo por el cual se podría usar también en zonas de baja prevalencia para identificar animales portadores de *M. bovis*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que spoligotyping es una herramienta molecular que puede ser empleada como diagnóstico complementario en zonas de baja prevalencia y hatos en erradicación, en combinación con ELISA, para identificar animales portadores de *M. bovis* negativos a la tuberculina. Además, el spoligotyping ha demostrado ser sensible y específico, y permite confirmar el diagnóstico en pocos días.

La comparación de métodos moleculares con técnicas de rutina como el aislamiento en el diagnóstico de la tuberculosis bovina es difícil, ya que el número y la viabilidad de las micobacterias requeridas en ambas técnicas son diferentes. El spoligotyping pudo demostrar la presencia de ADN de *M. bovis* en muestras de exudado nasal, sin la necesidad del aislamiento bacteriológico. Es importante destacar que el análisis genético de los patrones de spoligotyping demostró dos grupos diferentes, lo que sugiere dos distintas fuentes de infección en el hato.

Las herramientas empleadas en este trabajo ayudan en la localización de animales que no son detectados por el método tradicional, sobre todo en explotaciones en donde aparentemente la infección está controlada. Aquí se muestra la utilidad de estos tres métodos, los cuales son eficientes para demostrar la presencia de anticuerpos contra *M. bovis*, la presencia de IFN- $\gamma$  y la identificación del ADN de *M. bovis* en animales que no habían sido reactores a la prueba de tuberculina. Con las herramientas propuestas se logrará el saneamiento de los hatos en menor tiempo, ya que se podrá evitar la reaparición de reactores en hatos libres (reincidencia) mediante un seguimiento programado.

En estudios posteriores se deberá corroborar la asociación del diagnóstico por spoligotyping con ELISA en hatos libre de TB, para determinar su utilidad en la identificación de animales portadores de *M. bovis*.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al MVZ Dosetti G. su valiosa ayuda en la colección de sueros y aplicación de pruebas de campo; a la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, por la donación del CFPE de *M. bovis* y *M. avium*. También se agradece al Dr. D. van Soolingen su valiosa colaboración por la donación de las membranas. Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, proyecto núms. 29137-B y 28637-B.

- culin tests using bovine PPD and other tuberculin. *Vet Rec* 1978;103:420-425.
7. Ritacco V, Lopez B, De Cantor IN, Barrera L, Errico F, Nadera A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 1991;50:365-367.
  8. Toossi Z, Ellner JJ. Mechanisms of anergy in tuberculosis. In: Shinnick MT, editor. *Tuberculosis*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1996:221-234.
  9. Roth JA, Kaeberle ML. Effect of glucocorticoids on the bovine immune system. *J Am Vet Med Assoc* 1982;180:894-901.
  10. Larsson B, Alenius S, Fossum C. An analysis of immunosuppression in cattle with mucosal disease. In: Hartigan PJ, Monaghan ML, editors. 1986, 08, 26 al 29. Proceedings of the Fourteenth World Congress on Diseases of Cattle, Dublin (Ir): Dublin (Ir). World Association for Buiatrics. 1986;1:208-214.
  11. Lloyd S. Effect of pregnancy and lactation on infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1983;4:153-176.
  12. Diaz-Otero F, Masso F, Paez A, Varela E, Suarez-Güemes F, Montaña LF. Secretion of IFN- $\gamma$  by bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric-focusing. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;67:203-212.
  13. Chan J, Kaufmann SHÉ. Immune mechanism of protection. In: Bloom BR, editor. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington (DC): ASM Press, 1994:389-416.
  14. Wood PR, Corner LA, Plakett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$  interferon. *Res Vet Sci* 1990;49:46-49.
  15. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox J, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Austr Vet J* 1990;69:1-4.
  16. Caimi K, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bigi F, Cataldi A. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 2001;39:1067-1072.
  17. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, *et al*. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-914.
  18. Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2000;38:669-676.
  19. Ritacco V, Lopez B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Cantor IN. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med* 1990;37:19-27.
  20. OPS-OMS. Preparación y estandarización del derivado proteínico purificado (PPD) de la tuberculina. Nota técnica N° 17. Buenos Aires, Argentina: Centro Panamericano de Zoonosis, OPS-OMS, 1972.
  21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
  22. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. London (UK): Dynatech Laboratories, Inc. 1979.
  23. Vordermeier HM, Cockle PC, Whelan AO, Rhodes S, Palmer N, Bakker D, Hewinson RG. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:675-682.
  24. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Austr Vet J* 1990;67:134-137.
  25. Van Soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1995.
  26. Van Soolingen D, De Haas PEW, Haagsma ET, Hermans PWM, Ritacco V, *et al*. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2425-2433.
  27. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994;40:53-63.
  28. Prophet BE, Millis B, Arrington BJ, Sobin HL. Métodos histotecnológicos. Washington (DC): Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP), 1995.
  29. Hass E. 50 Diagnosis special stains for surgical pathology. Philadelphia: J.B Lippincott Co., 1981.
  30. Pollock JM, Girvin RM, Lightbody KA, Clements RA, Nelly SD, Buddle BM, Andersen P. Assessment of defined antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. *Vet Rec* 2000;146:659-665.
  31. Barlow ND, Kean JM, Hickling G, Livingstone PG, Robson AB. A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. *Prev Vet Med* 1997;2:57-75.
  32. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins CB, *et al*. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Austr Vet J* 1990;68:286-290.
  33. Ng KH, Aldwell FE, Wedlock DN, Watson JD, Buddle BM. Antigen-induced interferon- $\gamma$  and interleukin-2 responses of cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;57:59-68.
  34. Estrada CC, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet Méx* 2001;32:207-211.
  35. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascade in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999;20:307-311.
  36. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J Clin Microbiol* 1998;36:1050-1055.
  37. Rhodes SG, Palmer N, Graham SP, Bianco AE, Hewinson RG, Vordermeier HM. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect Immunol* 2000;68:5393-5400.
  38. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, *et al*. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 1994;135:134-135.
  39. Barthel R, Piedrahita JA, McMurray DN, Payeur J, Baca D, Suarez-Güemes F, *et al*. Pathologic findings and association of *Mycobacterium bovis* infection with the bovine

- NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. *Am J Vet Res* 2000;61: 1140-1418.
40. Auer LA, Schleeauf SM. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1988;1:51-61.
  41. Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1992;31:243-249.
  42. Silva E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 2001;78:111-117.
  43. Ritacco V. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med* 1990;37:19-27.
  44. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, *et al.* A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1992;31:71-79.
  45. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Witte K, Melville L, *et al.* An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Austr Vet J* 1989;66:15-19.