



## IDENTIFICACIÓN DE ANTIGENOS INMUNODOMINANTES PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.

Susana Flores-Villalva<sup>a</sup>, E. Rodríguez<sup>a</sup>, Y. Rubio<sup>b</sup>, F. Milián<sup>b</sup>, G. Canto<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>CENID Fisiología, INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Qro., flores.susana@inifap.gob.mx, rodriguez.elba@inifap.gob.mx.

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., yez.rubio@hotmail.com, feliciano.milian@uaq.mx, gcanto07@uaq.mx

### RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas y que tiene como agente etiológico a *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Esta es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial, al ocasionar graves pérdidas económicas y representar una barrera para la comercialización del ganado; además de constituir una amenaza para la salud humana. El control de la tuberculosis por *M. bovis* en el humano se basa en el control de la enfermedad en los animales, es por eso que se realiza una intensiva campaña para su erradicación. Sin embargo, el PPD actualmente utilizado contiene una mezcla de proteínas pobremente definida, muchas de las cuales se encuentran presentes en micobacterias ambientales, por lo que en algunos casos no permite una diferenciación entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados por micobacterias ambientales, es por esto que es necesario la identificación de antígenos inmunodominantes que permitan un diagnóstico diferencial de la tuberculosis bovina. Las herramientas proteómicas y genómicas han permitido identificar a los antígenos ESAT-6 y CFP-10, se encuentran presentes en todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* y están ausentes en todas las subcepas de *M. bovis* BCG, en el complejo *M. avium* y en la mayoría de las cepas ambientales. A través del análisis comparativo del transcriptoma se definió otro grupo de antígenos idóneos para el diagnóstico diferencial, dentro del cual se encuentra la proteína Rv3615c, este último antígeno identifica animales infectados que no responden al cóctel proteico ESAT-6 - CFP10, por lo que esta proteína complementa el cóctel proteico e incrementa la sensibilidad del mismo, sin afectar la especificidad. En este trabajo de revisión bibliográfica analizaremos los métodos y herramientas biotecnológicas que han permitido la identificación de antígenos inmunodominantes y describiremos a los principales candidatos para reemplazar el uso del PPD.

### 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas y que tiene como agente etiológico a *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Esta es una de las enfermedades más importantes de la industria pecuaria además de constituir una amenaza para la salud humana. Para el control de la enfermedad se realiza una intensiva campaña para su erradicación y evitar a la población humana el riesgo de contraer la enfermedad, mejorar la productividad de los bovinos y evitar pérdidas económicas por el decomiso de canales o partes de los mismos por la presencia de lesiones; así como para evitar restricciones a la movilización de los animales, tanto nacional como internacionalmente. La infección en el ganado es usualmente crónica y los animales infectados pueden eliminar al bacilo mucho antes de exhibir



algún signo clínico, por lo que es importante detectar al ganado infectado en etapas tempranas de la infección (1).

No obstante; la tuberculosis bovina sigue manifestándose como un problema en el ganado debido a diversos factores, entre ellos las limitaciones en la especificidad y sensibilidad del derivado proteico purificado (PPD, *por sus siglas en inglés*) y la incapacidad de detectar todos los animales infectados con *M. bovis* lo que contribuye significativamente a la persistencia de la enfermedad (2). Así mismo, en algunos países la presencia de reservorios de vida silvestre contribuye significativamente a la re-infección del ganado; por lo que la vacunación contra la infección por *M. bovis* representa una opción para reducir la incidencia de la tuberculosis bovina (3). Las estrategias de vacunación en el ganado contra la tuberculosis bovina se basan en el uso de la cepa *M. bovis* BCG; sin embargo, el uso de esta cepa vacunal limita el diagnóstico de la enfermedad ya que una gran proporción de animales vacunados desarrollan reactividad hacia el PPD bovino usado en las pruebas diagnósticas, por lo que es necesario la identificación de antígenos que permitan una clara diferenciación entre animales enfermos, sanos o vacunados.

## 2. DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de la tuberculosis alrededor del mundo. La tuberculinización es la prueba ante-mortem autorizada por la Organización Mundial en Sanidad Animal; sin embargo, debido a la variabilidad en la sensibilidad y especificidad de la prueba de la tuberculina se ha propuesto la utilización de pruebas alternativas o complementarias, una de ellas es la prueba de IFN- $\gamma$  que fue desarrollada en Australia (4) y es comercializada bajo el nombre de Bovigam® (Prionics, Switzerland). Esta prueba está autorizada para su uso en la Unión Europea, Estados Unidos y Australia (2, 5). La prueba de IFN- $\gamma$  presenta una sensibilidad y especificidad superior a la prueba de la tuberculina (87.7% y 99.2%, respectivamente) (6); además, el uso de ambas pruebas en paralelo mejora sustancialmente la sensibilidad (95.2%) (7). Tiene la ventaja que el criterio para definir a un animal como positivo puede ser ajustado para mejorar la sensibilidad o especificidad de la prueba. Pero sobre todo, detecta a una importante proporción de animales que escapan a la detección con la prueba intradérmica porque permite la identificación temprana de animales infectados desde los 14 días (8). Esta prueba ha sido evaluada en muchos países, apoyando la idea que puede ser considerada como una prueba diagnóstica complementaria a la prueba de la tuberculina. Sin embargo, debido a su alto costo, comparado con la prueba de la tuberculina, la necesidad de personal y equipo especializado, y a las limitaciones logísticas es difícil su aplicabilidad. Además, una de las principales desventajas del PPD actualmente utilizado es que muchos de los antígenos son encontrados en especies micobacterianas ambientales, lo que ocasiona problemas con la especificidad de las pruebas (9) por lo que no siempre es posible discriminar entre el ganado con tuberculosis y ganado expuesto a micobacterias ambientales, lo que representa un serio problema en lugares donde es común la co-infección con *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ya que en algunos animales, la respuesta hacia el PPD aviar puede ser igual o mayor que hacia el PPD bovino (10).

## 3. IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES

Los antígenos de secreción presentes en los filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* y *M. bovis* han sido el objetivo de varios estudios ya que estas proteínas son consideradas altamente antigénicas debido a que están fácilmente disponibles para el procesamiento por las células presentadoras de antígenos y su presentación a las células T (11,12). Las principales contribuciones al estudio de las proteínas de secreción se logró con una variante de *M. tuberculosis* H37Rv que no sufre el proceso normal de autólisis por lo que los filtrados de cultivo de esta cepa están enriquecidos en proteínas de secreción y tienen solamente pequeñas cantidades de proteínas intracelulares, haciéndola ideal para el estudio y caracterización de este importante grupo de proteínas (13). De esta forma, fue



posible identificar a las proteínas del complejo antígeno 85 (Ag85A, Ag85B, Ag85C y MPT51 o Ag85D), MPT63, MPT64, MPT32, MTC28, MPT53 DnaK, PstS1, LpqI,  $\alpha$ -cristalina, ESAT-6, CFP10 y otras proteínas miembros de la familia ESAT-6 como los principales componentes del filtrado de cultivo (11,14). A continuación, se sintetizaron las proteínas recombinantes de las fracciones con proteínas de bajo peso molecular (6-10 kDa) y del complejo antígeno 85 (Ag85), estas fueron evaluadas en células de pacientes con tuberculosis, donde se observó que las proteínas Ag85 y ESAT-6 fueron los principales estimuladores de las células T en ensayos de proliferación y producción de IFN- $\gamma$  (15).

Posteriormente, con el objetivo de identificar diferencias genéticas entre *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG se realizaron análisis de hibridación genómica substractiva, lo cual permitió identificar tres regiones de diferencia RD1, RD2 y RD3, que están eliminadas en *M. bovis* BCG (16). La región RD1 tiene una longitud de 9.5 kilobases y abarca 9 genes Rv3871- Rv3879c, se encuentra presente en todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* y está ausente en todas las subcepas del BCG, en el complejo *M. avium* y en la mayoría de las cepas ambientales, por lo que es considerada la región más importante descrita por Mahairas *et al.* (16) para el desarrollo de nuevas vacunas y reactivos para el diagnóstico de la tuberculosis (Andersen *et al.* 2000) (17). La falta de esta región es uno de los motivos de la atenuación de *M. bovis* BCG, ya que forma parte de un sistema de secreción especializado llamado ESX-1 o sistema de secreción VII (18), cuya función es la de permitir la secreción de las proteínas de bajo peso molecular llamadas ESAT-6 ó esxA (por su nombre en inglés, early secreted antigenic target of 6 kDa) y CFP-10 (por su nombre en inglés, culture filtrate protein of 10-kDa), también conocida como esxB ó MTS-10. De la misma forma este sistema es necesario para la secreción de las proteínas EspA (Rv3616c), EspB (Rv3881) y EspR (Rv3849) (19).

Diversos estudios indican que la utilización de estas proteínas recombinantes o péptidos sintéticos de las mismas en la prueba de IFN- $\gamma$ , mejoran la especificidad de la prueba, y permiten la diferenciación entre animales infectados con *M. bovis* o sensibilizados a la exposición por otras micobacterias como *M. avium* subsp. *paratuberculosis* o animales vacunados con *M. bovis* BCG (20). El mayor beneficio se observa en áreas de baja prevalencia, donde el uso de los PPDs en la prueba de IFN- $\gamma$  ha demostrado tener una pobre especificidad (21).

El primer reporte del uso de ESAT-6 intradérmicamente en bovinos menciona que con 400  $\mu$ g de proteína es posible diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* o sensibilizados por la exposición a micobacterias ambientales (22). Posteriormente, se reportó que con el uso de un lipopéptido sintético era posible inducir reacciones intradérmicas con 100  $\mu$ g de esta proteína (23). Sin embargo, actualmente se sabe que el uso de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 en forma de un cóctel proteico son capaces de inducir respuestas intradérmicas en animales naturalmente infectados con *M. bovis* con 10  $\mu$ g de proteína (24).

A través del análisis comparativo del transcriptoma, se analizó si la variación en la expresión génica entre *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* pudiera definir otro grupo de antígenos idóneos para el diagnóstico diferencial, enumerando genes que se expresaran en *M. tuberculosis* pero no, o solo marginalmente, en *M. bovis* BCG. Ejemplos de estos antígenos incluyen a MPB70 y MPB83, ambos son expresados constitutivamente en altos niveles en *M. tuberculosis*, pero son expresados a muy bajos niveles en cepas *M. bovis* BCG que han perdido la región RD2 como la cepa BCG Pasteur y Danesa (25).

Este análisis mostró 133 genes que fueron altamente expresados en *M. tuberculosis* y en *M. bovis*, se examinaron aquellos genes que tuvieran una alta homología (>98%) entre *M. tuberculosis* y los ortólogos en *M. bovis* y que tuvieran una identidad menor al 30% con genes de *M. avium*. De este grupo de genes se eliminaron aquellos que hubieran sido previamente estudiados y así finalmente se evaluaron 14 genes en las pruebas inmunológicas. De estos candidatos, 7 fallaron en inducir una producción de IFN- $\gamma$  en animales infectados, 4 estimularon respuestas en animales sanos sugiriendo una reactividad cruzada con micobacterias ambientales. De los restantes 3 candidatos,



solo la proteína Rv3615c fue reconocida por una mayor proporción de animales infectados y no indujo respuestas en animales sanos o vacunados con *M. bovis* BCG. Además, la proteína Rv3615c identifica animales infectados que no responden al cóctel proteico ESAT-6 - CFP10, por lo que esta proteína complementa el cóctel proteico e incrementa la sensibilidad del mismo, sin afectar la especificidad (26). La adición de Rv3615c al cóctel proteico formado por las proteínas ESAT-6, CFP10 y MPB83 mejora la respuesta intradérmica en animales infectados y no induce respuestas en animales vacunados con *M. bovis* BCG (27). El gen Rv3615c está localizado en un operon que contiene 5 genes (Rv3616c-Rv3612c) Los componentes de este operon forman parte del sistema de secreción tipo VII en las micobacterias, la secreción de Rv3615c es dependiente de la presencia intacta de la región ESX-1 codificada en la región RD1 por lo que la falla en la respuesta en animales vacunados con *M. bovis* BCG no se debe a una diversidad en la secuencia como ocurre con las proteínas ESAT-6 y CFP10, sino por una pérdida de función asociada a la eliminación de la región RD1 (28).

El análisis in silico del secretoma de *M. tuberculosis* permitió identificar proteínas que potencialmente son activamente secretadas por la micobacteria y que inducen respuestas inmunes en el bovino. La evaluación de los péptidos de 119 proteínas permitió la identificación de un grupo de proteínas que no son reconocidas por animales vacunados con BCG. La inclusión del antígeno Rv3020c al cóctel proteico formado por las proteínas ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c mejora la sensibilidad del mismo sin afectar la especificidad en animales vacunados con *M. bovis* BCG (Jones et al. 2012) (29).

#### 4. CONCLUSIONES

La búsqueda de antígenos que permitan un diagnóstico diferencial de la infección por *M. bovis* continúa. El uso de herramientas biotecnológicas como las aquí descritas ha permitido la identificación de las proteínas ESAT-6, CFP-10, Rv3615c y Rv3020c, las cuales son los principales candidatos para reemplazar el uso del PPD en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P. 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol.* 41:1856–60.
2. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Vet Microbiol.* 112:171–179
3. Waters WR, Palmer M V, Buddle BM, Vordermeier HM. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research : Historical perspectives and recent advances. *Vaccine.* 30:2611– 2622.
4. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J.* 67:134–137.
5. De la Rúa-Domenech R, Goodchild a T, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81:190–210.
6. Schiller I, Vordermeier MH, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, McNair J, et al. 2010. Bovine tuberculosis: Effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Vet Immunol Immunopathol.* 136:1–11.
7. Monaghan M, Quinn PJ, Kelly AP, McGill K, McMurray C, O’Crowley K, Bassett HF, Costello E, Quigley F, Rothel JS, et al. 1997. A pilot trial to evaluate the  $\gamma$ -interferon assay



- for the detection of *Mycobacterium bovis* infected cattle under Irish conditions. *Ir Vet J.* 50:229–232
8. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock M, Clements A, Walton E, Bryson DG. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec.* 135:134–135.
  9. Yang H, Kruh-Garcia NA, Dobos KM. 2012. Purified Protein Derivatives of Tuberculin - Past, Present, and Future. *fe.* 66:273–280.
  10. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutiérrez-Pabello JA, McNair J, Andersen P, Suárez-Güemes F, Pollock J, Espitia C, Cataldi A. 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med.* 96:161–9.
  11. Målen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. 2007. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics.* 7:1702–18.
  12. Zheng J, Ren X, Wei C, Yang J, Hu Y, Liu L, Xu X, Wang J, Jin Q. 2013. Analysis of the secretome and identification of novel constituents from culture filtrate of bacillus Calmette-Guerin using high-resolution mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 12:2081–95.
  13. Fukui Y, Hirai T, Uchida T, Yoneda M. 1965. Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha and beta antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H37Rv) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biken J.* 8:189–199.
  14. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 59:372–382.
  15. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, Andersen P. 1998. Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 48:535–43.
  16. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 178:1274–82.
  17. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *356:1099–1104.*
  18. Simeone R, Bottal D, Brosch R. 2009. ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol.* 12:4–10.
  19. Garces A, Atmakuri K, Chase MR, Woodworth JS, Krastins B, Rothchild AC, Ramsdell TL, Lopez MF, Behar SM, Sarracino DA, Fortune SM. 2010. EspA acts as a critical mediator of ESX1-dependent virulence in *Mycobacterium tuberculosis* by affecting bacterial cell wall integrity. *PLoS Pathog.* 6:e1000957.
  20. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, McNair J, Cataldi A, Espitia C, Andersen P, Pollock JM. 2006. Optimizing Antigen Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *J Clin Microbiol.* 44:4326–4335.
  21. Palmer M V, Waters WR. 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Vet Microbiol.* 112:181–190.
  22. Pollock JM, McNair J, Bassett H, Cassidy JP, Costello E, Aggerbeck H, Rosenkrands I, Andersen P. 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol.* 41:1856–60.
  23. Whelan AO, Hope JC, Howard CJ, Clifford D, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2003. Modulation of the bovine delayed-type hypersensitivity responses to defined mycobacterial antigens by a synthetic bacterial lipopeptide. *Infect Immun.* 71:6420–5.
  24. Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan a O, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello J a. 2012. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein



- cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Clin Vaccine Immunol. 19:797–803.
25. Sidders B, Withers M, Kendall SL, Bacon J, Waddell SJ, Hinds J, Golby P, Movahedzadeh F, Cox RA, Frita R, et al. 2007. Quantification of global transcription patterns in prokaryotes using spotted microarrays. Genome Biol. 8:R265.
  26. Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Immun. 76:3932–9.
  27. Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, Vordermeier MH. 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. J Clin Microbiol. 48:3176–81.
  28. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion P a D, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Appelmelk BJ, Bitter W. 2007. Type VII secretion-- mycobacteria show the way. Nat Rev Microbiol. 5:883–91.
  29. Jones GJ, Whelan A, Clifford D, Coad M, Vordermeier HM. 2012. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c- derived peptides. Clin Vaccine Immunol. 19:620–2.