raZyEie

Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes

Publicación Científica de la Asociación Argentina de Zoonosis

Buenos Aires • Volumen X • Nº 3 • Diciembre 2015

ISSN 1851-3638
(En línea) ISSN 2346-8858

Asociación Argentina de Zoonosis

Artículo original

ISSN 1851-3638
RAZyEIE 2015; 10(3): 15-19

Estudio proteómico para mejorar el reactivo PPD-B utilizado en el diagnóstico de tuberculosis bovina: Producción de nuevas mezclas enriquecidas con los componentes más antigénicos de la PPD-B

María Laura Mon[1], Roberto Damián Moyano[1], Mariana Viale[1], María Alejandra Colombatti[1], Ignacio José Gamietea[2], Bernardo Alonso[3], María de la Paz Santangelo[1], María Isabel Romano[1]

Resumen
La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) producida por la aplicación intradérmica del derivado proteico purificado de una cepa de *M. bovis* (PPD-B) y la prueba que mide liberación de interferón-gamma (IFN-ϒ) son usadas para el diagnóstico de tuberculosis bovina (TBB). La especificidad de estas pruebas puede verse comprometida si se utiliza PPD-B, debido a reaccionantes positivos por sensibilización con otras micobacterias. En el presente estudio evaluamos dichas pruebas con dos mezclas conteniendo proteínas recombinantes de *M. bovis*: Mezcla 1 (M1): con ESAT-6, CFP-10 y MPB83; y mezcla 2 (M2): con ESAT-6, CFP-10, MPB83, HspX, TB10:3 y MPB70. Las mezclas M1, M2 y PPD-B aplicadas intradérmicamente en cobayos sensibilizados con *M. bovis* mostraron respuestas similares. Sin embargo, M1 indujo una reacción significativamente menor que la PPD-B en cobayos sensibilizados con *M. avium*. En bovinos, utilizando M1 en la prueba de IFN-γ se obtuvo mayor especificidad que con PPD-B o M2, dado que M1 fue mínimamente detectada por animales con paratuberculosis (PTB) o experimentalmente vacunados con BCG. Para optimizar estas mezclas, se obtuvieron diferentes fracciones de las PPD-B identificándose 7 proteínas en aquellas fracciones más inmunogénicas: MPB70, MPB83, CFP10, CFP2, FixB, PepA y HspX. Al utilizar M1 con FixB en la prueba de IFN-γ aumentó el reconocimiento de animales en un rodeo con TBB, sin reaccionar animales de un rodeo con PTB. Nuestros resultados demuestran que esta nueva mezcla antigénica es detectada específicamente por animales con TBB, mientras que el reactivo PPD-B fue detectado por animales infectados con otras micobacterias.

Palabras claves: Tuberculosis bovina, proteínas recombinantes de *M. bovis*, reacción de hipersensibilidad retardada (DTH), prueba de liberación de gamma interferón (IFN-γ), PPD-B.

Proteomic study to improve PPD-B reagent used in the diagnosis of bovine tuberculosis: Production of new mixtures enriched with PPD-B antigenic components

Abstract
The delayed type hypersensitivity skin test (DTH) and the interferon-gamma (IFN-γ) assay are used for the diagnosis of bovine tuberculosis (TBB). However, the specificity of these tests is compromised because both are based on the response against purified protein derivative of *Mycobacterium bovis* (PPD-B). In the current study, we assessed the potential of two cocktails with *M. bovis* recombinant proteins: Cocktail 1 (C1) contained ESAT-6, CFP-10 and MPB83, and cocktail 2 (C2) with ESAT-6, CFP-10, MPB83, HspX, TB10:3 and MPB70. C1, C2 and PPD-B showed similar response by DTH in *M. bovis*-sensitized guinea pigs. Importantly, C1 induced a significantly lower response than PPD-B in *M. avium*-sensitized guinea pigs. In cattle, C1 had better performance diagnostic than PPD-B and even than C2 by IFN-γ assay; indeed, C1 detected animals with TBB, with the least detection of animals either vaccinated with BCG or with paratuberculosis. For an optimization of the cocktails, we obtained different protein fractions of PPD-B and tested them in experimentally *M. bovis*-infected cattle. In a fraction highly reactive seven proteins were identified: MPB70, MPB83, CFP10, CFP2, FixB, PepA and HspX. The inclusion of FixB in C1 enhanced the recognition of naturally *M. bovis*-infected cattle by IFN-γ assay without compromising specificity. Our data provide a promising basis for the future development of a cocktail for detection of TBB without interference by the presence of animals sensitized or infected with other mycobacteria.

Key words: bovine tuberculosis, delayed hypersensitivity reaction (DTH), release of gamma interferon test (IFN-γ), PPD-B.

1. Instituto de Biotecnología, INTA, Los Reseros y N. Repetto (1686), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina, Tel: 4621-1447, Fax: 4621-0199.
2. INTA Estación Experimental Agropecuaria Delta, Buenos Aires, Argentina.
3. SENASA, Dirección de Laboratorio y Control Técnico (DILAB), Martínez, Argentina.
romano.mariaisabel@inta.gob.ar

Recibido: 15-02-2015
Aprobado: 20-07-2015

Introducción

La tuberculosis continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. El agente más común de la tuberculosis humana es *M. tuberculosis*, pero una proporción de casos son debido a *Mycobacterium bovis*, el agente causante de la tuberculosis bovina (TBB). *M. tuberculosis* y *M. bovis* pertenecen al complejo TB, formando un grupo taxonómico dentro del género micobacteria altamente relacionado a nivel genético, difícil de diferenciar si no se aplican técnicas moleculares. La TBB es considerada una de las zoonosis más importantes en Argentina, a la cual están principalmente expuestos los trabajadores rurales y de frigorífico, así como, los que consumen leche cruda sin pasteurizar. En Argentina, durante 2004–2005, fueron recogidas 448 muestras de esputos de pacientes con diagnóstico de TB, donde el 2% de estas TB pulmonares fueron debido a *M. bovis*. En este trabajo se identificó una cepa de *M. bovis* multiresistente a las drogas antituberculosas, que se transmitió por contagio persona-persona[1]. Los resultados de tuberculosis debido a *M. bovis* en humanos son sesgados debido a que muchos de los casos son extrapulmonares, por ello, la real prevalencia debería establecerse estudiando molecularmente los aislamientos de pacientes con formas pulmonares y extrapulmonares. Es esencial controlar y erradicar la TBB, en primer lugar por su implicancia en Salud Pública, pero también por las pérdidas que ocasiona en la producción ganadera, sumado a que limita el desarrollo de la industria lechera y de la carne en el comercio internacional. Los programas de erradicación de TBB en Argentina están basados en la detección de los animales infectados utilizando la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) producida por la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-B). En algunos países para el control de esta enfermedad también se utiliza un ensayo que mide la liberación de IFN-γ, por linfocitos estimulados con PPD-B. Este reactivo es una mezcla de proteínas, lípidos y carbohidratos obtenidos de un cultivo de *M. bovis*. Si se utiliza PPD-B para ambas técnicas se obtienen falsos positivos con animales infectados con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), el agente etiológico de la paratuberculosis, o con animales sensibilizados con otras micobacterias. El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes mezclas con proteínas antigénicas conocidas de *M. bovis* y proteínas obtenidas de fracciones altamente inmunoreactivas de la PPD-B, para mejorar la especificidad en el diagnóstico de TBB.

Materiales y Métodos

Los lotes de PPD-B comerciales que se utilizan en el diagnóstico de TBB son evaluados por SENASA utilizando DTH en cobayos sensibilizados con *M. bovis*. Por lo tanto, en la primera parte de este trabajo utilizamos este modelo animal para evaluar nuevos reactivos para el diagnóstico de TBB. En este modelo animal se probaron 2 mezclas con proteínas recombinantes de *M. bovis*. Mezcla 1 (M1): ESAT-6, CFP-10 y MPB83; y mezcla 2 (M2): ESAT-6, CFP-10, MPB83, MPB70, TB10:3 y HspX. La potencia de estas mezclas fue evaluada por DTH en cobayos sensibilizados con *M. bovis* (n=6) y *M. avium* (n=4). El objetivo de esta parte experimental fue contrastar la potencia de las mezclas con la potencia de la PPD-B de producción nacional, en los cobayos sensibilizados con ambas micobacterias. Por esta razón en esta parte experimental solo se utilizó PPD-B y no utilizamos el derivado proteico purificado obtenido de la cepa D4ER de *M. avium* (PPD-A). Se incluyó un grupo de cobayos no sensibilizados como controles. En bovinos, las mezclas se evaluaron midiendo liberación de IFN-γ, con un ELISA comercial (*Bovigam*™; *Prionics*) en animales experimentalmente infectados con *M. bovis* (n=6) y vacunados con BCG (n=5). El número de animales utilizados en esta parte del trabajo respondió a la capacidad de los boxes de seguridad biológica que utilizamos para esta experiencia. También se incluyó un grupo de bovinos naturalmente infectados con Map (n=17) para evaluar la especificidad de las mezclas. Los resultados fueron expresados en ODI=OD obtenida con las mezclas de proteínas/OD obtenido con PBS. Una ODI$\geq$2 fue considerada positiva. En la segunda parte de este estudio, se realizó un fraccionamiento de las proteínas de la PPD-B en SDS-PAGE 12% y las fracciones recolectadas por electroelución fueron evaluadas con la sangre de animales experimentalmente infectados con *M. bovis*. En las fracciones más antigénicas se identificaron las proteínas por espectrometría de masa (LTQ, Thermo Fisher Scientific). Las nuevas mezclas se evaluaron en un rodeo con TBB (n=58) y a su vez la especificidad en un rodeo con PTB (n=10) utilizando el ensayo de liberación de interferón gamma.

Resultados

En los cobayos sensibilizados con *M. bovis* no hubo diferencias significativas cuando se inoculó intradérmicamente M1, M2 o PPD-B (Fig. 1A); mientras que en los cobayos sensibilizados con *M. avium*, la reacción fue significativamente menor con M1 que con PPD-B ($P<0,05$) (Fig. 1 inferior). Los cobayos no sensibilizados resultaron negativos a la inoculación de las mezclas. Estos resultados mostraron que M1 es

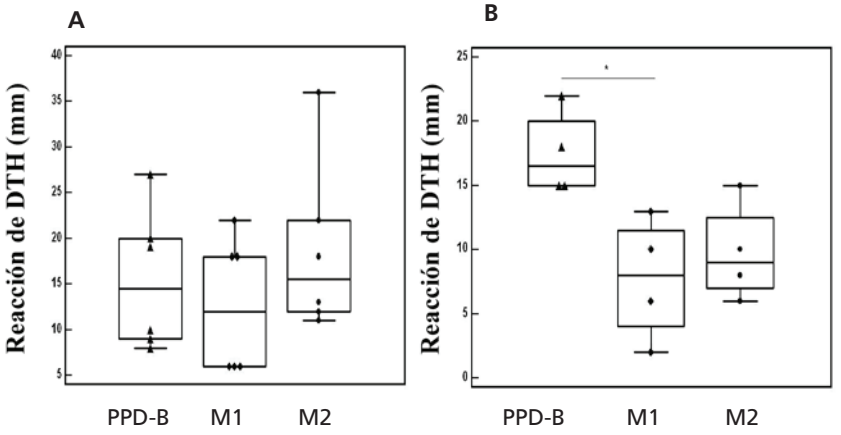
un reactivo potencialmente específico para el diagnóstico de TBB. En los bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* (Fig. 2 A), o vacunados con BCG (Fig. 2 B) no se observaron diferencias significativas entre los valores de IFN-γ inducidos por M1, M2 y PPD-B (Fig. 2 A y B). Sin embargo, en animales con PTB (Fig. 3), M1 es más efectiva que PPD-B y M2 al no detectar animales con PTB (Fig. 3).

Cuando se evaluaron las proteínas contenidas en las fracciones inmunogénicas de la PPD-B se identificaron 7 proteínas: MPB70, MPB83, CFP10, CFP2, FixB, PepA y HspX. Al utilizar M1 con FixB en la prueba de IFN-γ, aumentó el reconocimiento de animales en un rodeo con TBB (Fig. 4 A), sin detectar animales en un rodeo con PTB (Fig. 4 B).

Discusión

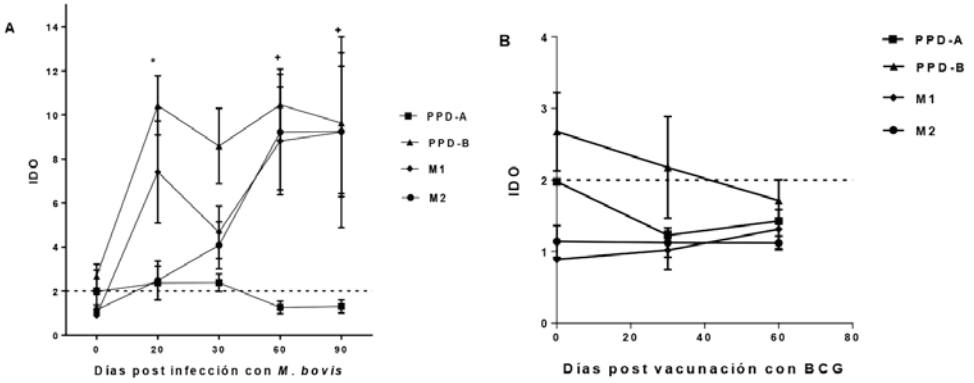
Para formular el contenido de proteínas de M1 y M2 tuvimos en cuenta los siguientes datos previos: 1- los miembros de la familia Esx, tal como ESAT-6, CFP-10 y TB10:3 (Rv3019c) han sido identificados como potentes antígenos capaces de activar las células T[2,3], 2- en un ensayo con varios antígenos de *M. bovis* midiendo liberación de IFN-γ en bovinos naturalmente infectados, se encontró que ESAT-6 y CFP-10, fueron superiores a los otros antígenos evaluados, para el diagnóstico de TBB[4], 3- los antígenos de *M. bovis*, MPB70 y MPB83, inducen fuerte liberación de IFN-γ en experiencias con sangre de animales con TBB, mientras que vacunados con BCG o sensibilizados con *M. avium* no responden[5], 4- el

Figura 1. Respuesta de intradermoreacción (DTH) en cobayos sensibilizados.



DTH inducida por PPD-B, M1 y M2 en cobayos sensibilizados con *M. bovis* (A) y en cobayos sensibilizados con *M. avium* (B). Las diferencias entre las respuestas fueron determinadas usando el test de Mann Whitney (*, P < 0.05).

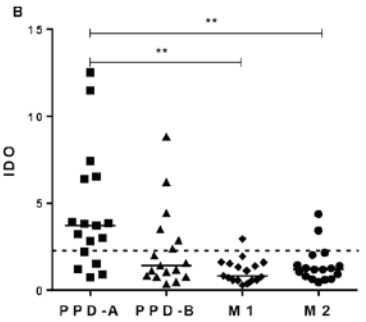
Figura 2. Evaluación de las mezclas en bovinos infectados o vacunados mediante el ensayo de liberación de interferón gamma.



Respuesta de IFN-γ inducida por PPDB, M1 y M2 en bovinos experimentalmente infectados con *M. bovis* (n=6) (A) y vacunados con BCG (n=5) (B). Los resultados se expresan como media de las ODIs con desviación estándar.

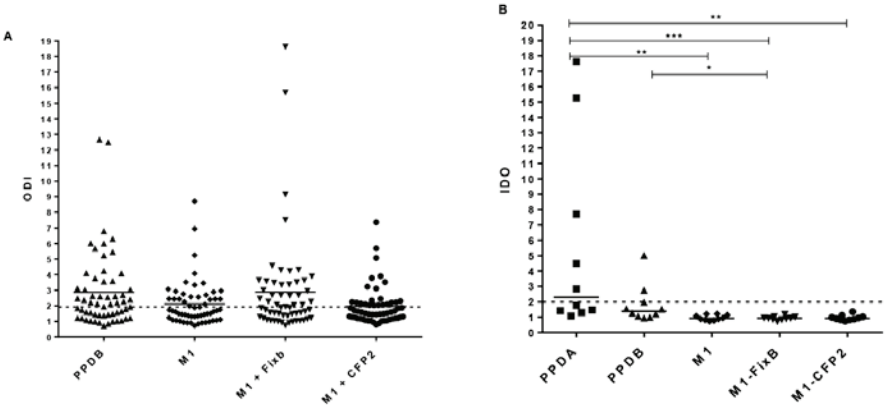
fraccionamiento de proteínas del filtrado de cultivo y el extracto celular de *M. bovis*, permitió identificar varias proteínas, de las cuales EsxI y HspX, fueron las que detectaron la mayor cantidad de animales con TBB, al ser utilizadas en la prueba de IFN-γ[6], 5- CFP-10 y ESAT-6 están presentes en el complejo TB y no en el complejo *M. avium*, y la proteína MPB83, se expresa mayoritariamente en *M. bovis* por lo cual sus ortólogos en otras micobacterias patógenas no representa una limitación para su utilización en una mezcla específica para el diagnóstico de TBB[7]. De acuerdo con estos estudios realizados previamente, se prepararon 2 mezclas, que contenían, M1: ESAT-6, CFP-10 y MPB83; y M2: ESAT-6, CFP-10, MPB83, HspX, TB10.3 y MPB70. Los antígenos contenidos en M1, los cuales ya habían sido previamente evaluados en bovinos con TBB[8], en el presente estudio fueron evaluados primero en cobayos sensibilizados con *M. avium*, donde dieron una respuesta significativamente menor que la reacción obtenida por la inoculación de PPD-B, pero aun considerable. Esta reacción de M1 podría deberse a genes de la familia esat-6 y cfp-10 presentes en *M. avium*[9]. La utilización de estos antígenos podría influir negativamente en el diagnóstico específico de TBB, sin embargo M1 induce la liberación de IFN-γ en animales experimentalmente infectados con *M. bovis*, sin inducir una reacción positiva en animales vacunados con BCG y solo detectó un animal en un rodeo con PTB. Con respecto a M2, la otra mezcla utilizada en este estudio, la inclusión de MPB70, Hspx y TB10:3 no incrementó la respuesta de IFN-γ en animales con TBB,

Figura 3. Evaluación de las mezclas en bovinos naturalmente infectados con MAP mediante el ensayo de liberación de Interferón gamma.



Respuesta de IFN-γ inducida por PPD-A, PPD-B, M1 y M2 en bovinos naturalmente infectados con Map (n=17). Se expresan los resultados de cada animal. La barra horizontal representa el valor medio de las ODIs. La línea horizontal punteada representa el valor de corte usado para considerar los animales positivos.

Figura 4. Evaluación de la nueva mezcla por el ensayo de liberación de interferón gamma.



Respuesta de IFN-γ inducida con PPD-A, PPD-B, M1, M1 más FixB y M1 más CFP2 en bovinos de un rodeo con TBB (n=58) (A) y con PTB (n=10) (B). Se expresan los resultados de cada animal. La barra horizontal representa el valor medio de las ODIs y la barra horizontal punteada representa el punto de corte usado para considerar los animales positivos.

comparada con M1 a pesar de la inmunogenicidad *in vitro* previamente demostrada de estas proteínas adicionadas. Como algunos de estos antígenos, tales como MPB70 y MPB83, comparten identidad en la secuencia de proteínas > 70%, es probable que su combinación resulte redundante. En la formulación de M1 con los antígenos dominantes de células T, ESAT-6 y CFP-10, se incluyó MPB83, por que se ha postulado que este antígeno, puede jugar un rol en promover la iniciación de la reacción celular, de esta forma ayudando a dar una mejor respuesta a los antígenos dominantes[10]. La inclusión de un nuevo antígeno de la PPD-B, evaluado por primera vez en este trabajo, FixB, aumentó la sensibilidad-especificidad del diagnóstico de TBB con respecto a las mezclas previamente evaluadas.

Conclusiones

La importancia de este estudio radica en que se evaluó una mezcla de antígenos conocidos de *M. bovis*, ESAT-6, CFP-10, MPB83 y un antígeno identificado en este trabajo, FixB, los cuales constituyeron una mezcla reactiva de gran utilidad para el diagnóstico específico de TBB, diferenciando animales con TBB de PTB. De acuerdo con el resultado obtenido por espectrometría de masas de las proteínas contenidas en las fracciones más inmunoreactivas de la PPD-B, las 4 proteínas de esta nueva mezcla están contenidas en la PPD-B, pero a diferencia de lo que ocurre con este último reactivo, la nueva mezcla evita las reacciones falsas positivas por la presencia de animales sensibilizados o infectados con otras micobacterias. Por otra parte, la utilización de este nuevo reactivo en el diagnóstico de TBB, también permitiría utilizar vacunas contra PTB, sin que dichas vacunas interfieran en el diagnóstico de TBB, una de las principales causas por las mismas no son utilizadas en los países que aún no han erradicado la TBB.

Bibliografía

1. Etchechoury et al. "Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case", *Zoonoses Public Health* 2010, 57(6): 375-81.
2. Cockle et al. "Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle", *Clinical and Vaccine Immunology* 2006, 13(10): 1119-24.
3. Jones et al. "Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* reveals the immunodominance of the ESAT-6 protein family". *Infection and Immunity* 2010, 78(3): 1326–32.
4. Aagaard et al. "Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity", *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44(12): 4326–35.
5. Vordermeier et al. "Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999, 6(5): 675–82.
6. Meikle et al. "Identification of Novel *Mycobacterium bovis* Antigens by Dissection of Crude Protein Fractions", *Clinical and Vaccine Immunology 2009*, 16(9): 1352–9.
7. Wiker. "MPB70 and MPB83 – Major Antigens of *Mycobacterium bovis*", *Scandinavian Journal of Immunology* 2009, 69(6): 492–9.
8. Vordermeier et al. "Development of Diagnostic Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* Infection in Cattle", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1999, 6(5): 675-82.
9. Gey Van Pittius et al. "The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram. positive bacteria", *Genome Biology* 2001, 2(10):RESEARCH0044.
10. Whelan et al. "Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals", *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(9): 3176–81.

El intuitivo

Dicen que en el riñón de Andalucía hubo una escuela de médicos. El maestro preguntaba:

- *Que hay con este enfermo, Pepipllo?*
- *Para mí –respondía el discípulo– que se trae una cefalalgia entre pecho y espalda que lo tiene frito.*
- *Y por qué lo dices salado?*
- *Señor maestro: porque me sale del alma.*

De Alfonso Reyes, *El deslinde* (1944),
en *Cuentos breves y extraordinarios*, de Jorge Luis Borges y Adolfo Bioy Casares.