

Evaluación de diferentes inmunógenos contra la tuberculosis bovina mediante la presencia de lesiones a la necropsia

Evaluation of different immunogens against bovine tuberculosis based on presence of lesions at necropsy

Dante González Salazar* Fernando Díaz Otero* Laura Jaramillo Meza*
Rafael Pérez González** Jesús Padilla Urbina** Marco Antonio Santillán Flores*
Camila Arriaga Díaz* Luis Bojórquez Narváez***

Abstract

The objective of this work was to compare the degree of protection given by three immunogens against bovine tuberculosis in heifers, based on the presence of lesions at necropsy, after challenge with a pathogenic *M. bovis* strain. Twenty-four tuberculosis free heifers were divided into four groups: group 1 was vaccinated with *M. bovis* culture filtrate protein extract (CFPE); group 2 with CFPE plus interferon-gamma (IFN- γ); group 3 with Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and group 4 remained as control. At six months post-vaccination all animals were challenged with a field strain of *M. bovis* and after six months they were slaughtered and the presence of lesions was evaluated. At necropsy, the lymph nodes looked like abscesses and histopathology showed pyogranulomatous lymphadenitis. All the animals of the control group had tuberculosis lesions and this was the group with the highest number of lesions, 66.6% of them being severe. Several animals of the three immunized groups did not show any lesions, and only moderate lesions were observed in the others. None of the vaccination protocols gave 100% protection, since lesions were observed in all the groups. Nevertheless, it is evident that different degrees of protection were obtained in the vaccinated groups, as shown by the absence or decrease in severity of lesions; this reduction being greater in the group vaccinated with BCG. It was concluded that BCG was the immunogen that gave better results; therefore, it could be used for tuberculosis control in high prevalence areas.

Key words: BOVINE TUBERCULOSIS, DAIRY CATTLE, VACCINES, IMMUNOGENS, BCG, INTERFERON- γ , NECROPSY, LESIONS, PYOGRANULOMA.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar en becerras el grado de protección de tres inmunógenos contra la tuberculosis bovina, mediante las lesiones en la necropsia, ante un desafío con cepa patógena de *M. bovis*. Se utilizaron 24 becerras negativas a tuberculosis, divididas en cuatro grupos; el grupo 1 se vacunó con extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*; el grupo 2, con CFPE más interferón gamma (IFN- γ); el grupo 3, con BCG; el grupo 4 quedó como testigo. A los seis meses posvacunación, los animales se desafiaron con cepa de *M. bovis*. Posteriormente, a los seis meses se sacrificaron, para evaluar la presencia de lesiones. En la necropsia, los linfonodos parecían abscesos; en la histopatología, las lesiones se definieron como una linfadenitis pio-granulomatosa. Todos los animales del grupo testigo presentaron lesiones de tuberculosis, fue el grupo con mayor número de lesiones; 66.6% de éstas fueron severas. En los tres grupos inmunizados hubo animales que no presentaron lesiones; en los que si hubo, las lesiones fueron leves y moderadas. Ninguno de los esquemas de vacunación previno al 100% la infección, pues en todos los grupos hubo lesiones. Sin embargo, es evidente que en los grupos inmunizados hubo diferentes grados de protección, manifestados en ausencia de lesiones y disminución en el grado de severidad, en el grupo inmunizado con BCG esta disminución fue mayor. Se concluye que la vacuna BCG fue el inmunógeno que presentó mejores resultados, por ello podría utilizarse para el control de la tuberculosis en zonas de alta prevalencia.

Palabras clave: TUBERCULOSIS-BOVINA, GANADO-LECHERO, VACUNAS, INMUNÓGENOS, BCG, INTERFERON- γ , NECROPSIA, LESIONES, PIOGRANULOMAS.

Recibido el 2 de diciembre de 2005 y aceptado el 23 de junio de 2006.

*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 15.5, Carretera Federal México-Toluca, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

**Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5, Carretera Cuatitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuatitlán-Izcalli, Estado de México, México.

***Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, Ignacio Zaragoza 75, Col. Lomas Altas, 11950, México, D. F.

Correspondencia: Fernando Díaz Otero, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Departamento de Biotecnología Aplicada, Carretera México-Toluca, km 15.5, Col Palo Alto, 05110, México, D. F., Tel. 5570-3100, ext 34, Fax 5570-4673, correo electrónico: diof0009@servidor.unam.mx

Nota: Proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, D 43244-Z y G-34799B.

Introduction

For a long time, *Mycobacterium bovis* has been recognized as being specifically responsible for bovine tuberculosis (BT) etiology. Nevertheless, this disease constitutes a serious problem for the bovine industry; therefore, it continues to promote research in several countries.¹⁻⁴ In Mexico, tuberculosis has been under scrutiny during the last few years, not only because of an increase in number of cases, but also because it affects commercial policies with other countries, including food safety programs and this has renewed interest in the development and validation of new control alternatives and better diagnostic methods.⁵⁻⁸

Vaccination against BT in cattle may be an important control strategy where classical test and slaughter programs are very costly.^{4,9} Advances in the study of processes involved in the immune protective response against *M. bovis* infection as well as in molecular biology techniques, together with the elucidation of the complete sequence of *M. bovis* genome can provide better opportunities to develop and improve new vaccines against BT.^{4,10}

Currently different types of vaccines are being developed and assessed in cattle, based on attenuated live microorganisms, dead microorganisms, purified proteins or glycoproteins subunit vaccines, or DNA vaccines.¹⁵⁻¹⁹

Within the group of vaccines with greater possibilities of success are those preparations of culture filtrate protein extracts (CFPE), that contain *M. bovis* or *M. tuberculosis* proteins, since they stimulate well T cells of experimentally infected mice and cattle.^{12,17,20,21} It has been observed that live mycobacteria are more efficient in the generation of specific acquired resistance, when compared with dead mycobacteria preparations. This observation has been used as an argument to insist that secreted antigens present in CFPE, produced by active mycobacterial metabolism are essential to induce protective immunity.²² Studies done in mice and hamsters immunized with *M. tuberculosis* and *M. bovis* CFPE, have demonstrated that high levels of protection may be induced against airborne challenges with *M. tuberculosis* and *M. bovis*.^{5,14,20} The objective of using specific proteins that stimulate protective immune response against tuberculosis, is that they do not induce reaction to tuberculin tests and vaccine effectiveness is not influenced by prior sensitization by environmental mycobacteria.^{5,23}

Another vaccine that is still being studied in cattle is the *M. bovis* strain of Calmette-Guerin bacillus (BCG). This vaccine is used since 1921 to prevent human tuberculosis, and it is obtained by a series of

Introducción

La responsabilidad específica del *Mycobacterium bovis* en la etiología de la tuberculosis bovina (TB) ha sido reconocida desde hace mucho tiempo. Sin embargo, esta enfermedad constituye un problema grave en la industria bovina, ello propicia que se siga estimulando la investigación en varios países.¹⁻⁴ En México, la tuberculosis ha sido foco de atención en los últimos años, no sólo por el hecho del incremento en el número de casos, también por las políticas de comercio que se establecen con otros países, incluidos los programas de inocuidad alimentaria, lo cual ha provocado un renovado interés para el desarrollo y validación de nuevas alternativas de control y mejores métodos de diagnóstico.⁵⁻⁸

La vacunación contra TB en el ganado puede ser importante estrategia de control en países donde los programas clásicos de prueba y sacrificios son incosteables.^{4,9} Los avances en el estudio de los procesos involucrados en la respuesta inmune protectora hacia la infección por *M. bovis* y en las técnicas de biología molecular, junto con la determinación de la secuencia completa del genoma de *M. bovis*, pueden proveer mejores oportunidades para desarrollar y mejorar nuevas vacunas para la TB.^{4,10}

Actualmente se están evaluando en el ganado diferentes tipos de vacunas que están en desarrollo, basadas en microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos, vacunas subunitarias compuestas por proteínas o glicoproteínas purificadas y vacunas de ADN.¹⁵⁻¹⁹

Dentro de las vacunas con mayores posibilidades están los preparados de extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE), que contienen proteínas de *M. bovis* o *M. tuberculosis*, pues son buenos estimulantes de células T en ratones y ganado experimentalmente infectados con tuberculosis.^{12,17,20,21} Se ha observado que las micobacterias vivas son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas; esta observación se ha utilizado como argumento para sostener que los antígenos secretados presentes en los CFPE, producidos por el metabolismo activo micobacteriano, son esenciales para la inducción de una inmunidad protectora.²² Estudios realizados en ratones y cobayos inmunizados con CFPE de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, han demostrado que pueden inducir altos niveles de protección contra desafíos aerógenos con *M. tuberculosis* y *M. bovis*.^{5,14,20} El objetivo de usar proteínas específicas que estimulen respuesta inmune protectora para la tuberculosis, es que no inducen reacción a la prueba de tuberculina y la efectividad de la vacuna puede no estar influida por previa sensibilización de micobacterias ambientales.^{5,23}

passes with an attenuated virulent strain of *M. bovis* and prepared with live lyophilized bacteria.²⁴

From the beginning of development of this vaccine in 1906, it has been used experimentally in cattle. Nevertheless, protection has been short lived and many times BCG does not protect against natural infections, even though it protects against experimental infections.^{10,25-27} Vaccination frequently is effective in high prevalence zones, but recently born calves may have been exposed to *M. bovis*, before vaccination, by intake of milk from cows with tuberculous mastitis.^{10,27,28}

In experiments in cattle with BCG, virulent mycobacteria have been retrieved during necropsy from lymph nodes (LN) that are closest to the point of entry, where lesions form a tubercle, but without the tendency of producing extensive lesions at other parts of the body.^{10,13,29,30}

The apparent lack of protection of cattle by BCG may be attributed to numerous factors. Generally in cattle, high doses of BCG equivalent to 10^6 - 10^8 colony forming units (CFU) are used, for subcutaneous vaccination; now it is known that these doses may be less effective in stimulating immune protection than low doses.^{28,30}

Several reasons for the limited efficacy of BCG have been proposed, one of them is previous exposure to environmental mycobacteria which results in a transient immuneresponse to BCG with low protective immunity against BT.^{23,31} Comparing the genome, more than 100 coding sequences have been found to be absent in BCG but present in *M. tuberculosis*, the main agent in human tuberculosis.^{19,32}

Recent studies with BCG have directly evaluated its efficacy: in this sense, it has been used as positive control to evaluate other vaccines against tuberculosis.^{30,31,33} A series of experiments done in the last ten years indicate that one or two doses of 10^4 - 10^6 colony forming units of BCG, administered subcutaneously in recently born calves, induce significant levels of protection against virulent *M. bovis* challenges. Vaccination of animals with BCG at birth gives 100% efficacy of protection against the development of macroscopic lesions, when they are vaccinated at six weeks efficacy is 90%.^{5,34}

Additionally to vaccination, immunomodulators have been used in order to increase the intensity of the immune response, mainly of the cellular type.³⁵ Interferons (IFN) are among the most important immunomodulators taken into consideration; they constitute a family of proteins produced by nucleated cells in a precocious response, prior even to the antigenic response to viral infections and other stimuli (bacteria, endotoxins, mitogens).^{20,36,37}

Also, studies performed in animal models and

Otra vacuna que se sigue estudiando en el ganado es la cepa *M. bovis* del bacilo Calmette-Guerin, BCG. Esta vacuna se utiliza desde 1921 para prevenir la tuberculosis humana, se obtiene de una serie de pases de una cepa virulenta atenuada de *M. bovis*, preparada con bacterias vivas liofilizadas.²⁴

Desde el desarrollo de esta vacuna, en 1906, se le ha experimentado en el ganado. Sin embargo, la protección ha sido de corta duración y muchas veces se ha observado que la BCG no protege contra la infección natural, pero sí contra infecciones experimentales.^{10,25-27} Se ha visto que la vacunación funciona a menudo en zonas de alta prevalencia, pero los becerros recién nacidos pudieron haber sido expuestos a *M. bovis*, antes de la vacunación, a través del consumo de leche de vacas con mastitis tuberculosa.^{10,27,28}

En experimentos en bovinos con la BCG se han recuperado, en la necropsia, micobacterias virulentas a partir de los linfonodos (LN) más cercanos al punto de entrada, donde las lesiones forman un tubérculo, pero no se ha observado tendencia a producir lesiones extensivas en otras partes del cuerpo.^{10,13,29,30}

La falla aparente de la BCG para proteger al ganado puede atribuirse a numerosos factores. Generalmente se han usado altas dosis de BCG equivalentes a 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) para la vacunación subcutánea en el ganado; ahora se sabe que estas dosis pueden ser menos efectivas que las dosis bajas para estimular una protección inmune.^{28,30}

Se han propuesto algunas razones de la limitada eficacia de la BCG, una de ellas es la previa exposición a micobacterias ambientales provocando una respuesta transitoria hacia la BCG, con baja inmunidad protectora contra la TB.^{23,31} Comparando el genoma se han encontrado más de 100 secuencias de codones ausentes en la BCG, pero que están presentes en *M. tuberculosis*, el agente principal de la tuberculosis en humanos.^{19,32}

Recientes estudios con la BCG han evaluado directamente su eficacia; en este sentido, se le ha utilizado como testigo positivo al evaluar otras vacunas contra la tuberculosis.^{30,31,33} Una serie de experimentos en los pasados diez años indica que una o dos dosis de BCG con 10^4 - 10^6 UFC, administradas subcutáneamente en becerros recién nacidas, inducen niveles significativos de protección contra desafíos con *M. bovis* virulentos. La vacunación de animales con BCG en el nacimiento tiene eficacia de 100% de protección contra el desarrollo de lesiones macroscópicas, cuando éstos son vacunados a las seis semanas tiene una eficacia de 90%.^{5,34}

Adicionalmente a la vacunación se están utilizando inmunomoduladores con la finalidad de aumentar la intensidad de la respuesta, principalmente de tipo celular.³⁵ Dentro de los inmunomoduladores conside-

humans show that exogenous administration of IFN-gamma (IFN- γ), during immunization, increases cellular immune response, committed to intracellular bacteria elimination, since it favors antigenic presentation as well as major activation and proliferation of specific T CD4⁺ and cytotoxic T CD8⁺ cells, among other functions.^{36,37}

The objective of this study was the evaluation of the degree of protection of three immunogens against BT: *M. bovis* BCG vaccine, *M. bovis* CFPE and *M. bovis* CFPE plus recombinant bovine IFN- γ , administered to calves experimentally challenged with a pathogenic *M. bovis* strain, by identification of lesions during necropsy.

Materials and methods

Experimental animals

Twenty-four, 8-16 month-old Holstein calves from herds under control of the disease by the National Campaign for the Eradication of Bovine Tuberculosis (CANETB) and negative to tuberculin, IFN- γ and ELISA tests were used.

Immunogens

M. bovis BCG vaccine

The *M. bovis* BCG that was used was the Danish strain, Mérieux culture, derived from strain 1077, with attenuated live bacilli containing between 8×10^5 and 3.2×10^6 CFU, lyophilized to be reconstituted with 1.0 mL of sterile distilled water.*

M. bovis culture filtrate protein extract (CFPE)

The strain of mycobacteria that was used for this study was *M. bovis* AN5. Cultures were incubated at 37°C in modified synthetic Dorser-Henley liquid medium, during six weeks.³⁸ Proteins present in culture filtrates were precipitated with ammonium sulfate crystals [(NH₄)₂ SO₄] at 80% final saturation, with constant agitation at 4°C for 24 h.³⁹ At the end of this time, the solution was centrifuged during 60 min at 4°C, at 15 000 g, the precipitate was re-suspended in 10 mL of phosphate buffer solution (PBS) pH 7.2, after that it was dialyzed with PBS, in dialysis bags, with cutting point at 12 to 14 kDa, at 4°C during 36 h. Protein concentration of CFPE was determined by Bradford method, it was adjusted to 35.0 µg/mL of protein and it was divided in 1 mL aliquots that were stored at -70°C until their use.⁴⁰

rados más importantes se encuentran los interferones (IFN), que constituyen una familia de proteínas producidas por las células nucleadas en respuesta precoz, anterior incluso a la respuesta antigénica, a las infecciones víricas u otros estímulos (bacterias, endotoxinas, mitógenos).^{20,36,37}

Asimismo, estudios realizados en modelos animales y en el humano muestran que la administración exógena de IFN-gamma (IFN- γ), durante la inmunización, incrementa la respuesta inmune celular, comprometida en la eliminación de bacterias intracelulares, debido a que se favorece tanto la presentación antigénica como mayor activación y proliferación de las células T CD4⁺ específicas y T CD8⁺ citotóxicas, entre otras funciones.^{36,37}

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en becerras el grado de protección de tres inmunógenos contra la TB, la vacuna BCG de *M. bovis*, CFPE de *M. bovis* y CFPE de *M. bovis* más IFN- γ bovino recombinante, ante un desafío experimental con una cepa patógena de *M. bovis*, mediante las lesiones identificadas en la necropsia.

Material y métodos

Animales experimentales

Se utilizaron 24 becerras Holstein de 8-16 meses de edad, provenientes de hatos bajo control de la enfermedad, por la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina (CANETB) y negativas a las pruebas de la tuberculina, IFN- γ y ELISA.

Inmunógenos

Vacuna BCG de *M. bovis*

La vacuna BCG utilizada fue la cepa danesa de *M. bovis* de la siembra Mérieux derivada de la cepa 1077, con bacilos vivos atenuados que contienen entre 8×10^5 a 3.2×10^6 UFC, liofilizada para reconstituirse con 1.0 mL de agua destilada estéril.*

Extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*

La cepa de micobacteria que se empleó en este estudio fue *M. bovis* AN5. Los cultivos se incubaron a 37°C en medio líquido sintético de Dorser-Henley modificado, durante seis semanas.³⁸ Las proteínas presentes en los filtrados de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio [(NH₄)₂ SO₄] a una saturación final de 80%, con agitación constante a 4°C por 24 h.³⁹

*Laboratorio Aventis Pasteur, S.A., Dinamarca.

Immunomodulator

Bovine recombinant Interferón- γ

Bovine IFN- γ is a commercial product* and is obtained from the supernatant of an *E. coli* culture with bovine recombinant IFN- γ expression. Approximate concentration at which it was used was 300 ng/mL per animal.

Challenge strain

An *M. bovis* field isolated strain was used, adjusting it for the challenge to 1×10^4 CFU/mL.

Experimental design

Animals were distributed into four groups of six animals each. Group 1 was inoculated subcutaneously in the neck with *M. bovis* CFPE in 300 mg doses, in 1.0 mL volume of sterile PBS. Group 2 was inoculated subcutaneously with 300 ng of bovine recombinant IFN- γ and two days later received *M. bovis* CFPE in 300 mg doses. Group 3 was vaccinated subcutaneously with 1.0 mL *M. bovis* BCG. Animals of group 4 remained as controls, receiving 1.0 mL of sterile PBS, pH 7.2. Thirty days later, animals of vaccinated groups were revaccinated with the same vaccination scheme.

Challenge

All animals were challenged with an *M. bovis* field strain, six months after the last immunogen application. Each animal was inoculated with 1×10^4 CFU/1.0 mL, in the upper part of the cranial third of the trachea, using a hypodermic needle caliber 18. Before and after infection all animals were evaluated by an intradermic tuberculin test.

Animal slaughter and post-mortem inspection

Six months after the challenge, animals were euthanized by groups, under humane conditions.⁴¹ During necropsy, a detailed inspection was carried out to determine the presence, extension and severity of tuberculous lesions.^{42,43} Lungs were observed externally, then each lobe was cross-sectioned in 0.5 to 1.0 cm thick slices, reviewing all cut surfaces. Serosa and mucosa of the trachea, were observed. Head was dissected to inspect it, looking at larynx, pharynx, palatine tonsil, and nasal mucosa. After that lymph nodes (LN) of the head (retropharyngeal, parotidian, mandibular), neck (deep cervical), thoracic cavity (tracheobronchial and mediastinal), abdomen (mesenteric)

Al término de ese tiempo, la solución se centrifugó durante 60 min a 4°C, a 15 000 *g*, el precipitado fue resuspendido en 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, posteriormente se dializó con PBS, en bolsas de diálisis,* con punto de corte de 12 a 14 kDa, a 4°C durante 36 h. La concentración de proteína de los CFPE se determinó mediante el método de Bradford, se ajustó a 35.0 μ g/mL de proteína y se dividió en alícuotas de 1 mL, que se almacenaron a -70°C hasta su empleo.⁴⁰

Inmunomodulador

Interferón- γ bovino recombinante

El IFN- γ bovino constituye un producto comercial** y se obtiene del sobrenadante de cultivo de *E. coli* con expresión de IFN- γ bovino recombinante. Se usó en una concentración aproximada de 300 ng/mL por animal.

Cepa de desafío

Se empleó una cepa de *M. bovis* aislada de campo, para el desafío se ajustó a 1×10^4 UFC/mL.

Diseño experimental

Los animales se distribuyeron en cuatro grupos de seis animales. El grupo 1 fue inoculado subcutáneamente en el cuello con dosis de 300 mg del CFPE de *M. bovis*, en un volumen de 1.0 mL de PBS estéril. El grupo 2 se inoculó vía subcutánea con 300 ng de IFN- γ bovino recombinante, y dos días después se les aplicó dosis de 300 mg del CFPE de *M. bovis*. El grupo 3 fue vacunado vía subcutánea con 1.0 mL BCG de *M. bovis*. Los animales del grupo 4 permanecieron como testigos, aplicándoles 1.0 mL de PBS estéril, pH 7.2. A los 30 días, los animales de los grupos vacunados fueron revacunados bajo el mismo esquema.

Desafío

Todos los animales fueron desafiados con la cepa de campo de *M. bovis* a los seis meses después de la última aplicación de los inmunógenos. Cada animal fue inoculado con 1×10^4 UFC/1.0 mL, en el primer tercio craneal de la tráquea, utilizando una aguja hipodérmica de calibre 18. Antes y después de la infección, todos los animales fueron nuevamente evaluados mediante la prueba intradérmica de la tuberculina.

*Spectra/N°. 3787-D40, Estados Unidos de América.

**Serotec produc data sheet, Reino Unido.

and carcass (superficial cervical, inguinal, popliteal and sub-iliac) were inspected. LN that did not show evident lesions were sectioned in thin cross-sections of 2.0 to 3.0 mm thickness to review all cut surfaces.

Lesions were quantified and classified taking into account the presence and number of lesions when LN were cut in half. Degree of severity was determined by the size of each lesion: those with diameter below 0.5 cm were considered as slight (+); >0.5 cm up to 1.0 cm, were considered as moderate (++); and >1.0 cm were considered as severe (+++).⁴²⁻⁴⁴

Samples were taken from tissues that had tuberculosis suggestive lesions; each sample was divided for histopathology studies and bacteriology isolation.

Bacteriological analysis

Samples for bacteriological isolation were preserved cold and later were spread in duplicate in Stonebrink culture medium, with sodium pyruvate and then incubated at 37°C during four weeks; bacterial growth in cultures were typified for their growth rate, pigmentation, ZN stain, as well as biochemical tests (niacin, nitrate reduction, hydrolysis of Tween-80, catalase test at 22°C and 68°C, pyrazinamide) and development in isoniazide (INH) and hydrazide (TCH).

Histopathology samples

Samples were taken for histopathology from tissues that had tuberculosis suggestive lesions. Samples were fixed in 10% formalin buffered with phosphates, processed by routine paraffin inclusion technique and stained with hematoxylin-eosin (H-E) and Ziehl-Neelsen (ZN).⁴⁵

Results

Intradermal test results carried out before challenge gave two reactor animals of the group immunized with BCG; while there was only one reactor in the CFPE group. According to the criteria of the Mexican Official Standard NOM-031-ZOO-1995, an animal of the group immunized with CFPE + IFN- γ , was suspect. There was also one suspect animal in the control group. At the end of the experiment animals of the different groups showed reactivity to the test.

No animal showed skin alterations in immunogen application sites. One animal of the control group, at the beginning of the experiment died due to a pneumonic affection. No mortality occurred due to the challenge.

Sacrificio de los animales e inspección post mortem

A los seis meses del desafío, a los animales se les aplicó la eutanasia por grupos, bajo condiciones humanitarias.⁴¹ Se realizó la necropsia haciendo una inspección minuciosa para determinar presencia, extensión y severidad de las lesiones tuberculosas.^{42,43} Se revisaron los pulmones externamente, luego cada lóbulo fue seccionado en forma transversal efectuando cortes de 0.5 a 1.0 cm de grosor, revisando todas las superficies de corte. En tráquea se revisó serosa y mucosa. La cabeza se desarticuló y fue inspeccionada, revisando laringe, faringe, tonsila palatina y mucosa nasal. Posteriormente se extrajeron y revisaron los LN de la cabeza (retrofaríngeos, parotídeos, mandibulares), del cuello (cervicales profundos) de cavidad torácica (traqueobronquiales y mediastínicos), del abdomen (mesentéricos) y de la canal (cervicales superficiales, inguinales, poplíteos y los subilíacos). Los LN que no presentaron lesiones evidentes fueron seccionados en forma seriada cada 2.0 a 3.0 mm de grosor revisando las superficies de corte.

Para cuantificar y clasificar las lesiones se consideró presencia y número de lesiones al cortar los LN a la mitad. Para determinar el grado de severidad se consideró el tamaño de cada una de las lesiones: con un diámetro menor de 0.5 cm como leves (+); > 0.5 cm hasta 1.0 cm, como moderadas (++); y > de 1.0 cm como severas (+++).⁴²⁻⁴⁴

Se tomaron muestras de los tejidos que presentaron lesiones sugerentes de tuberculosis, cada muestra se dividió para el estudio histopatológico y aislamiento bacteriano.

Análisis bacteriológico

Las muestras para aislamiento bacteriano fueron preservadas en frío y posteriormente se realizó el cultivo bacteriano, sembrando las muestras por duplicado en medio de Stonebrink con piruvato de sodio, incubándolas a 37°C durante cuatro semanas; los cultivos con crecimiento bacteriano se tipificaron por su velocidad de crecimiento, pigmentación, tinción ZN, así como por la realización de pruebas bioquímicas (niacina, reducción de nitratos, hidrólisis de Tween-80, prueba catalasa a 22°C y 68°C, pirazinamidasas) y desarrollo en isoniácida (INH) e hidracida (TCH).

Muestras para histopatología

Para histopatología, se tomaron muestras de los tejidos que presentaron lesiones sugerentes de tuberculosis. Las muestras se fijaron en formalina al 10%, amortiguada con fosfatos, procesadas mediante la téc-

Characteristics of lesions

At necropsy, lesions were limited to LN and tracheal serosa, where the challenge strain was inoculated. The main change that was observed was increased size of LN, on occasion up to double the size, soft when touched; thin capsule surrounding the lesion, circumscribed humid lesions, of different sizes (slight, moderate or severe), with white-yellowish purulent exudates (Figure 1). Serosa of trachea was thickened and with same aspect exudates. During the bacteriological study, the presence of the challenge strain (*M. bovis*) was confirmed in all LN that had slight, moderate or severe lesions.

Lesions found by histopathology of LN and trachea serosa, were lymphadenitis and pyogranulomatous serositis. LN cortex and medulla had different size pyogranulomas, sometimes confluent, formed by a liquefactive necrosis center, scarce mineralization, abundant neutrophils, epithelioid cells, lymphocytes, plasmatic cells and scarce Langhan's type giant cells, and very thin connective tissue surrounding the pyogranuloma (Figure 2). Changes in serosa of the trachea were similar. Scarce acid-alcohol-resistant bacteria (AARB) were detected by ZN stain.

Inmunogens

At necropsy, only five animals did not show tuberculous lesions, these belonged to vaccinated animal group, three came from the groups with BCG (50%); one from the CFPE group (16.6%) and another one from the group with CFPE/IFN- γ (16.6%). All the animals of the control group had lesions, as well as the rest of the animals from the vaccinated groups (Table 1).

The group with most lesions was the group with CFPE/IFN- γ , with 18 lesions (33%); nevertheless, 88.8% were slight and moderate lesions. The control group had 16 lesions (29.6%), 93% were moderate and severe lesions; furthermore, this group presented 66.6% of the total of severe lesions. The groups that had fewer amounts of lesions were those immunized with BCG and CFPE. The BCG group only had seven lesions (12.9%), 85% of these were slight and moderate, only one was severe (14%). Next was the group inoculated with CFPE, that had 13 lesions (24%); of these, 12 were slight and moderate (92%) and only one was severe (7.6%) (Table 1). In relation to lesion dissemination, lesions observed in all groups were close to the point of entry of challenge, affecting LN of head, neck and thorax, while lesions were not observed in nasopharynx, lungs or abdominal cavity.

Considering the anatomical region, in most of the groups lesions were predominant in the neck region;

nica rutinaria de inclusión en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) y Ziehl- Neelsen (ZN).⁴⁵

Resultados

Los resultados de la prueba intradérmica efectuada antes del desafío mostraron que dos animales del grupo inmunizado con BCG fueron reactivos a la prueba; mientras que en el grupo inmunizado con CFPE hubo un solo reactor. De acuerdo con los criterios de la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, un animal del grupo inmunizado con CFPE + IFN- γ , fue sospechoso. En tanto que en el grupo testigo un animal también fue sospechoso. Al final del experimento los animales de los diferentes grupos mostraron reactividad a la prueba.

En ningún animal se observaron alteraciones en la piel en el sitio de aplicación de los inmunógenos. Un animal del grupo testigo, al inicio del experimento, murió como consecuencia de un cuadro neumónico. No se presentó mortalidad a causa del desafío.

Características de las lesiones

A la necropsia las lesiones estuvieron confinadas en los LN y la serosa de la tráquea, donde se inoculó la cepa de desafío. El cambio principal fue aumento de tamaño de los LN, en ocasiones hasta el doble de su tamaño, suaves al tacto; al corte presentaron cápsula delgada, con lesiones húmedas y circunscritas, de diferentes tamaños (leves, moderadas o severas), con un exudado purulento de color blanco-amarillento (Figura 1). La serosa de la tráquea estaba engrosada y con exudado del mismo aspecto. En el estudio bacteriológico se confirmó presencia de la cepa de desafío (*M. bovis*), en todos los LN que presentaron lesiones leves, moderadas y severas.

En la histopatología de los LN y de la serosa de la tráquea, las lesiones consistieron en linfadenitis y serositis piogranulomatosas. En corteza y médula de LN se observaron piogranulomas de diferentes tamaños, a veces confluentes, constituidos por un centro de necrosis licuefactiva, escasa mineralización, abundantes neutrófilos, células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y escasas células gigantes tipo Langhan's, y un tejido conectivo muy delgado rodeando al piogranuloma (Figura 2). En serosa de la tráquea los cambios fueron similares. Con la tinción de ZN se observaron escasas bacterias ácido-alcohol-resistentes (BAAR).

Inmunógenos

A la necropsia, únicamente cinco animales no presentaron lesiones tuberculosas, éstos pertenecían a los

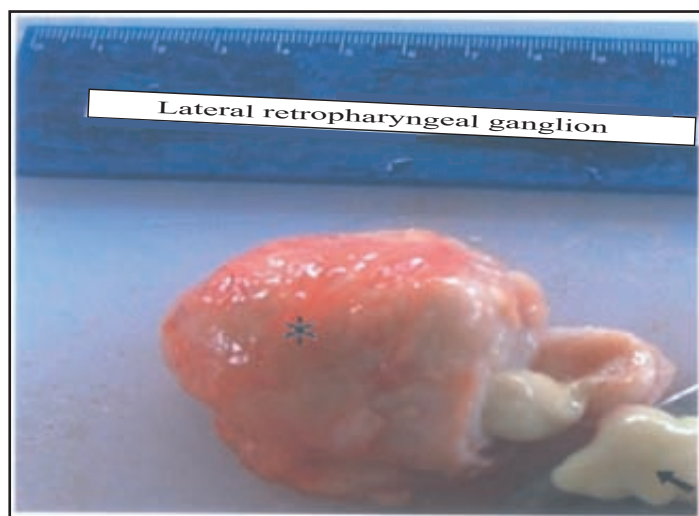


Figura 1: Linfonodo de una vaca experimental (*), que muestra aumento de tamaño y presencia de un exudado purulento (flecha).

Figure 1: Experimental cow lymph node (*), that shows increased size and presence of purulent exudate (arrow).

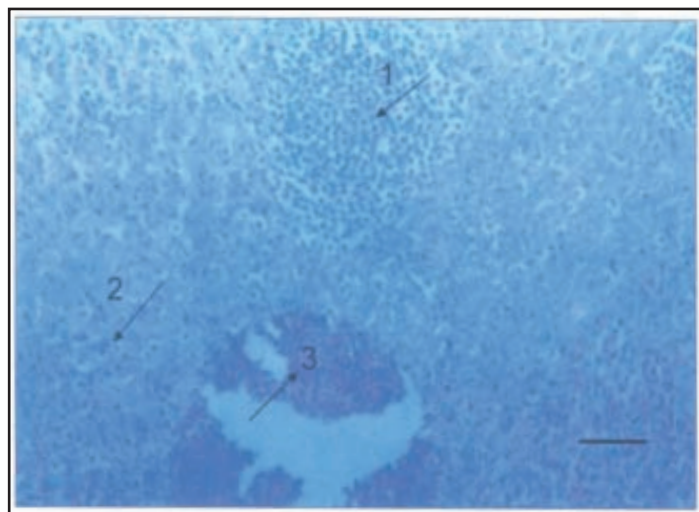


Figura 2: Sección de linfonodo. Abundantes polimorfonucleares: 1) necrosis licuefactiva; 2) mineralización; 3) piogranuloma. Tinción HE. Barra = 60 μ m.

Figure 2: Lymph node cross-section. Abundant polymorphonuclear cells: 1)Liquefacted necrosis; 2) Mineralization; 3) Pyogranuloma. Stain HE. Bar = 60 μ m.

Cuadro 1

**LESIONES A LA NECROPSIA EN BOVINOS VACUNADOS
CONTRA TUBERCULOSIS**

**LESIONS FOUND AT NECROPSY IN BOVINES VACCINATED
AGAINST BOVINE TUBERCULOSIS**

Groups	Presence lesions	%	*	Degree of severity					Most affected Lymph nodes
				%	**	%	***	%	
Non-vaccinated	5/5	100	1/16	6	7/16	44	8/16	50	Deep cervicals
BCG	3/6	50	2/7	28	4/7	57	1/7	14	Mediastinal
Vaccinated	5/6	83	9/13	69	3/13	23	1/13	8	Deep cervicals
CFPE/IFN- γ	5/6	83	11/18	61	5/18	27	2/18	11	Deep cervicals

*Slight

**Moderate

***Severe

BCG:Bacilli Calmette-Guerin

FPE: Culture filtrate protein extract

FN- γ :Interferon gamma

deep cervical LN were the most frequently affected ones, except for the BCG group, where it was the mediastinal LN (Table 1).

In relation to the inoculation zone, there were lesions in three out of five non-vaccinated animals in the trachea serosa (60%); two out of six in the group with CFPE/IFN- γ (33.3%) and there were no lesions in BCG and CFPE groups (Table1).

grupos de animales vacunados, tres fueron del grupo con BCG (50%); uno del grupo con CFPE (16.6%) y otro del grupo con CFPE/IFN- γ (16.6%). Todos los animales del grupo testigo presentaron lesiones, así como el resto de los animales de los grupos vacunados (Cuadro 1).

El grupo que presentó mayor cantidad de lesiones

Discussion

At the beginning of the experiment, the animals seemed clinically healthy and free of tuberculosis. During necropsy, the challenge strain produced tuberculous lesions in the control group animals; therefore, the infecting dose and route were capable of producing infection in susceptible animals, without causing their death^{5,41-43,46} Other studies show that challenges with *M. bovis* at doses of 10^5 - 10^6 develop a disease with more dissemination, involving multiple LN and large lung lesions with an atypical behavior when compared to what is observed under natural conditions, therefore, it was considered that doses of 10^4 CFU were better to resemble a natural infection.⁴⁷

Extension and degree of lesion severity was important to evaluate degree of protection that was induced by application of the different immunogens.

Lesions found during necropsy had a similar appearance to what has been observed in experimental and field infections with *M. bovis*.⁴⁸⁻⁵⁰ Nevertheless, by histopathology, the main characteristic was the presence of pyogranulomas. It has been observed that, under experimental conditions, when inoculating bovines with *M. bovis*, lesions are found 30 days after inoculation as firm nodules, and when sectioned yellowish colored concentric laminar plates can be observed; by histopathology characteristic granulomas are observed, formed by a caseous necrosis center, where there is a predominance of lymphocytes, macrophages, epithelioid cells and Langhan's type giant cells.^{28,42-44,51} Exact origin of this type of lesion is not clear yet, but it has been mentioned that in *M. bovis* infection T $\gamma\delta$ cells are important in the cell mediated immune response that participate in the formation of the granuloma, since its presence favors monocytes recruitment to form the characteristic granuloma; in absence of these cells polymorphonuclear cells are recruited.⁵² These pyogranulomas are commonly seen in deer and other wild animals,⁵³⁻⁵⁵ although they have also been observed in bovines, in natural and experimental conditions.^{42,44,56}

It was evident that at necropsy, animals without tuberculous lesions came only from the three immunized groups. It is also noteworthy that animals immunized with BCG and CFPE had fewer amounts of lesions and these mostly were slight and moderate. Specifically, in the group immunized with BCG vaccine, there were three animals without lesions and the rest of the animals of this same group had smaller lesions, mostly slight and moderate.

The group immunized with CFPE/IFN- γ , that had the immunogen plus an immune response immunomodulator, contrary to what was expected, did not show evident synergism, since 5 animals had tubercu-

fue el grupo con CFPE/IFN- γ , con 18 lesiones (33%); sin embargo, 88.8% fueron lesiones leves y moderadas. El grupo testigo presentó 16 lesiones (29.6%), 93% de lesiones moderadas y severas; además, este grupo presentó 66.6 % del total de lesiones severas. Los grupos que presentaron menor cantidad de lesiones fueron los inmunizados con BCG y con CFPE. El grupo con BCG presentó únicamente siete lesiones (12.9%), 85% de éstas fueron leves y moderadas, y sólo una lesión severa (14%). Le siguió el grupo inoculado con CFPE, que presentó 13 lesiones (24%); de éstas, 12 fueron leves y moderadas (92%) y únicamente una fue severa (7.6%) (Cuadro 1). En cuanto a la diseminación de las lesiones, en todos los grupos las lesiones se observaron muy cerca del punto de entrada de la cepa de desafío, afectando los LN de la cabeza, cuello y tórax; no se apreciaron lesiones en nasofaringe, pulmones, ni en la cavidad abdominal.

De acuerdo con la región anatómica, en la mayoría de los grupos las lesiones predominaron en la región del cuello; los LN cervicales profundos fueron los más frecuentemente afectados, excepto en el grupo con BCG, que fueron los LN mediastínicos (Cuadro 1).

En lo que respecta a la zona de inoculación, en la serosa de la tráquea en los animales no vacunados, tres de cinco presentaron lesiones (60%); en el grupo con CFPE/IFN- γ hubo dos de seis animales (33.3%) y los grupos con BCG y con CFPE no presentaron lesiones (Cuadro1).

Discusión

Al inicio del experimento, los animales se mostraban clínicamente sanos y libres de tuberculosis. En la necropsia, se observó que la cepa de desafío produjo en los animales testigos lesiones tuberculosas, por ello la vía y la dosis infectante fue capaz de producir la infección en los animales susceptibles, sin causarles la muerte.^{5,41,43,46} Otro estudios demuestran que desafíos con dosis de 10^5 - 10^6 de *M. bovis* desarrollan una enfermedad más diseminada, involucrando múltiples LN y grandes lesiones en pulmón, con un comportamiento atípico a lo que se observa en condiciones naturales, por lo cual se consideró la dosis de 10^4 UFC para semejar una infección natural.⁴⁷

La extensión y grado de severidad de las lesiones para la evaluación fue importante porque permitió valorar el grado de protección que se indujo con la aplicación de los diferentes inmunógenos.

A la necropsia, las lesiones presentaron una apariencia muy semejante a las observadas en casos experimentales y de campo infectados con *M. bovis*.⁴⁸⁻⁵⁰ Sin embargo, en la histopatología, la característica principal fue la presencia de piogranulomas. Se ha

lous lesions and it was the group with the most amount of lesions. A collateral study performed to evaluate cytokine expression in the groups showed that this group specifically had a higher expression of IL-10, a cytokine recognized as cellular immunity antagonist. It is probable that this is the reason why these animals had more lesions (data not shown). Nevertheless, lesions were mostly slight; therefore, experiments treating younger animals should be considered.^{30,34} Contrary to what happened with the control group, where all animals had lesions, these were mostly moderate to severe (Table 1).

In light of the foregoing, deep cervical LN of all groups were the most affected in frequency and degree of severity, and this can be attributed to the route of challenge, since these LN drain the area close to the inoculation site. Generally, in experiments and field cases the most affected LN are the ones of the thoracic cavity.^{42, 57}

Presence of lesions in tracheal serosa seems to be the consequence of accidental extravasations at the time of challenge strain inoculation, and it is not related with the immunogens, or the unspecific local immunity mechanisms.⁵⁸

Previous studies with BCG in cattle have demonstrated that the age of animals at the time of immunization is important for better protection immunity for this and other diseases. It has been said that the younger animals acquire higher protection.^{30,34,59,60} In this study, immunization was carried out when the bovines were approximately 13 months old. That could have been a factor that influenced the degree of presence, extension and severity of the lesions in all groups. Even though the number of animals in the groups is small, the results are representative, considering that it is a model performed in the species of interest, and that it was adjusted according to other similar studies.⁶¹

It is evident that vaccination with BCG and CFPE showed better efficacy against the presence and development of severe lesions, extensive to different organs. This suggests a notable degree of protection provided by these immunogens, especially low dose of BCG, since the immunogen avoided presentation of tuberculous lesions in more animals observing a tendency of LN to encapsulate mycobacteria, without showing extensive lesions in other parts of the body and this coincides with other experiments that have been carried out.^{10,29,60} Although up until now, important progress has been achieved in the development of new types of vaccines against BT, in Mexico, the use of biological products for the control of this disease has not been authorized. Nevertheless, it is important that BCG vaccine be considered as a tool of proven efficiency that may be used to control BT, reducing the

visto, en condiciones experimentales, que al inocular bovinos con *M. bovis*, las lesiones se encuentran desde los 30 días después de la inoculación, como nódulos firmes, y al corte se pueden apreciar placas laminares concéntricas de color amarillento; en la histopatología se observan granulomas característicos, constituidos por un centro de necrosis caseosa, donde predominan los linfocitos, macrófagos, células epitelioides y células gigantes tipo Langhan's.^{28,42-44,51} El origen exacto de este tipo de lesión no está bien esclarecido, pero se menciona que las células T $\gamma\delta$ en infecciones con *M. bovis* son importantes en la respuesta inmune mediada por células que participan en la formación del granuloma, debido a que su presencia favorece el reclutamiento de monocitos que conforman un granuloma característico; en ausencia de estas células se reclutan polimorfonucleares.⁵² Estos piogranulomas se presentan comúnmente en venados y otros animales salvajes,⁵³⁻⁵⁵ aunque también se han observado en bovinos, en forma natural y experimental.^{42,44,56}

Resulta evidente observar que únicamente en los tres grupos inmunizados hubo animales que no presentaron lesiones tuberculosas en la necropsia. También es notorio que en los animales inmunizados con BCG y CFPE se halló menor cantidad de lesiones, y que éstas en su mayoría fueron leves y moderadas. Particularmente se observó que en el grupo inmunizado con la vacuna BCG hubo tres animales que no presentaron lesiones, y en el resto de los animales de este mismo grupo las lesiones fueron menores y en su mayoría leves y moderadas.

El grupo inmunizado con CFPE/IFN- γ , el cual contenía el inmunógeno más un inmunomodulador de la respuesta inmune, al contrario de lo que se esperaba, no mostró sinergismo evidente, ya que cinco animales presentaron lesiones tuberculosas y fue el grupo con mayor número de lesiones. Un estudio colateral realizado para evaluar la expresión de citocina en los grupos mostró que específicamente en este grupo hubo mayor expresión de IL-10, citocina reconocida como antagonista de la inmunidad celular, razón probable por la que estos animales presentaron mayor número de lesiones (datos no mostrados). Sin embargo, las lesiones fueron leves, en su mayoría, por lo que habría que reconsiderar este tratamiento experimentando con animales más jóvenes.^{30,34} Al contrario de lo sucedido con el grupo testigo, donde todos los animales presentaron lesiones, pero éstas fueron en su mayoría moderadas y severas (Cuadro 1).

Debido a que en todos los grupos los LN cervicales profundos fueron los más afectados en frecuencia y grado de severidad, se le puede atribuir a la vía de desafío utilizada, ya que estos LN drenan muy cerca del sitio donde se hizo la inoculación. Generalmente,

economic impact of this disease and the risks of transmission to the human population. This vaccine may be useful as an alternative or complement of other sanitary management measures, mainly in the high prevalence zones, using it where it is economically impossible to slaughter animals. There is an advantage in that vaccinated animals can be differentiated from animals infected with field strains of *M. bovis* by IFN- γ technique using certain specific antigens.⁶²

Studies should be continued to help demonstrate the efficiency of these and other immunogens under natural field conditions, in face of unfettering factors, to establish its real efficiency, since these experimental animals were not subjected to the constant stress to which dairy cattle are exposed, such as daily milking, consecutive birthing, crowding, and other environmental factors, that tend to provoke severe immune system depression. Also, appropriate adjuvants should be researched to stimulate a better immune response in bovines and increase the studies on BT immunology in order to have clearer basis to develop better vaccines that give appropriate protection.

Acknowledgements

Thanks to Jaime Lopez Mendez, from the Livestock Promotion and Protection Committee of Celaya, Guanajuato, for aid in the identification of animals free of tuberculosis, as well as the Bacteriology and Immunology Department of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico, UNAM, for the donation of the challenge strain.

Referencias

1. Berrada J, Barajas-Rojas JA. Control of bovine tuberculosis in developing countries. In : Thoen CO, Steele JE, editors. *Mycobacterium bovis* in animals and humans. Iowa: Iowa state University Press, 1995:159-166.
2. Griffin JM, Dolan IA. The role of cattle-to cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the Republic of Ireland: A review. *Ir Vet J* 1995; 48: 228-234.
3. Hardie RM, Watson JM, *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol Infect* 1992; 109: 23-33.
4. Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zeland. *Vet Microbiol* 1994; 40: 23-39.
5. Buddle BM, Pollock JM, Skinner MA, Wedlock N. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int J Parasitol* 2003; 33: 555-566.
6. Wood PR, Rothel JS. *In vitro* immunodiagnostic assays

a nivel experimental y en casos de campo, los LN más afectados son los de la cavidad torácica.^{42,57}

La presencia de lesiones en la serosa de la tráquea parece ser consecuencia de la extravasación accidental al momento de realizar la inoculación de la cepa de desafío, y no tiene relación con los inmunógenos ni con los mecanismos de inmunidad locales inespecíficos.⁵⁸

En estudios previos con la BCG en el ganado, se ha demostrado que la edad de los animales al momento de la inmunización es importante para tener mejor inmunidad de protección en ésta y otras enfermedades; se menciona que a menor edad, mayor protección.^{30,34,59,60} En este estudio la inmunización se realizó cuando los bovinos tenían alrededor de 13 meses de edad, lo cual pudo influir en el grado de presencia, extensión y severidad de las lesiones, en todos los grupos. A pesar de que el número de animales en los grupos es reducido, los resultados son representativos, considerando que es un modelo realizado en la especie de interés, que fue ajustado de acuerdo con otros estudios similares.⁶¹

Es evidente que la vacunación con BCG y CFPE mostró mejor eficacia contra la presencia y desarrollo de lesiones severas y extensivas a diferentes órganos, ello sugiere un notable grado de protección de estos inmunógenos, principalmente la BCG a baja dosis, debido a que el inmunógeno evitó la presentación de lesiones tuberculosas, en más animales, observándose una tendencia del LN a encapsular a las micobacterias, sin mostrar lesiones extensivas en otras partes del cuerpo, lo cual coincide con otros experimentos realizados^{10,29,60} Aunque hasta el momento se han hecho progresos importantes en desarrollo de nuevos tipos de vacunas contra la TB, en México aún no se autoriza el uso de biológicos para el control de esta enfermedad. Sin embargo, es importante considerar a la vacuna BCG como herramienta de eficiencia comprobada, que puede ser utilizada para el control de la TB, minimizando el impacto económico que conlleva esta enfermedad y los riesgos de transmisión a la población humana. Esta vacuna puede ser útil como alternativa o complemento de otras medidas sanitarias de manejo, principalmente en zonas de alta prevalencia, utilizándose en lugares donde es económicamente imposible el sacrificio de animales. Existe la ventaja de que se pueden diferenciar animales vacunados de infectados con *M. bovis* de campo, por medio de la técnica de IFN- γ empleando ciertos antígenos específicos.⁶²

Es necesario continuar con estudios que ayuden a demostrar la eficiencia de éstos y otros inmunógenos en condiciones naturales de campo, ante factores desencadenantes, para establecer su eficiencia real, debido a que estos animales experimentales no fueron sometidos al estrés constante al que son sometidos los

- for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1994; 40:125-135.
7. Díaz F, Banda V, Jaramillo L, Arriaga C, González D, Estrada-Chávez C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Méx* 2003; 34 :13-26.
 8. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 1990; 67:134-137.
 9. Norma Oficial Mexicana. NOM- 031-Z00-1995. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria (CONAPROZ), Normas Oficiales Mexicanas en materia de Salud Animal. Actualizado: 27 agosto 1998 (citado: 25 septiembre 2005) Disponible en URL: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/mrni/Doc222/2004>.
 10. Skinner MA, Wedlock DN, Buddle BM. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev Sci Tech* 2001; 20:112-132.
 11. Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DM, Collins DM, De Lisle GW. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Vet Immun Immunopathol* 2002; 87:177-185.
 12. Wedlock DN, Vesosky B, Skinner MA, De Lisle GW, Orme IM, Buddle BM. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate protein and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2000; 68: 5809-5815.
 13. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995; 13: 1123-1130.
 14. Griffin JF, Chinn DN, Rodgers CR, Mackintosh CG. Optimal models to evaluate the protective efficacy of tuberculosis vaccines. *Tuberculosis* 2001; 81: 133-139.
 15. Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennet LT *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991; 351: 456-458.
 16. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette- Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13853-13858.
 17. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT *et al.* Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol* 1995; 85: 502-508.
 18. Wedlock DN, Skinner MA, Parlane NA, Vordermeier HM, Hewinson RG, De Lisle GW *et al.* Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83: 339-349.
 19. Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic

bovinos productores de leche, como el ordeño diario, los partos consecutivos, el hacinamiento y otros factores ambientales, que tienden a provocar fuerte depresión del sistema inmune. Además, se deben investigar los adyuvantes apropiados que estimulen mejor respuesta inmune en bovinos e incrementar el estudio de la inmunología sobre la TB, para tener bases más claras y así desarrollar mejores vacunas que confieran protección adecuada.

Agradecimientos

Se agradece a Jaime López Méndez, del Comité de Fomento y Protección Pecuaria de Celaya, Guanajuato, la ayuda en la identificación de animales libres de tuberculosis, así como al Departamento de Bacteriología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por la donación de la cepa de desafío.

reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomic. *Infect Immun* 2002; 70: 6996-7003.

20. Wedlock DN, Skinner MA, Parlane NA, Vordermeier HM, Hewinson RG, Hecker R *et al.* Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106: 53-63.
21. Bosio CM, Orme IM. Effective nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5048-5051.
22. Haslo K, Ardersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Ardersen P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63:804-810.
23. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, De Lisle GW. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002; 20: 1126-1133.
24. Williams DE. *Mycobacterium bovis* BCG Infection in Humans. In: Thoen CO, Steele JE, editors. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa: Iowa state University Press, 1995: 47-61.
25. Hewinson RG, Vordermeier HM, Buddle BM. Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics. *Tuberculosis* 2003; 83: 119-130.
26. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG *et al.* Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect Immun* 2004; 72: 2462-2467.
27. Milian SF, Anaya EA, Gallegos TR. A review of *M. bovis* BCG protection against BT in cattle and other animal species. *Prev Vet Med* 2003; 58: 1-13.

28. Liebana E, Aranaz A, Aldwell FE, Nair J, Neill SD, Smyth AJ *et al.* Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunol* 2000; 99: 23-29.
29. Ramirez IC, Santillan MA, Gonzalez SD. The goat experimental ruminant model for tuberculosis infection. *Small Rumin Res* 2003; 47: 113-116.
30. Buddle BM, Aldwell FF, Pfeffer A, De Lisle GW, Corner LA. Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle- effect of dose of *Mycobacterium bovis* and pregnancy on immune responses and distributions of lesions. *NZ Vet J* 1994; 42: 167-172.
31. Brandt L, Fehino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R *et al.* Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine; some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70: 672-678.
32. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S *et al.* Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284:1520-1523.
33. Aldwell FE, Keen DL, Stent VC, Thomson A, Yates GF, De Lisle GW *et al.* Route of BCG administration in possums affects protection against bovine tuberculosis. *N Z Vet J* 1995; 43: 356-359.
34. Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine. A meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000; 31:64-67.
35. Quinn PJ. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. *Adv Vet Sci Com Med* 1990; 35: 43-99.
36. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-2247.
37. Kennedy HE, Welsh MD, Bryson DG, Cassidy JP, Forster FI, Howard CJ *et al.* Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1+ $\gamma \delta$ T Cell. *Infect Immun* 2002; 70: 1488-1500.
38. Thoen CO. The genus *Mycobacterium*. In: Carter GW, Cole JR, editors. *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*. 5th edition. San Diego, Calif: Academic Press Inc, 1990: 287-298.
39. Díaz OF. Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan linfocitos T de bovino (tesis de doctorado). México (DF): UNAM, 2000.
40. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
41. Norma Oficial Mexicana. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio Humanitario de los Animales Domésticos y Silvestres. *Diario Oficial de la Federación*. 24 junio de 1995.
42. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 351-354.
43. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 41-52.
44. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Early Lesion Formation in Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 1998; 119: 27-44.
45. Luna LG. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill, 1968.
46. Buddle BM, Aldwell FE, Skinner MA, Lisle GW, Denis M, Vordermeier HM *et al.* Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2005; 23: 3581-3589.
47. Andersen P, Askgaard D, Gottschau A, Bennedsen J, Nagai S, Heron I. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scan J Immunol* 1992; 36: 823-831.
48. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet Rec* 1988; 123: 340-343.
49. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001; 81:79-86.
50. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 53-63.
51. Palmer MV, Whipple DL, Rhyan JC, Bolin CA, Saari DA. Granuloma development in cattle after intratracheal inoculation with *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* 1999; 60: 310-315.
52. Carding SR. Role of gamma delta T cells in immunity to infectious diseases and the regulation development. *Immunol Res* 1998; 17:13-22.
53. Thoen CO, Schliesser T, Kormendy B. Tuberculosis in Captive Wild Animals. In: Thoen CO, Steele JE, editors. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa: Iowa state University Press, 1995: 93-104.
54. Stuart FA, Manser PA, McIntosh FG. Tuberculosis in imported red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Rec* 1988; 122: 508-511.
55. Rhyan JC, Saari DA, Williams ES, Miller MW, Davis AJ, Wilson AJ. Gross and microscopic lesions of naturally occurring tuberculosis in a captive herd of wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) in Colorado. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 428-433.
56. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *Vet J* 2002; 163: 115-127.
57. Corner LA, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR *et al.* Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J* 1990; 67: 389-392.
58. Thoen CO, Bloom BR. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*: In: Thoen CO, Steele JE, editors. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa: Iowa State University Press, 1995: 3-14.
59. Buddle MB, Wedlock DN, Parlange NA, Corner LA, De Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infect Immun* 2003; 71: 6411-6419.
60. Hope JC, Thom ML, Villareal-Ramos B, Vordermeier

- HM, Hewinson RG, Howard CJ. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. Bovis*. Clin Exp Immunol 2005; 139: 48-56.
61. Vordermeier HM, Cockle PJ, Whelan AO, Rhodes S, Chambers MA, Clifford D *et al*. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. Vaccine 2001; 19:1246–1255.
62. Vordermeier HM, Whelan A, Cokle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 571-578.