

Identificación de biomarcadores asociados con la infección de *Mycobacterium bovis* y la respuesta inmunológica protectora a la tuberculosis en alpacas

Juan Agapito^{1,*}, Rufino Quilla², Silvia Capristano³, Pilar García³, Angel Montes¹, Heinner Guio^{3,4}

¹ Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470. San Borja, Lima, Perú

² Fundo Huaycuyo, Ganadería Alta Gracia SCRL. Distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar, Puno, Perú

³ Instituto Nacional de Salud, Av. Defensores del Morro 2268 Chorrillos. Lima, Perú

⁴ Asociación Latinoamericana de Biotecnología. Av. Caminos del Inca 275 Surco

Resumen

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa que afecta una amplia gama de hospederos en los que se encuentra la alpaca. El objetivo de este estudio fue evaluar las características inmunológicas de la tuberculosis latente, utilizando como herramienta diagnóstica una técnica de inmunoensayo (ELISA) para medición de la citoquina interferón gamma (INF- γ), secretada por los leucocitos sensibilizados durante un periodo de cultivo de 24 horas con antígenos específicos (ESAT-6 y CFP10) al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Adicionalmente se evaluó la proteína PPD (derivado proteico purificado) que se emplea en la prueba de reacción cutánea, así como también la utilidad de la secuencia de inserción IS6110 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y una PCR anidado dirigida contra el gen de la proteína MPB70 de *Mycobacterium bovis*. Se evaluaron un total de 52 alpacas entre sanas y enfermas sin antecedentes de tuberculosis, provenientes del Fundo Huaycuyo-Puno. Los resultados mostraron que un 98.1 % (51/52) de las alpacas dieron resultados negativos al ensayo de IFN- γ , y 1.9 % (1/52) dio resultado indeterminado. Así mismo, no hubo amplificación por PCR al segmento IS6110, ni al MPB70. Sin embargo, en 9 alpacas evaluadas con antígenos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* se encontró una secreción de INF- γ en 22 % con ESAT-6, 44 % con CFP-10 y 44 % usando el PPD. Estos resultados son una primera aproximación cuantitativa del IFN- γ en los linfocitos de las alpacas ubicadas a 3925 msnm después de una exposición antigénica. Sin embargo no podemos concluir cual sería el mejor antígeno inmunodominante en alpacas, debido a un bajo número de muestras evaluadas.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, Prueba sanguínea de IFN- γ y PCR

Identification of biomarkers associated with *Mycobacterium bovis* infection and protective immune response to tuberculosis in alpacas

Abstract

Bovine tuberculosis is an infectious disease that affects a wide range of host in which there is the alpaca. The objective of this study was to evaluate the immunological characteristics of latent tuberculosis, as a diagnostic tool using an ELISA assay, based on detection of interferon-gamma cytokine (INF- γ), secreted by leukocytes sensitized for a 24 hours culture period with specific antigens (ESAT-6 and CFP10) which are specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex. Additionally, we evaluated the PPD (purified protein derivative) used in the skin test, the utility of the insertion sequence IS6110 from *M. tuberculosis* complex and the nested PCR directed against the gene for the MPB70 protein of *Mycobacterium bovis*. We evaluated a total of 52 sick and healthy alpacas with no history of tuberculosis, from the Fundo Huaycuyo-Puno. The results showed that 98.1% (51/52) were negative to the IFN- γ responses, and 1.9 % (1/52) was an indeterminate results. Likewise, there was no PCR amplification segment IS6110, either the MPB70. However, after specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen evaluation we found INF- γ response in 9 alpacas, 22 %, 44 % and 44% in ESAT-6, CFP10 and PPD stimulation respectively. These results are a first quantitative approach of IFN- γ in lymphocytes of alpacas located at 3925 m after antigen exposure. Futures studies including larges samples should be considered to make conclusions.

Keywords: Bovine tuberculosis, Blood test and PCR IFN- γ

* Correspondencia autor: jagapito@ipen.gob.pe

1. Introducción

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad bacteriana crónica de los animales y del hombre, causada por *Mycobacterium bovis*. En muchos países es una enfermedad infecciosa importante del ganado vacuno y de otros animales domésticos, incluyendo las llamas y las alpacas [1].

En nuestro país, desde el año 1999 el Ministerio de Agricultura mediante el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) viene ejecutando Programas de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (PCETB) y ha establecido como método oficial para el diagnóstico de la enfermedad el uso de la prueba de tuberculina, que consiste en la inoculación intradérmica del derivado de proteína purificada (PPD) del *M. bovis*, que por ser una prueba de diagnóstico de tipo indirecto, no garantiza afirmar en un 100 % que un animal reactor positivo sea debido a una infección por *M. bovis* [2].

El PPD no tiene un comportamiento uniforme y se sabe que se producen reacciones cruzadas por sensibilizaciones originadas con otras micobacterias no específicas, usualmente no patógenas para los bovinos, como los de origen humano, aviar, incluso los de vida libre; en consecuencia gran número del resultado obtenido son falso positivos [3, 4]. Así mismo, la prueba del PPD también ha sido empleada en alpacas y llamas, donde se reporta cierta inconsistencia de la prueba debido a una baja sensibilidad [5].

De acuerdo con los protocolos de SENASA-PCETB, todo animal reactor al PPD debe ser sometido a la prueba doble comparativa, y de resultar nuevamente positivo, debe ser sacrificado sin considerar la posibilidad de ser reactores falsos positivos, lo que se traduce en pérdidas económicas para los ganaderos. Por otro lado, el cultivo y aislamiento de la micobacteria es un proceso lento y difícil que dura entre 6 a 8 semanas de acuerdo con los métodos convencionales y la tipificación por especie no resulta fácil, especialmente si se emplea métodos bioquímicos [6].

Recientemente, un nuevo método de diagnóstico, basado en el la incubación de muestras de sangre en presencia de PPD y la

detección adicional de la liberación de la citoquina interferón gama (INF- γ) por medio de un inmunoensayo (ELISA), ha sido desarrollado en varios países [7]. Esta prueba ha demostrado tener la capacidad de diagnosticar animales infectados por medio de la determinación de niveles de gamma interferón en una prueba *in vitro* con sangre entera. Esta prueba rápida y fácil, utiliza anticuerpos monoclonales anti-interferón gamma, que permite diferenciar las infecciones debidas a *M. bovis* y *Mycobacterium avium* [8], con una sensibilidad entre un 88 % a un 96,6 % y una especificidad entre un 96,2 % a un 98 %, lo que permite detectar la infección en una fase más temprana, comparada con la prueba intradérmica de la tuberculina [9].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia diagnóstica de una prueba de ELISA para medición de interferón gamma y así poder definir las características inmunológicas de la tuberculosis latente en una población de alpacas de la zona Sur del Perú, donde no existe manifestaciones clínicas que evidencien infección por *M. bovis*.

2. Material y Métodos

2.1 Muestras

El estudio se realizó con un muestreo de 52 alpacas proveniente del Fundo Huaycuyo, Ganadería Alta Gracia SCRL, distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar, departamento de Puno.

2.2 Aislamiento de células mononucleares y criopresevación

A cada animal se le extrajo 8 ml de sangre total, en un tubo con citrato de sodio como anticoagulante y con ficoll hypaque para la separación de células (cell preparation tube with sodium citrate, BD Vacutainer[®]CPT[™]).

La sangre colectada fue transportada a temperatura ambiente por un lapso no mayor a 24 horas para su procesamiento. Para el aislamiento de las células mononucleares (PBMC) se procedió a centrifugar los tubos a 3500 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Al término de la centrifugación se observó la formación del anillo celular y con la ayuda de una pipeta de transferencia se extrajo la interfase que contenía las células

mononucleares. Las células extraídas fueron colocadas en un tubo de 50 ml conteniendo 10 ml de RPMI. En este paso se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer mezclando 20 μ l de esta suspensión en una proporción 1:1 con azul de trypan (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Después de la colección de la muestra para conteo celular se procedió a completar a un volumen de 40 mL con RPMI. Esta suspensión celular fue centrifugada a 2000 rpm/15 minutos a 20 °C. El sedimento fue resuspendido en el volumen restante y se adicionó 5 ml de RPMI suplementado con 10 % Suero fetal Bovino (SFB, Sigma, St Louis, MO, USA). Se homogenizó y centrifugó nuevamente a 20 °C por 15 min a 2000 rpm, luego se resuspendió el sedimento en el volumen restante de medio RPMI + 10 % SFB. Las células fueron suspendidas en RPMI y medio de criopreservación (SBF + DMSO 10 %) a una concentración final de 1×10^6 cél/mL y fueron almacenadas a -80 °C.

2.3 Descongelamiento de Linfocitos

Se retiraron las muestras almacenadas a -80 °C e inmediatamente se trasladaron al baño María (37 °C) para el descongelamiento (punto crítico para la viabilidad de las células). Cada muestra fue resuspendida en 1 ml de RPMI + 10 % de SBF. Posteriormente, las células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 ml con 9 ml de medio RPMI, realizando movimientos en espiral. Se centrifugó por 5 minutos a 1,500 rpm (500 x g) y luego se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron nuevamente las células en 1 ml de RPMI suplementado con 10 % de SBF y se procedió a realizar el conteo celular antes descrito.

2.4 Antígenos

La estimulación se realizó empleando tres antígenos: ESAT-6 (early secretory antigenic target), CFP-10 (culture filtrate protein) y PPD. El antígeno PPD (Statens Serum Institut 5 Artillerivej 2300, Copenhagen-Dinamarca) y los antígenos recombinantes ESAT-6 (5 μ g/ml) y CFP-10 (5 μ g/ml) fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS). El mitógeno Fitohemaglutinina (PHA control positivo) fue proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología y Biología

Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2.5 Estimulación de PBMC

Se trabajó con una suspensión de células a una concentración de 1000 cél/ μ L en medio RPMI suplementado. Se colocaron 200 μ L de esta suspensión en cada pozo de la placa para las diferentes muestras a analizar. Luego de la adición de los antígenos se incubó la placa por 24 horas a 37 °C para luego extraer el sobrenadante a analizar por la técnica de ELISA.

2.6 ELISA para medición de INF gamma

El inmunoensayo enzimático (ELISA) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cellestis Limited, Carnegie, Australia). Los resultados fueron interpretados utilizando el software de análisis suministrado por el fabricante. Brevemente, una respuesta positiva fue determinada si el valor del IFN- γ de la muestra con antígenos de TB corregido con el control negativo era $\geq 0,35$ UI/mL, mientras que las muestras con $< 0,35$ UI/mL fueron consideradas negativas. Resultados indeterminados se definieron como: a) niveles del IFN- γ en los controles negativos de $> 8,0$ UI/mL, o b) respuestas de IFN- γ en los controles positivos (corregidos con el control negativo) de $< 0,5$ UI/mL.

2.7 Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico (ADN nuclear) a partir de 250 μ l de sangre con anticoagulante utilizando el método de fenol/cloroformo proteinasa K [10]. El ADN fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDropTM 1000 y las lecturas se realizaron a 260 nm y a 280 nm,

2.8 Ensayo de PCR

Para la amplificación de *IS6110* se utilizaron los primers INS1 e INS2 descritos [11], que amplifican un segmento de 245 pb de la secuencia del ADN. La amplificación fue efectuada en un volumen final de 10 μ l, utilizando el kit Multiplex PCR (QUIAGEN), y conteniendo: Master mix Quiagen 1X, MgCl₂ Quiagen 3.0 mM; dNTPS Quiagen 2 mM, HotStarTaq DNA polymerase 1U, primers 10 pmol. El programa de amplificación consistió en una denaturación inicial a 94 °C por 15 minutos, seguido de 33

ciclos de 94 °C por 45 segundos, 65 °C por 60 segundos y 72 °C por 30 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Los productos de la RPC fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio y visualización en transiluminador de luz ultravioleta, en comparación con marcadores de peso molecular.

También se realizó la PCR simple para el diagnóstico de TB mediante la amplificación de un segmento de 372 pb del gen MPB70, la cual es considerado por ser especie específico para *M. bovis* [12,13], utilizando los siguientes oligonucleótidos: (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' y TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTC CT 3'). El protocolo de amplificación fue de 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 58 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 2 %. Posteriormente, utilizando una décima parte del producto obtenido en la reacción anterior se procedió a la amplificación de un fragmento de 208 pb del gen MPB70, dentro de la región de 372 pb,

mediante una PCR anidada con los oligonucleótidos descritos (M22/3 5'GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGG C 3' y M22/4 5'CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'): 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min [12, 13, 14].

3. Resultados y Discusión

El presente estudio es una primera aproximación en cuantificar citoquinas en alpacas ubicadas a 3925 msnm. Se evaluaron 52 animales mediante un kit comercial de ELISA. Del total, hubo 51 (98.1 %) animales negativos a la prueba y 1 (1.9 %) dio resultado indeterminado (ID) posiblemente como respuesta negativa a los antígenos de TB, tal vez debido a un número insuficiente de actividad linfocitaria o a un fenómeno de inmunodepresión del propio animal. Este resultado correspondió a una alpaca de la raza Huacaya con un fenotipo regular. Así mismo todos ellos tuvieron valores de DO en la prueba por debajo del punto de corte (0.5 DO₄₅₀) Figura 1.

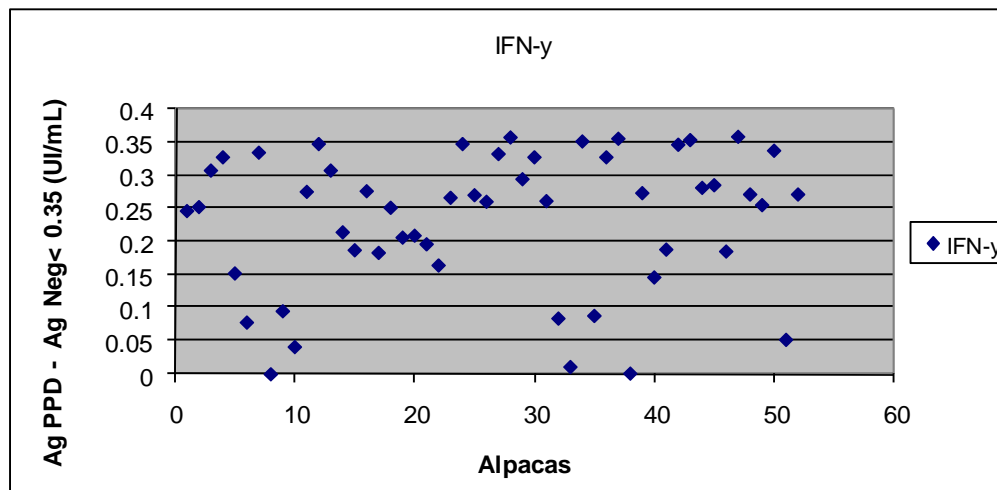


Figura 1. Respuesta individual de las alpacas, estimuladas con Ag. PPD – Control Negativo (blanco). Los resultados se presentan como respuesta a los antígenos (≤ 0.35 UI/mL para el ensayo de IFN- γ .)

3.1 Estimulación celular con antígenos de *Mycobacterium* y medición de INF-gamma mediante ELISA:

Se analizaron los antígenos asociados con *M. tuberculosis* y *M. bovis* (ESAT-6, CFP-10 y PPD) y mitógeno (PHA) para evaluar la

viabilidad celular frente a la estimulación *in vitro* de PBMC. Esta estimulación se llevó a cabo con 9 alpacas, en quienes previamente se obtuvo un mejor rendimiento de células mononucleares (PBMC). Como resultado se encontró que las muestras 4, 5, 6, y 9 tuvieron baja o nula viabilidad celular, las

muestras 7 y 8 tuvieron viabilidad intermedia y una mejor viabilidad en las muestras 1, 2 y 3. Siendo la muestra 2, la que tuvo mejor respuesta del mitógeno y a la producción de $INF-\gamma$. El porcentaje de respuesta frente a los antígenos evaluados fue de 22 % con ESAT-

6, 44 % con CFP-10 y 44 % usando el PPD. Los resultados obtenidos en este estudio, en pequeña escala, encuentran una respuesta de $INF-\gamma$ de parte de los linfocitos después de una exposición antigénica. Figuras 2, 3 y 4.

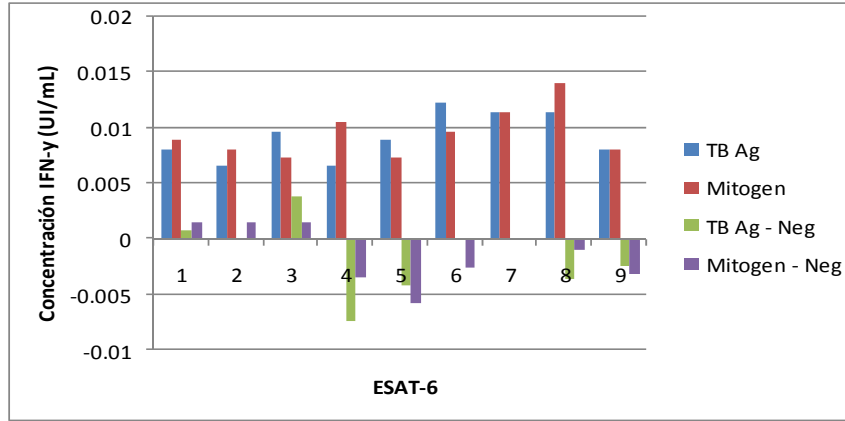


Figura 2. Respuesta del $INF-\gamma$ frente al antígeno ESAT-6 en la prueba de estimulación con péptidos.

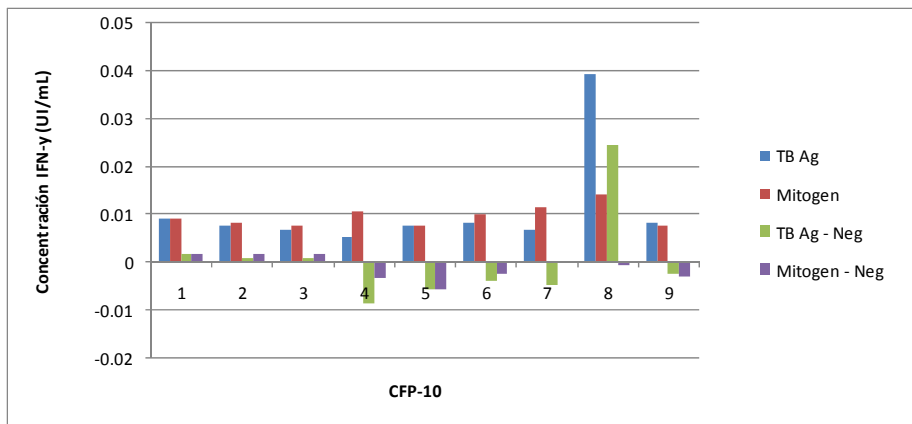


Figura 3. Respuesta del $INF-\gamma$ frente al antígeno CFP-10 en la prueba de estimulación con péptidos.

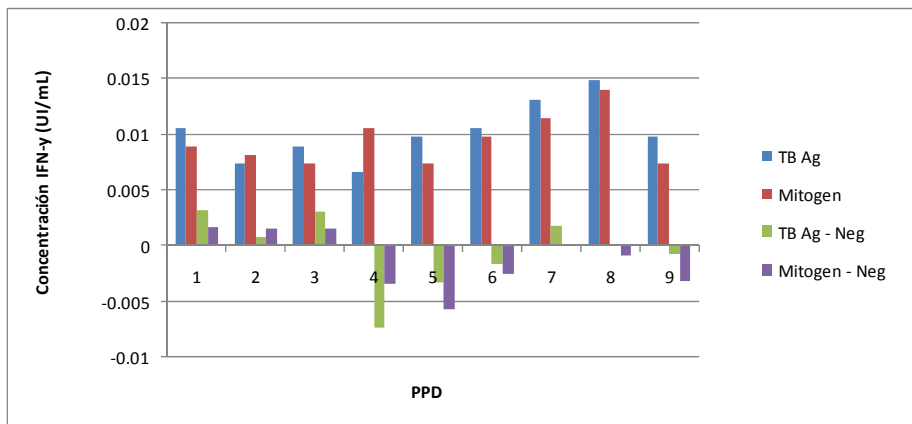


Figura 4. Respuesta del $INF-\gamma$ frente al antígeno PPD en la prueba de estimulación con péptidos.

3.2 Ensayos de PCR

Todas las muestras que resultaron negativas para INF- γ , también resultaron negativas para PCR, en la cual se amplificó con primers específicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 que incluye al *M. bovis*. [15, 16].

4. Conclusiones

Nuestro análisis encuentra una respuesta de IFN- γ de parte de los linfocitos; sin embargo, no podemos concluir cual sería el mejor antígeno inmunodominante en alpacas, debido a un bajo número de muestras.

Consideramos que futuros estudios incluyendo controles positivos son necesarios para corroborar nuestros hallazgos. Las limitaciones en el presente proyecto fueron la ausencia de un laboratorio en la zona de residencia de las alpacas para extraer y criopreservar inmediatamente las células y obtener una mejor viabilidad al momento del descongelamiento en la ciudad de Lima para estimulación antigénica. Asimismo, es necesario desarrollar comparaciones futuras con la prueba de tuberculina, técnica que el ensayo de QuantiFERON-TB ha tratado de homologar en su utilidad para el diagnóstico de la enfermedad en las alpacas.

La técnica del PCR simple y PCR anidada, empleadas en este estudio permitieron aumentar la sensibilidad del diagnóstico, al confirmar que todas las alpacas que dieron negativo a INF- γ , lo fueron por PCR.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el fondo concursable CONCYTEC-PROCYT 2011.

6. Bibliografía

- [1] O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tubercle Lung Dis.* 1995; 76:1-46.
- [2] Ministerio de Agricultura, SENASA. 2003. [homepage de Internet]. Disponible en: http://www.senasa.gob.pe/sanidad_animal/programas_zoosanitarios/ce_brucelosis_tuberculosis_bovina/tuberculosis_bovina.htm.
- [3] Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ. Effect of a recent injection of

purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science.* 1995; 58:217-221.

[4] Rieder HL. Bases epidemiológicas del control de la tuberculosis. Unión Internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias. 1999. París. 9 pp.

[5] Fernández OM, Rosadio AR. Aplicación de tuberculina en alpacas. *Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú).* 1998; 9(2):48-53.

[6] De Kantor IN, De Kantor EN, Ritacco V. La tuberculosis bovina en América Latina y el Caribe: Situación actual, el control y erradicación programas. *Microbiología Veterinaria.* 1994; 40(1-2):5-14.

[7] Rothel JS, Jones SL, Corner LA, *et al.* A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal.* 1990; 67:134-137.

[8] Torres PM. Situación de la tuberculosis bovina en la República de Argentina. SENASA-Argentina. 2006. http://www.senasa.gov.ar/oldweb/sanidad/tuberculosis/situacion_actual.pdf.

[9] Domingo M, Liebana E, Vilafranca M, Aranaz A, Vidal D, Prats N, Mateos A, Casal J, Domínguez L. A field evaluation of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. In: *Tuberculosis in Wildlife and Domestic Animals.* Griffin F. & de Lisle G., eds. *Proceedings of the Second International Conference on Mycobacterium bovis.* 1995. 28 August-1 September 1995. University of Otago, New Zealand, 304-306.

[10] Millar A, *et al.* A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids.* 1988. Res. 16:215.

[11] Van Soolingen D, Hemans PWM. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J.* 1995; 8:649s-56s.

[12] Liébana E, Aranaz A, Domínguez L, *et al.* The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Veterinary Microbiology.* 1997; 54:223-233.

[13] Diaz F, Banda V, Jaramillo L, Arriaga C, Gonzales D, Estrada C. Identificación de

bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y Moleculares. Vet. Mex. 2003; 34(1):13-26.

[14] González Llamazares OR, Gutiérrez Martín CB, Aranaz Martín A, Liébana Criado E, Domínguez Rodríguez L, Rodríguez Ferri EF.. Comparison of different methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin- or interferon- γ -reacting cattle in Spain. Journal of Applied Microbiology. 1999; 87:465-471.

[15] Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, *et al.* Strain identification of

Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31:406-9.

[16]] Retamal Patricio M, Martínez T. M. Angélica, Avalos P. Pedro. Secuencia de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. Rev. Chil. Infect. 2003; 20(3):166-170.