

Empleo de una PCR-multiplex para diferenciar caprinos vacunados con *M. bovis* BCG de infectados con *M. bovis* de campo

Using a multiplex PCR to differentiate between *M. bovis* BCG-vaccinated and pathogenic *M. bovis*-infected goats

Isaura Carolina Ramírez Casillas^a, Marco Antonio Santillán Flores^a, Camila Arriaga Díaz^a, Beatriz Arellano Reynoso^a, Francisco Morales Alvarez^a

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad de la prueba diagnóstica de PCR-Multiplex para diferenciar animales vacunados con BCG de los infectados con *Mycobacterium bovis* patógena. Se trabajó con muestras de moco nasal, sangre y órganos obtenidos en la necropsia de caprinos desafiados con *M. bovis* patógena (Grupo 1 n=10), vacunados con *M. bovis*-BCG y desafiados con *M. bovis* patógena (Grupo 2 n=10), y solamente vacunados con *M. bovis*-BCG (Grupo 3 n=4). Todas las muestras se analizaron con los métodos de PCR-Multiplex y cultivo bacteriológico. El cultivo bacteriológico de la sangre y moco nasal fue siempre negativo, pero en las muestras de los grupos 1 y 2 obtenidas en la necropsia, se aisló la cepa de desafío (19/20). En las muestras de moco nasal obtenidas antes del desafío los resultados de la PCR-Multiplex fueron negativos; después del desafío, se obtuvo un producto de amplificación de 150 pb característico de *M. bovis* patógeno, de cuatro animales del Grupo 1 al día 60, y de seis animales del mismo grupo al día 90. Con el ADN obtenido del cultivo bacteriológico de los grupos 1 y 2 se observó amplificación de *M. bovis* patógeno. Ninguno de los productos de amplificación correspondió a *M. bovis*-BCG, lo que confirma que la cepa vacunal no se disemina por sangre y tampoco se elimina por moco nasal. El empleo de la PCR-Multiplex en muestras biológicas como moco nasal, permitió distinguir a los animales vacunados con BCG de los infectados.

PALABRAS CLAVE: *Mycobacterium bovis*, PCR-Multiplex, Diagnóstico, Vacuna BCG.

ABSTRACT

The purpose of this research was to determine the ability of the Multiplex PCR diagnostic test to differentiate animals vaccinated with BCG from those infected with pathogenic *Mycobacterium bovis*. Nasal mucus, blood and organ tissue samples obtained from goats at necropsy, that had been either challenged with pathogenic *M. bovis* (Group 1, n=10), vaccinated with *M. bovis*-BCG/ challenged with pathogenic *M. bovis* (Group 2, n=10), or vaccinated with *M. bovis*-BCG only (Group 3, n=4). All samples were analyzed using both the Multiplex PCR, and bacteriological culture. Blood and nasal mucus cultures were negative at all times, but the challenge strain was isolated from organ samples obtained *post-mortem* from Groups 1 and 2 (19/20). Negative results were obtained from the Multiplex PCR of nasal mucus samples obtained prior to challenge. A 150 bp amplification product –characteristic of pathogenic *M. bovis*– was obtained from 4 group-1 animals on d 60, and from 6 Group-1 animals on d 90. With the DNA from the cultures of Groups 1 and 2, amplification of pathogenic *M. bovis* was observed. None of the amplification products corresponded to *M. bovis*-BCG, confirming that the vaccine strain does not spread by either blood or nasal mucus. The use of Multiplex PCR in biologic samples (i.e. nasal mucus) allowed distinguishing BCG-vaccinated animals from infected animals.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis*, Multiplex PCR, Diagnosis, BCG Vaccine.

La tuberculosis sigue siendo una de las principales enfermedades infecciosas del ganado bovino que

Tuberculosis (TB) remains as one major infectious disease of cattle, causing important economic losses

Recibido el 24 de marzo de 2004 y aceptado para su publicación el 18 de mayo de 2004.

^a CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera México-Toluca Km 15.5, Colonia Palo Alto, Delegación Cuajimalpa 05110 México D.F. Tel. 55 70 31 00 ext. 41. mayco1768@yahoo.com.mx santillan.marco@inifap.gob.mx. Correspondencia al segundo autor.

ocasiona pérdidas económicas importantes en la industria pecuaria. La vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guerin atenuado) ha sido utilizada de manera experimental desde 1920 para evaluar su impacto en el control de esta enfermedad^(1,2,3); aunque los resultados son variables, se observa una disminución en la severidad de las lesiones. Durante algún tiempo, hubo poco avance en la investigación sobre la utilidad de la vacuna BCG, debido a que convierte a los animales en reactores a la tuberculina^(4,5), inhabilitando la prueba diagnóstica reconocida oficialmente. La presencia de la enfermedad en animales silvestres y el resurgimiento de la tuberculosis bovina en áreas donde ya se había erradicado ha llevado a considerar de nuevo la vacunación con BCG, como una alternativa para el control de la enfermedad, particularmente si se aplica en animales jóvenes^(6,7,8).

En México, la incidencia de tuberculosis en el ganado productor de leche hace que el procedimiento de prueba y sacrificio como medida de control sea difícil de aplicar, por lo que en muchas zonas lecheras la vacunación podría ser considerada como una medida de control a mediano plazo. Sin embargo, para poder considerar la vacunación con *M. bovis* BCG como una alternativa en el control de la tuberculosis en el ganado productor de leche, uno de los requerimientos será contar con pruebas de diagnóstico que permitan diferenciar animales infectados con *M. bovis* de campo, de animales vacunados con *M. bovis* BCG.

Una alternativa puede ser el uso de métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Talbot *et al.*⁽⁹⁾ desarrollaron una PCR-Multiplex, llamada así porque se pueden obtener varios productos de amplificación en una sola reacción, y se basa en la identificación de diferencias genéticas observadas en un segmento de ADN de 9.5 kilodaltones, denominado RD1. Utilizando los oligonucleótidos específicos ET1, ET2 y ET3, se observó que las secuencias ET1 y ET3 son complementarias y se encuentran flanqueando a la secuencia RD1. Cuando estos iniciadores se unen con el ADN de la cepa *M. bovis* BCG que no tiene esta región, se amplifica

to livestock industry. BCG (attenuated Calmette & Guerin bacillus) vaccine has been evaluated experimentally since 1920 as a means to control TB^(1,2,3). Even though results vary, decreased lesion severity is observed. Little progress in the usefulness of BCG vaccine research was obtained for quite some time, since vaccinated animals become tuberculin-positive reactors^(4,5), thus nullifying this officially-recognized diagnostic test. The presence of the disease in wild animals, together with the re-emerging of cattle TB in areas where it had been already eradicated, have led workers to re-consider the vaccination with BCG as an alternative to control the disease, particularly in young animals^(6,7,8).

In Mexico, the incidence of TB in dairy cattle makes the test/kill control procedure difficult to apply, so that in many dairy areas vaccination could be considered as a control measure in the medium range. Nevertheless, in order to consider *M. bovis* BCG vaccination as an alternative in the control of TB in dairy cattle, diagnostic tests allowing for the differentiation of animals infected with field *M. bovis* from those vaccinated with BCG is required.

One alternative can be the use of molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR). Talbot *et al.*⁽⁹⁾ developed a Multiplex PCR (so called because several amplification products can be obtained with one single reaction), based on the identification of genetic differences in the RD1 (9.5 kilodalton) DNA segment. Using the specific ET1, ET2, and ET3 oligonucleotides, it was found that ET1 and ET3 sequences are complementary, and are located on both sides of the RD1 sequence. When these primers bind *M. bovis* BCG DNA that lacks this particular region, a 200 bp product is amplified. The ET2 sequence constitutes one part of the RD1 sequence 3' end. When ET2 and ET3 primers bind the DNA from pathogenic strains that do have the RD1 region, a 150 bp amplification product is obtained. Therefore, this segment is missing in all *M. bovis* BCG strains, but it is present in all pathogenic strains⁽¹⁰⁾.

The purpose of this goat model study was to evaluate whether the Multiplex PCR diagnostic

un producto de 200 pb. La secuencia ET2 forma parte del extremo 3' de la secuencia RD1 y al unirse los iniciadores ET2 y ET3 con el ADN de las cepas virulentas que sí presentan la región RD1, se obtiene un producto de amplificación de 150 pb, por lo que este segmento se encuentra ausente en todas las cepas de *M. bovis* BCG, pero es conservado en las cepas patógenas⁽¹⁰⁾.

El objetivo de este trabajo fue evaluar, en un modelo caprino, si la prueba diagnóstica de PCR-Multiplex puede diferenciar animales vacunados con BCG, de animales infectados con una cepa de campo de *M. bovis*.

Se trabajó con 24 cabritos de una semana de edad, adquiridos de un hato negativo a tuberculosis y paratuberculosis. Las muestras correspondieron a tres grupos: Grupo 1 con 10 animales, desafiado con una cepa de *M. bovis* patógena, el Grupo 2, con 10 animales, vacunado con *M. bovis* BCG y posteriormente desafiado con una cepa de *M. bovis* patógena, y Grupo 3 con cuatro animales, sólo vacunado con *M. bovis* BCG. Se vacunaron 14 animales (grupos 2 y 3) a la semana de edad en el pliegue del cuello con una dosis de 0.1 ml (300×10^3 unidades formadoras de colonia, ufc) de la vacuna BCG (cepa Danesa, Gerencia General de Biológicos y Reactivos, Secretaria de Salubridad y Asistencia), y a 10 animales (Grupo 1) se les aplicó solución salina fisiológica.

Los animales de los grupos 1 y 2 se desafiaron a los 150 días de edad con una dosis de 5×10^2 ufc, por vía intratraqueal con una cepa de *M. bovis* que se aisló de un linfonodo mediastínico de un bovino tuberculoso, y que pertenece al cepario del CENID-Microbiología. Los animales se sacrificaron a los nueve meses de edad. Se trabajaron las muestras de sangre y de moco nasal obtenidas dos veces antes del desafío, con intervalos de una semana, así como las obtenidas a los 8, 15, 30, 60 y 90 días después del desafío.

Las muestras de moco nasal se obtuvieron de los dos pasajes nasales de cada animal con aplicadores de algodón y se colocaron en tubos individuales; posteriormente se rehidrataron con 500 ml de agua

technique can differentiate between BCG-vaccinated animals and animals infected with a *M. bovis* field strain.

Twenty four 1-week-old goats from a TB-/paratuberculosis-negative herd were used. Animals were distributed among three groups: Group 1 (n=10) was challenged with a pathogenic *M. bovis* strain; Group 2 (n=10) was vaccinated with *M. bovis* BCG, then challenged with a pathogenic *M. bovis* strain; and Group 3 (n=4) only received the *M. bovis* BCG vaccine. Fourteen animals (Groups 2 and 3) were vaccinated at 1 wk of age in the neck fold, with one 0.1 ml dose (300×10^3 colony-forming units, CFU's) of the BCG vaccine (Danish strain, General Administration, Biologics and Reagents, Mexico's Secretariat of Health [SSA]), while 10 animals (Group 1) received physiologic saline.

Animals in Groups 1 and 2 were challenged at 15 d of age with 5×10^2 CFU's, of a *M. bovis* strain isolated from the mediastinal lymph node of a TB-positive cow. This isolate is a member of CENID-Microbiología's strain collection. Animals were killed at the age of 9 mo. Blood and nasal mucus samples were obtained twice prior to challenge—one week apart—as well as at 8, 15, 30, 60, and 90 d after challenge.

Mucus swabs were obtained from the nasal passages of each animal, and then placed in individual tubes. Swabs were then re-hydrated with 500 ml sterile distilled water, vortexed, and centrifuged at 300 xg for 10 min. Sterile materials were used for all these steps. Blood samples were obtained by jugular vein puncture into 10 ml vacutainer tubes containing an anticoagulant. Blood samples were analyzed by both culture and PCR no later than one hour after sampling.

Blood and nasal mucus samples were decontaminated using 0.3% Zefiran for 10 min, and centrifuged at 300 xg for 10 min; the supernatant was poured and the sediment was cultured in duplicate on Stonebrink's medium⁽¹¹⁾. Organ samples obtained at *postmortem* were macerated, digested, and decontaminated with 0.5

destilada estéril, se agitaron en un vortex y se centrifugaron a 300 xg durante 10 min, todos estos pasos se hicieron con el material estéril. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena yugular en tubos vacutainer de 10 ml con anticoagulante; ambas muestras se trabajaron para cultivo bacteriológico y PCR, en un periodo no mayor de una hora después de haberse obtenido.

Las muestras de sangre y moco nasal se descontaminaron con 3 ml de Zefirán al 0.3% durante 10 min, se centrifugaron a 300 xg durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el sedimento se sembró por duplicado en medio de Stonebrink⁽¹¹⁾. Las muestras de órganos obtenidas en la necropsia, se maceraron, se digirieron y se descontaminaron con NaOH 0.5 N y HCl 6.0 N. Se centrifugaron a 300 xg durante 20 min, los sedimentos se inocularon en medio de Stonebrik adicionado con piruvato de sodio; se incubaron a 37 °C y se inspeccionaron semanalmente. Las colonias sospechosas se identificaron por las pruebas bioquímicas de producción de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis del Tween 80, crecimiento en isoniacida (INH) y pirazinamida y sensibilidad a la hidrazida del ácido tiofén 2 carboxílico (TCH)⁽¹¹⁾. Los cultivos se consideraron negativos si no se observaron colonias de *M. bovis* después de tres meses.

A todos los animales se les aplicó la prueba de la tuberculina a los dos meses de edad y después del desafío, a los seis y nueve meses de edad. Los animales se inocularon con 0.1 ml (1 mg/ml) de derivado proteico purificado bovino (PPD, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios), en el pliegue caudal derecho. Los resultados prueba se determinaron por el aumento del grosor del pliegue, la lectura se realizó a las 72 h de la inoculación.

La diferenciación de la cepa de campo de *M. bovis* y la cepa BCG de la vacuna, se realizó con la prueba de PCR-Multiplex, a partir de la extracción de ADN de las muestras de sangre y moco nasal obtenidas en los animales vivos, en las muestras de órganos en fresco obtenidas en la necropsia y en las cepas obtenidas en los cultivos bacteriológicos

N NaOH and 6.0 N HCl, then centrifuged at 300 xg for 20 min. Sediment was inoculated into sodium pyruvate-added Stonebrik's medium. Cultures were incubated at 37 °C, and inspected on a weekly basis. Suspicious colonies were identified by biochemical tests (niacin production, nitrate reduction, Tween 80 hydrolysis, growth on isoniazid (INH) and pyrazinamide, and sensitivity to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH)⁽¹¹⁾. Cultures were considered as negative if no *M. bovis* colonies were observed after 3 mo.

All animals were subjected to the tuberculin test at 2 mo of age, and again after challenge at 6 and 9 mo of age. Animals were inoculated with 0.1 ml (1 mg/ml) bovine purified protein derivative PPD, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, (Mexico's National Veterinary Biologic Producer, a government's manufacturing facility) in the right caudal fold. Test results were determined by reading fold thickness at 72 h after inoculation.

Differentiation between *M. bovis* field strain and BCG vaccine strain was performed by the Multiplex PCR test, using blood/nasal mucus DNA extracts from live animals, fresh organ samples obtained at necropsy, and culture isolates from the same organ samples. DNA was obtained using the method described by Van Soolingen *et al.*⁽¹²⁾ Isolates were heat-inactivated (80 °C) for 30 min, and mycobacteria were fractionated using lysozyme (10 mg/ml) and proteinase K (10 mg/ml). DNA was purified with 5M sodium chloride (NaCl), and 10% ammonium hexadecyl-trimethyl bromide (CTAB). DNA was extracted with chloroform/isoamyl alcohol, and then precipitated with absolute isopropanol. DNA was washed with 70% ethyl alcohol, followed by absolute alcohol, and then re-suspended in 50 µl Milli-Q water. DNA was quantified measuring absorbance at 260 nm, visualized in agarose gels, and stored at -20 °C until used. DNA amplification was performed in accordance with the technique described by Talbot *et al.*⁽⁹⁾, using 5 ml sample (20 ng/ul DNA) in a total volume of 50 ml PCR mix containing 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 0.001% gelatin, 2 mM MgCl₂, 200 mM of each deoxynucleotide, 1.25 U *Taq* polymerase, 25 picomoles (pmol) ET2 primer (5' CGT GCT ATA

de estas mismas muestras. El ADN se obtuvo utilizando el método descrito por Van Soolingen *et. al.*⁽¹²⁾. Las cepas se inactivaron con calor a 80 °C durante 30 min, las micobacterias se fraccionaron con lisozima (10 mg/ml) y proteinasa K (10 mg/ml), el ADN se purificó con cloruro de sodio (NaCl) 5M y hexadeciltrimetil-bromuro de amonio (CTAB) al 10%. El ADN se extrajo con cloroformo/alcohol isoamílico y se precipitó con isopropanol absoluto. Se lavó con alcohol etílico al 70% y con alcohol absoluto y se resuspendió en 50 ml de agua MiliQ. El ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, se visualizó en geles de agarosa y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La amplificación del ADN se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Talbot *et. al.*⁽⁹⁾, utilizando 5 ml de muestra (20 ng/ul de ADN) en un volumen total de 50 ml de mezcla de PCR que contenía 10 mM de Tris HCl, 50 mM KCl, 0.001 % de gelatina, 2 mM MgCl₂, 200 mM de cada desoxinucleótido, 1.25 U de *Taq* polimerasa, 25 picomoles (pmol) de iniciador ET2 (5' CGT GCT ATA TTC CTG GGC CCGG 3') y 5 pmol de ET1 (5' AAG CGG TTG CCG CCG ACC GACC 3') y ET3 (5' GAG GCG ATC TGG CGG TTT GGGG 3'), respectivamente. Las muestras se sometieron a 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, alineación a 65 °C por un minuto y extensión a 72° C por 4 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 4 min en un termociclador (Perkin-Elmer).

Como testigos se utilizaron los ADN de las cepas de referencia *M. bovis* AN5 (ATCC 35726), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. tuberculosis* H37RV (ATCC 25618), *M. bovis* BCG (cepa Pasteur, ATCC 35734), *M. bovis* (cepa Danesa, vacuna elaborada por la Productora Nacional de Biológicos, Secretaría de Salubridad y Asistencia), *M. microti* (ATCC 35782), dos cepas de campo patógenas de *M. bovis*, aisladas e identificadas en el laboratorio del CENID-Microbiología que correspondieron al Complejo *M. tuberculosis* y las cepas de *M. kansasii* (ATCC 1561) y *M. avium* (ATCC 25291). Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron con bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

TTC CTG GGC CCGG 3'), 5 pmol ET1 (5' AAG CGG TTG CCG CCG ACC GACC 3'), and ET3 (5' GAG GCG ATC TGG CGG TTT GGGG 3'), respectively. Samples were subjected to 94 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturalization at 94 °C for 30 sec, annealing at 65 °C for 1 min, extension at 72 °C for 4 min, and a final extension cycle at 72 °C for 4 min in a thermocycler (Perkin-Elmer).

DNA from *M. bovis* AN5 reference strain (ATCC 35726), *M. bovis* (ATCC 19210), *M. tuberculosis* H37RV (ATCC 25618), *M. bovis* BCG (Pasteur strain, ATCC 35734), *M. bovis* (Danish strain, vaccine manufactured by ProNaBiVe, SSA), *M. microti* (ATCC 35782), two pathogenic *M. bovis* field strains isolated and identified by CENID-Microbiología's laboratory corresponding to the *M. tuberculosis* complex, and the *M. kansasii* (ATCC 1561), and *M. avium* (ATCC 25291) strains were used as controls. Amplification products were separated in 2% agarose gels, then visualized using ethidium bromide in an ultraviolet (UV) light transilluminator.

Animals were killed using a piston gun, and the sub-maxillary, retropharyngeal, bronchial, mediastinal, gastro-hepatic, mesenteric, pre-sternal, pre-scapular popliteal, iliac, and parotid lymph nodes showing gross lesions were harvested⁽¹³⁾. These lymph nodes contained light yellow, caseous material, surrounded by a fibrous capsule. Lymph nodes showing increased size but no apparent lesions were also collected.

Only the 14 vaccinates showed positive tuberculin reactions at 2 and 6 mo of age. When the tuberculin test was performed at 9 mo of age, all 10 animals in Group 2 (vaccinated/challenged), all 4 animals in Group 3 (vaccinated), and 9 out of the 10 animals in Group 1 showed positive tuberculin reactions. The reminder animal in Group 1 showed a negative tuberculin reaction at 9 mo of age.

Blood and nasal mucus cultures were negative in all groups, at all times. Lymph node and lung lesions from Groups 1 and 2 yielded positive cultures identified only as the *M. bovis* challenge

Los animales se sacrificaron con una pistola de pernos y se obtuvieron los linfonodos submaxilares, retrofaríngeos, bronquiales, mediastínicos, gastrohepáticos, mesentéricos, preesternales, preescapulares poplíteos, ilíacos y parótidos con lesiones macroscópicas⁽¹³⁾, que consistieron de material amarillo pálido, caseoso, rodeadas de una cápsula de tejido fibroso, también de los linfonodos aumentados de tamaño, sin lesiones aparentes.

Sólo los 14 animales vacunados reaccionaron a la prueba de la tuberculina realizada a los dos y seis meses de edad. Cuando se aplicó la tuberculina a los nueve meses de edad, reaccionaron los 10 animales del Grupo 2 (vacunados y desafiados) y los 4 del Grupo 3 (vacunados), del Grupo 1 reaccionaron 9 y un animal no reaccionó a la tuberculina.

El resultado obtenido en el cultivo bacteriológico de sangre y moco nasal fue siempre negativo en todos los grupos. En las muestras de linfonodos y pulmón de los grupos 1 y 2, se aisló e identificó solamente la cepa de desafío *M. bovis* de los órganos con lesiones. Este resultado fue corroborado con la PCR-Multiplex, ya que sólo se observó amplificación del ADN de *M. bovis*. De los linfonodos aumentados de tamaño sin lesiones aparentes no se obtuvo ningún aislado. En el Grupo 3 no hubo aislamientos y tampoco se observó amplificación de ADN (Cuadro 1).

Se obtuvieron productos de 150 pb en las siguientes cepas utilizadas como controles: *M. tuberculosis*,

strain. This result was further supported by the Multiplex PCR test, since only amplification of *M. bovis* DNA was observed. No isolates were obtained from the size-increased lymph nodes with any lesions. Group 3 yielded no isolates or DNA amplification (Table 1).

One hundred and fifty (150) bp products were obtained with the following control strains: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, and *M. microti*, as well as from the pathogenic *M. bovis* strains. Two hundred (200) bp products were obtained with the *M. bovis* BCG (Danish and Pasteur) strains. These strains corresponded to the *M. tuberculosis* complex. No amplification products with *M. avium* or *M. kansasii* strains were obtained (Figure 1). No DNA amplification was observed in any of the blood or nasal mucus samples obtained before challenge. Nevertheless, one 150 bp amplification product was obtained with the DNA of 4/10 (40 %) nasal mucus samples from animals in Group 1 obtained on d 60, and 6/10 (60 %) animals in Group 1 on d 90 after challenge (Figure 2). This amplification product was not observed in any of the other groups. All blood samples yielded negative DNA amplification results. Organ sample cultures from Groups 1 and 2 only showed DNA amplification corresponding to the *M. bovis* field strain. None of the amplification products corresponded to the *M. bovis* BCG strain. With these results it can be concluded that using the Multiplex PCR on biologic samples (i.e. nasal mucus) allowed for the rapid,

Cuadro1. Resultados obtenidos en el cultivo bacteriológico y PCR en animales vacunados con BCG y desafiados con *Mycobacterium bovis* de campo

Table 1. Bacterial culture/PCR results with BCG vaccinated-/*Mycobacterium bovis* field strain-challenged animals

	Organ samples		<i>M. bovis</i> -positive PCR**	BCG-positive PCR**
	positive to <i>M. bovis</i> culture*	positive to BCG culture*		
Non vaccinated/challenged	9/10+	0	6/10	0
Vaccinated/challenged	10/10	0	0	0
Vaccinated	0/4	0	0	0

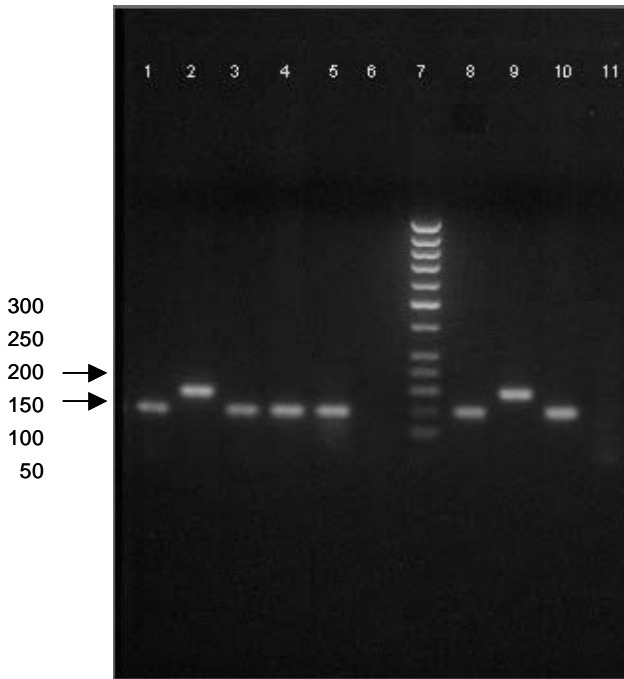
* Pulmonary lymph nodes collected at necropsy.

**Nasal mucus samples obtained from live animals, 90 d post-challenge.

+One animal in this group was apparently not challenged.

Figura 1. Resultados obtenidos con el ADN genómico de diferentes cepas de micobacterias utilizadas como controles en la PCR-Multiplex

Figure 1. Results obtained with the genomic DNA from different mycobacterium strains used as controls in the Multiplex PCR test

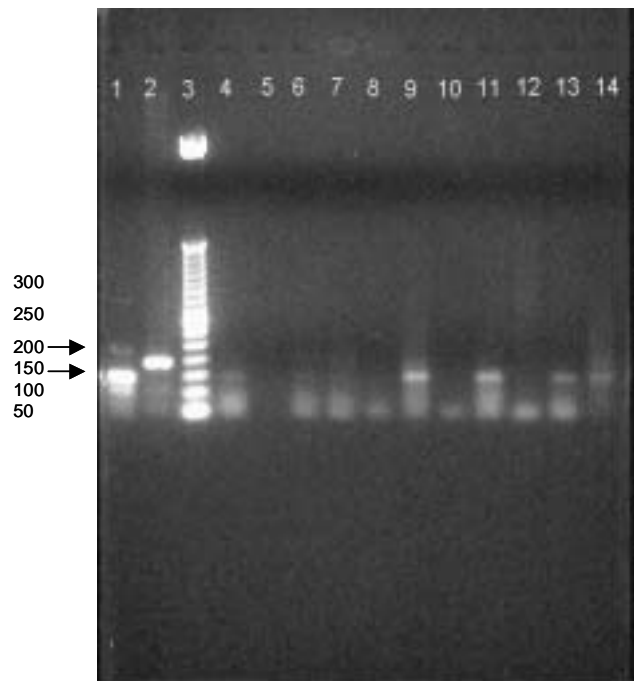


Lane 1) *M. tuberculosis* strain H37Rv 2) *M. bovis*-BCG Danish strain 3) *M. bovis* AN5 strain 4) *M. microti* 5) *M. bovis* ATCC 19210; 6) *M. kansasii* ATCC 1561; 7) molecular weight marker; 8) *M. bovis* field strain; 9) *M. bovis*-BCG Pasteur strain; 10) *M. bovis* field strain; 11) *M. avium* ATCC 25291.

M. bovis, *M. microti*, y en las cepas de *M. bovis* patógenas y de 200 pb en las cepas de *M. bovis* BCG (cepa Danesa y cepa Pasteur) que se evaluaron. Estas cepas correspondieron al Complejo *M. tuberculosis*. No se observó ningún producto de amplificación en las cepas de *M. avium* y *M. kansasii* (Figura 1). En ninguna de las muestras de moco nasal y sangre obtenidas antes del desafío se observó amplificación del ADN; sin embargo, se obtuvo un producto de amplificación de 150 pb con el ADN de las muestras de moco nasal de cuatro (40 %) de los animales del Grupo 1, obtenidas en el día 60 y en seis (60 %) animales del mismo

Figura 2. Resultados obtenidos en el día 90 posdesafío por medio de la PCR-Multiplex de ADN genómico de muestras de moco nasal de animales vacunados con *M. bovis*-BCG y desafiados con *M. bovis* y solamente desafiados con *M. bovis*

Figure 2. Results obtained on day 90 post-challenge using the Multiplex PCR test on genomic DNA from nasal mucus samples from *M. bovis*-BCG vaccinated-/*M. bovis*-challenged animals, and from those that were only challenged with *M. bovis*



Lane 1) *M. bovis* AN5 Control, 150 bp 2) *M. bovis*-BCG Control, 200 bp 3) Molecular weight marker; 4) challenged; 5-8) vaccinated/challenged 9-11) challenged; 12) vaccinated/challenged; 13-14) challenged.

reliable differentiation between pathogenic *M. bovis* strain and the *M. bovis* BCG strain used in the manufacturing of the TB vaccine. This finding can be relevant for TB follow up activities not only on necropsy samples, but also in live animals. The negative results obtained with both the Multiplex PCR and bacterial culture with nasal mucus and blood samples from Group-2 animals, support the idea that vaccination prevents the shedding of the bacterium from the primary focus, and above all, that the BCG vaccine does not shed by these routes.

grupo, en el día 90 posdesafío (Figura 2), amplificación que no se observó en ninguno de los otros grupos. Los resultados fueron negativos para la amplificación del ADN en todas las muestras de sangre. En los cultivos bacteriológicos de las muestras de órganos de los grupos 1 y 2, sólo se observó amplificación del ADN de la cepa de *M. bovis* de campo. Ninguno de los productos de amplificación correspondió a la cepa de *M. bovis* BCG.

Con los resultados obtenidos se concluye que al emplear la PCR-Multiplex en muestras biológicas como moco nasal, pudo diferenciarse de forma rápida y confiable la cepa de *M. bovis* patógena de la cepa de *M. bovis* BCG que se emplea en la elaboración de la vacuna contra la tuberculosis. Este hecho sería importante para dar seguimiento a la enfermedad en animales vivos, y no solamente en muestras de animales obtenidas en la necropsia.

Los resultados negativos obtenidos en la PCR-Multiplex y cultivo bacteriológico de las muestras de moco nasal y sangre del Grupo 2 refuerzan la idea de que la vacunación previene la diseminación del bacilo del foco primario, y sobre todo que la vacuna BCG no se elimina por estas rutas, lo que sería muy importante para el diagnóstico de la enfermedad. Lo anterior se apoya en que la vacunación previene la diseminación del bacilo del foco primario de infección, aparentemente porque inhibe la fase bacilémica de la infección^(14,15,16). Por otro lado, las regiones RD han sido sólo descritas en *M. bovis* BCG, *M. bovis* y *M. tuberculosis*^(10,17), mencionándose que la región RD1 está ausente en todas las subcepas de la vacuna BCG, lo que la convierte en un marcador genético capaz de diferenciar cepas vacunales de BCG de cepas virulentas del Complejo tuberculosis y de las cepas de rápido crecimiento; este hecho se observó en el presente trabajo, ya que no hubo ningún producto de amplificación en las cepas de *M. avium* y *M. kansasii*. La respuesta a la tuberculina fue la esperada^(4,5), ya que los animales reaccionaron positivos una vez en contacto con las micobacterias, independientemente de que fuera la cepa *M. bovis* de desafío o la cepa *M. bovis* BCG, lo que pone de manifiesto la importancia de contar con una

This would be extremely important for the diagnosis of the disease. This is based on the fact that vaccination prevents *M. bovis* spread from the primary infection focus, apparently because it inhibits the mycobacteremic phase of the infection^(14,15,16). On the other hand, RD regions have only been described in *M. bovis* BCG, *M. bovis*, and *M. tuberculosis*^(10,17), and it has been stated that the RD1 region is missing in all BCG vaccine sub-strains, making it a genetic marker that allows for the differentiation of BCG vaccine strains from virulent strains in the TB complex, and from those with rapid growth. This fact was observed in this research, since no amplification was observed whatsoever in the *M. avium* or *M. kansasii* strains. Tuberculin reactions were as expected^(4,5), since animals showed positive reactions after being in contact with mycobacteria (either the *M. bovis* challenge strain or the *M. bovis* BCG strain). This shows the relevance of having a differential test allowing distinguishing between vaccinated and infected animals.

Results described herein emphasize the potential of using the Multiplex PCR as a differential diagnostic tool, together with the advantage of detecting mycobacteria in nasal secretions.

Multiplex PCR sensitivity was considered as good (60%) when performed with DNA samples from Group 1 nasal mucus, since the reduced number of mycobacteria found in the sample was enough to obtain a positive PCR result, at least in 6 samples, while this was not sufficient for a positive culture. It should also be considered that the shedding pattern of the bacterium can be different for each animal. In addition, most naturally-infected animals show limited pathology and scarce nasal shedding of the mycobacteria^(19,20,21). One limiting factor present when the technique is performed with DNA from biologic samples (nasal mucus, blood), is that the genetic material obtained also contains DNA from eucariotic cells, and this can result in the formation of non-specific products (lanes 6 and 7, Figure 2). Nevertheless, the difference of these non-specific products is extremely evident with the specific amplification observed in Group 1 animals (lanes 9,11,13,14, Figure 2).

prueba diferencial que permita distinguir animales vacunados de infectados.

Los resultados descritos respaldan el potencial que tiene el empleo de la PCR-Multiplex como método de diagnóstico diferencial, así como la ventaja de detectar micobacterias en las secreciones nasales.

La sensibilidad que se obtuvo con la PCR-Multiplex realizada a partir de las muestras de ADN de moco nasal del Grupo 1 (60 %), se considera buena, ya que el escaso número de bacilos contenido en la muestra fue suficiente para obtener un resultado positivo por PCR por lo menos en seis de las muestras, aunque no fue suficiente para el cultivo bacteriológico (0/10). Debe considerarse también que el patrón de excreción del bacilo puede ser diferente para cada animal, además de que la mayor parte de los animales infectados naturalmente exhiben una patología limitada y una escasa excreción nasal de la micobacteria^(19,20,21).

Una limitante que se presenta cuando se emplea la técnica con ADN de muestras biológicas (moco nasal, sangre) es que el material genético obtenido también contiene ADN de células eucariotas, lo que puede ocasionar la formación de productos inespecíficos (carriles 6 y 7 de la Figura 2), sin embargo, es muy evidente la diferencia de estos productos inespecíficos con la amplificación específica observada en los animales del Grupo 1 (carriles 9, 11, 13 y 14 de la Figura 2).

Finalmente, la utilización del modelo caprino, para la evaluación de los métodos de diferenciación de animales vacunados de animales infectados, representó menores costos y mayor facilidad en el manejo de los animales que con el uso de bovinos. Recientemente se demostró que este modelo reproduce muy bien la enfermedad⁽¹⁸⁾, por lo que su uso debería considerarse en los programas de evaluación de vacunas contra tuberculosis bovina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por CONACYT. No. de referencia 28634-B.

Finally, using a goat model to evaluate differentiation methods between vaccinated and infected animals resulted in reduced cost/easier animal management, as compared to cattle models. It was recently demonstrated that this model allows for good disease reproducibility⁽¹⁸⁾. The use of a goat model should be considered in bovine TB vaccine evaluation programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially funded by CONACYT (Mexico's National Science and Technology Council). Reference No. 28634-B.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Haring CM, Traum J, Hayes FM, Henry BS. Vaccination of calves against tuberculosis with Calmette-Guerin culture BCG. *Hilgardia* 1930;4:307-394.
2. Waddington FG, Ellwood DC. An experiment to challenge the resistance to tuberculosis BCG vaccinated cattle in Malawi. *British Vet J* 1972;128:541-551.
3. Berggren SA. Field experiment with BCG vaccine in Malawi. *British Vet J* 1981;137:88-94.
4. Hart P, Sutherland I, Thomas J. The immunity conferred by effective BCG and vole bacillus in relation to individual variations in induced tuberculin sensitivity and to technical variations in the vaccines. *Tubercle* 1967;48:201-210.
5. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, Mc Cormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 1991;68:286-290.
6. Buddle BM, Parlange NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:1-5.
7. Vordemeier HM, Cockle PC, Whelan A, Rodees S, Palmer N, Bakker D, Hewinson RG. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis*-BCG and *M. bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:675-682.
8. 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.

9. Talbot AE, Williams LD, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis*-BCG. *J Clin Microbiol* 1997;35:566-569.
10. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis*-BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274-1282.
11. Payeur BJ, Jarnagin LJ, Marquardt GJ, Schaper AL, Martin MB. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of *Mycobacteria*. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. NSLV, Ames, Iowa. 1993.
12. Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. Manual for RFLP analysis of mycobacteria strains. National Institute of Public Health and Environmental Protection; Bilthoven, The Netherlands. 1989.
13. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet Microbiol* 1994;40:53-56.
14. Hall JG, Smith ME. Homing of lymph-borne immunoblast to the gut. *Nature* 1970;226:262-263.
15. Wiegshauss EH, Smith DW. Evaluation of the protective potency of new tuberculosis vaccines. *Rev Infect Dis* 1989;11:S484-S490.
16. McCorry TP, McNair J, Skuce A, Pollock JM, Neill SD. Investigation into nasal shedding of *Mycobacterium bovis* from calves infected experimentally with bovine tuberculosis. Fifth international conference on the pathogenesis of mycobacterial infections. Abstract Book. Saltsjobaden, Stockholm, Sweden. 2002.
17. Brosch R, Gordon VS, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole TS. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;290:143-152.
18. Ramirez IC, Santillan MA, Dante V. The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection. *Small Rumin Res* 2003;47:113-116.
19. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-Cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000;160:92-106.
20. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microb* 1994;40:41-52.
21. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001;81(1/2):79-86.