

***Mycobacterium bovis* induce una respuesta inmune celular heterogénea en bovinos infectados naturalmente**

Naturally *Mycobacterium bovis* infected cattle evoked heterogeneous cellular immune responses

Ariel Deliler Sánchez López^a,

Susana Flores Villalva^b,

José Ángel Gutiérrez Pabello^{a*}

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.

^b CENID Fisiología, INIFAP. México.

*Autor de correspondencia: jagp@unam.mx

● **Resumen:**

Los macrófagos son considerados uno de los principales mecanismos de resistencia a las infecciones micobacterianas. Además, datos experimentales y clínicos indican que el IFN- γ es esencial para la defensa contra *Mycobacterium tuberculosis*. El objetivo de este estudio fue identificar la capacidad de los macrófagos para controlar el crecimiento intracelular de *Mycobacterium bovis* y su relación con la producción de IFN- γ en ganado naturalmente infectado con *M. bovis*. Se evaluó la capacidad de los macrófagos derivados de monocitos obtenidos de sangre periférica de bovinos naturalmente infectados. Además, se midió la producción de IFN- γ producida en respuesta al Derivado proteico purificado bovino (PPDB por sus siglas en inglés) y coctel proteico ESAT-6+CFP-10. Los resultados muestran una variación en la susceptibilidad a *M. bovis* de los bovinos estudiados. Se observó un rango de porcentaje de sobrevivencia de *M. bovis* BCG del 80 a 150 % en macrófagos provenientes de bovinos naturalmente infectados, mientras que la producción de IFN- γ hacia el PPDB y coctel proteico fue de 2.5 y 2.0 índice de densidad óptica, respectivamente. Aunque los datos no demostraron una correlación entre la susceptibilidad del hospedador a *M. bovis* y la producción de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con este patógeno, no se descarta

la hipótesis de que las limitaciones en el funcionamiento de los macrófagos y los linfocitos T desempeñan un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad.

● **Palabras clave:** IFN- γ , Macrófagos, *Mycobacterium bovis*, PPDB, Coctel proteico.

● **Abstract:**

Macrophages are considered one of the main immune mechanisms of resistance to mycobacterial infections. In addition, experimental and clinical data indicate that IFN- γ is essential for host defence against *M. tuberculosis*. The aim of this study was to identify macrophage capacity on controlling *Mycobacterium bovis* infection and lymphocyte IFN- γ production from cattle naturally exposed to *M. bovis*. Peripheral blood monocyte-derive macrophages from naturally infected cattle were evaluated for their ability to control the intracellular growth of *M. bovis* BCG. Besides, whole blood cells were stimulated with PPDB and ESAT-6+CFP-10 protein cocktail. Results show a disparity in host susceptibility to *Mycobacterium bovis*. A *M. bovis* BCG survival rate of 80 to 150 % in macrophages from naturally infected cattle was observed. While the IFN- γ production towards Purified protein derivative bovine (PPDB) and the protein cocktail was 2.5 and 2.0 optic density index, respectively. Though our data do not support a correlation between the host susceptibility to *M. bovis* and the production of IFN- γ in naturally infected cattle, the hypothesis that the limitations in the functioning of macrophages and T lymphocytes play a very important role in the spread of the disease cannot be discarded.

● **Key words:** IFN- γ , Macrophages, *Mycobacterium bovis*, PPDB, Protein cocktail.

Recibido el 2/12/2016.

Aceptado el 22/03/2017.

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad transmisible y crónica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas causada por *Mycobacterium bovis*⁽¹⁾. Ésta es una de las enfermedades más importantes en la industria pecuaria al ocasionar graves pérdidas económicas, y representar una barrera para la comercialización del ganado y sus subproductos; además de constituir un riesgo para la salud humana⁽²⁾. La incidencia actual de la infección por *M. bovis* en humanos es subestimada⁽³⁾, pero se cree que el número de casos de tuberculosis en humanos asociada a *M. bovis* es del 3 al 13 %⁽⁴⁾. No obstante, algunos reportes muestran porcentajes mayores; por ejemplo, en un análisis retrospectivo de casos de tuberculosis en una comunidad binacional en San Diego California de 1994 a 2005, se

identificó a *M. bovis* en 45 % de los casos en niños y 6 % de adultos, lo que demuestra que *M. bovis* puede representar un gran riesgo para la salud pública⁽⁵⁾.

En las infecciones por tuberculosis en humanos y bovinos existe una compleja interacción huésped-patógeno; muchos estudios han demostrado que las células T CD4, CD8 y $\gamma\delta$ están implicadas en el progreso de la infección, siendo de particular importancia el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1, donde el IFN- γ tiene un papel significativo en la contención bacteriana a través de la activación de los macrófagos^(1,6). Datos experimentales y clínicos indican que el IFN- γ es esencial para la defensa del huésped contra *M. tuberculosis*, por lo que los defectos en la producción de IFN- γ se consideran un factor de riesgo para la infección por *M. tuberculosis* y la progresión de la enfermedad en humanos⁽⁷⁾. En bovinos infectados experimentalmente con *M. bovis*, se observó que la principal población celular productora de IFN- γ son los linfocitos T CD4⁺ de memoria, aunque los linfocitos T CD8⁺ también han sido identificados como productores importantes de esta citocina⁽⁸⁾. Las citocinas proinflamatorias IL-12, IL-18, IL-23 producidas por los macrófagos inducen la activación de los linfocitos T, estimulando así la síntesis de IFN- γ , el cual a su vez activa a los macrófagos para producir TNF- α . Los macrófagos así activados limitan el crecimiento de bacterias intracelulares a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y además contribuyen en el mantenimiento del granuloma^(9,10). Sin embargo, el papel del macrófago en la tuberculosis es una enigmática dicotomía. Por un lado es la célula huésped de la micobacteria; y por el otro, es la célula efectora para el control y destrucción de dicho patógeno⁽¹⁰⁾. Esta célula es capaz de inhibir el desarrollo del bacilo mediante la fagocitosis y de participar ampliamente en la inmunidad celular, en el proceso de presentación de antígeno y el reclutamiento de linfocitos T^(6,10). De hecho, los macrófagos son considerados como uno de los principales mecanismos inmunes de resistencia. En este aspecto, después de una infección bacteriana se puede observar que una proporción de animales resisten la infección, mientras que otros desarrollan la enfermedad⁽¹¹⁾; fenotipo asociado con la actividad oxidativa y bacteriostática de los macrófagos⁽¹²⁾. En el caso de infecciones con *M. bovis* el control al crecimiento intracelular es dependiente de la virulencia bacteriana^(13,14).

La importancia de las poblaciones de macrófagos y linfocitos T en la tuberculosis bovina se ha estudiado principalmente en ganado infectado experimentalmente⁽⁸⁾, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar la capacidad de los macrófagos en el control de la infección por *M. bovis* y la producción de IFN- γ de los linfocitos en bovinos naturalmente infectados con este patógeno.

Los animales que se seleccionaron para el presente estudio provenían de una explotación intensiva de bovinos especializados en la producción lechera de la raza Holstein, con una prevalencia de TBB estimada >25 %. Dicho hato se seleccionó debido a la evidencia clínica, patológica y bacteriológica de la presencia de *M. bovis* reportada en dictámenes oficiales. Con estos antecedentes, se consideró que los animales evaluados estaban naturalmente infectados con *M. bovis*. Los bovinos utilizados en esta investigación tenían una edad

promedio de 3.5 años. Se seleccionaron solamente 11 bovinos que fueron reactores positivos en la prueba de tuberculina doble comparativa, la cual se realizó e interpretó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana contra la Tuberculosis Bovina (NOM 031-Z00-1995). Para evitar la interferencia que se podría ocasionar en la interpretación de los resultados se evitó la evaluación de animales PPDB negativos, que podrían ser anérgicos.

Se obtuvieron muestras de sangre en tubos con heparina de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA) de todos los animales para evaluar la producción de IFN- γ a través del kit comercial Bovigam (Prionics, Schlieren-Zurich, Suiza). Las muestras de sangre se transportaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y se procesaron durante las primeras 10 h de haberse obtenido. El estímulo de las células se hizo utilizando placas para cultivo celular de 96 pozos, empleando 250 μ l de sangre; las células se incubaron por duplicado con PPD aviar (PPDA) (10 μ g/ml), PPD bovino (PPDB) (10 μ g/ml), coctel proteico ESAT-6 y CFP-10 (E6-C10) (4 μ g/ml), mitógeno (1 μ g/ml) (Pokeweed, Sigma Aldrich, CA, EE.UU.) y se incluyó un control sin antígeno. Los cultivos se incubaron durante 20 h en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada a 37 °C. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 824 xg por 20 min a 4 °C y se depositaron en placas de 96 pozos nuevas, las cuales se almacenaron a -20 °C para la posterior evaluación de la producción de IFN- γ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron usando un índice de densidad óptica (IDO) que se define como el radio de la DO de los cultivos estimulados con un antígeno entre la DO de cultivos estimulados sin antígeno. Para todos los antígenos probados se seleccionó un valor IDO ≥ 2 como punto de corte para indicar un resultado positivo⁽¹⁵⁾. Para confirmar la infección por *M. bovis* en los bovinos, se identificó el material genómico de la micobacteria en las muestras de exudado nasal, las cuales se colectaron utilizando hisopos estériles sumergidos en 2 ml de PBS 1x estéril. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12,000 xg durante 10 min y los sedimentos nasales se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento. El ADN del exudado nasal se extrajo de acuerdo a un método descrito para micobacterias⁽¹⁶⁾ adaptado previamente⁽¹⁷⁾. La calidad y concentración del ADN se evaluaron por espectrofotometría empleando un Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, DE. USA). Posteriormente se realizó una PCR como se describió previamente para amplificar una región del gen *mpb70* del complejo *M. tuberculosis* y el gen *cyb*, que codifica el citocromo b del bovino para descartar la presencia de inhibidores de la PCR^(17,18).

El análisis de la capacidad microbicida de los macrófagos bovinos se realizó mediante un ensayo bactericida. Los macrófagos derivados de monocitos se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por Esquivel-Solís *et al*⁽¹⁹⁾. Estos se infectaron con la cepa *M. bovis* BCG Danesa durante 4 h a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 bacterias por macrófago y se centrifugaron a 200 xg durante 10 min. El ensayo bactericida de macrófagos se realizó con 1x10⁴ células por pocillo en placas Nunc Mini (Nalge Nunc International, Rochester, NY, EE.UU.). Los macrófagos obtenidos de cada animal se colocaron por triplicado, como control

negativo se incluyeron tres pocillos con macrófagos no infectados. Después de 4 h, las bacterias no fagocitadas se eliminaron mediante cuatro lavados con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute media). Se evaluó el crecimiento intracelular de las micobacterias después de 24 h de infección; las células fueron lisadas con Tween 20 al 0.5%, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión celular y se cultivaron en placas con medio Middlebrook 7H11 a 37 °C durante cuatro semanas para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC). La supervivencia intracelular micobacteriana se calculó dividiendo el número de UFC al final del ensayo (24 h) por el número de UFC al inicio del ensayo (0 h) expresado como porcentaje⁽¹³⁾.

Cada experimento se realizó por triplicado independientemente, y los resultados se expresaron como la media en porcentaje. Las comparaciones entre medias se analizaron mediante la prueba de ANOVA. La correlación entre la susceptibilidad y la producción de IFN- γ se evaluó mediante la prueba de correlación de Pearson. Los análisis se llevaron a cabo con el software Prism 7 (GraphPad Inc. La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los procedimientos que se realizaron en los animales se aprobaron por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

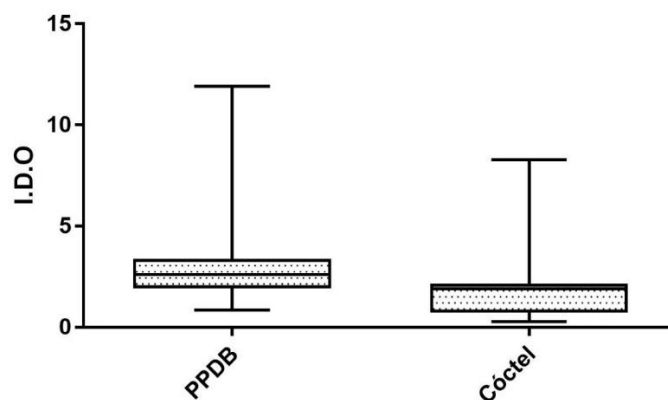
Con el objetivo de evaluar animales naturalmente infectados con *M. bovis*, se seleccionaron 11 animales provenientes de un hato con evidencia clínica, patológica y bacteriológica de la presencia de *M. bovis*. Dichos animales fueron reactores al PPDB en la prueba de tuberculina. En 10 animales, fue posible identificar la presencia del material genético de la micobacteria por medio de PCR en muestras de exudado nasal (datos no mostrados). Así mismo, se evaluó la producción de IFN- γ en respuesta al PPDB y el cóctel proteico E6-C10 (Cuadro 1). Solo 4 animales (36.3 %) fueron positivos al PPDB, el resto (7 animales) fue negativo. Con el cóctel proteico se identificaron 8 animales (72.7 %) positivos.

Cuadro 1. Bovinos identificados en la prueba de IFN- γ usando el PPDB y el cóctel proteico E6-C10

Prueba de IFN- γ	Positivo	Negativo	Total
PPDB	4	7	11
E6-C10	8	3	11

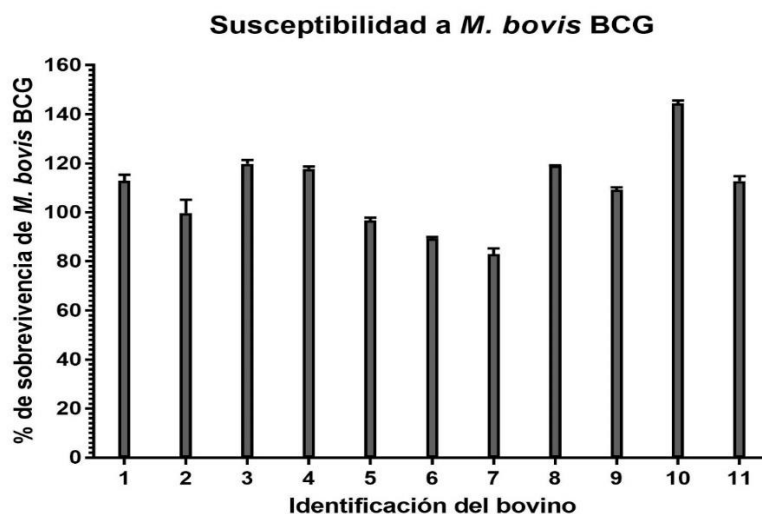
La producción de IFN- γ medida como índice de densidad óptica hacia el PPDB y el cóctel proteico E6-C10 se muestra en la Figura 1. La media del IDO hacia el PPDB fue de 2.5, con un valor mínimo de 0.847 y máximo de 11.91. Mientras que para el cóctel proteico se obtuvo una media de 2.0 y un valor mínimo y máximo de 0.271 y 8.27, respectivamente.

Figura 1. Producción de IFN- γ hacia el PPDB y cóctel proteico E6-CF10 en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*. Los resultados se expresaron como un índice de densidad óptica (I.D.O.). ($P= 0.422$).



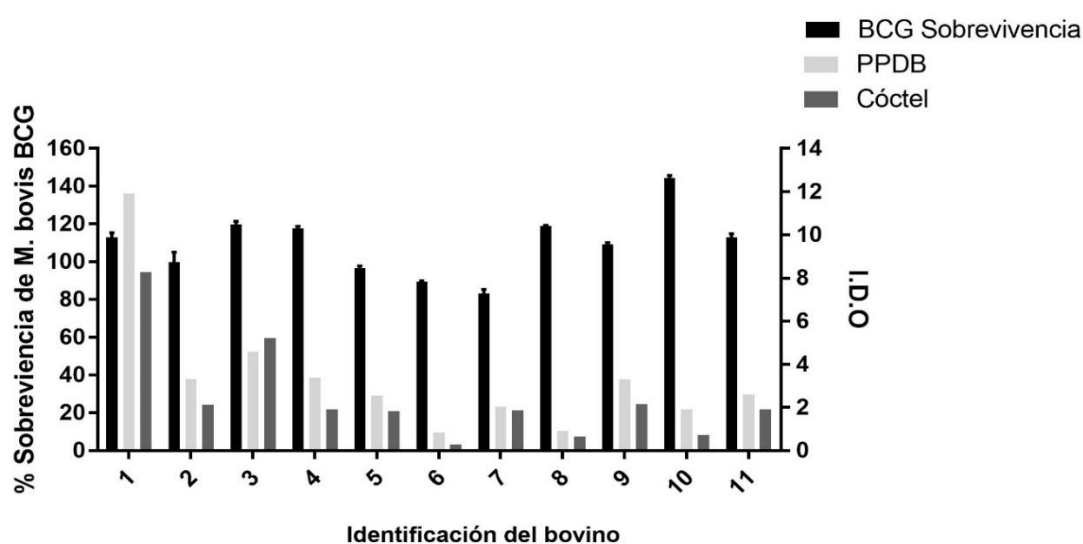
En la Figura 2 se muestra el porcentaje de sobrevivencia de *M. bovis* BCG en el ensayo microbicida realizado en los animales evaluados. Se observó un rango de porcentaje de sobrevivencia del 80 a 150 %. De acuerdo a los porcentajes de supervivencia intracelular, todos los animales evaluados se clasificaron como naturalmente susceptibles a la infección por *M. bovis*. Aunque hubo algunas diferencias en el grado de susceptibilidad de los bovinos, éstas no fueron significativas.

Figura 2. Porcentaje de supervivencia de *M. bovis* BCG en el ensayo bactericida de macrófagos en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*. Los resultados se expresan como la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. ($P= 0.6980$).



Posteriormente, se comparó el IDO del PPDB y cóctel proteico E6-C10 con el índice de supervivencia de *M. bovis* BCG, pero no hubo correlación entre la susceptibilidad hacia *M. bovis* BCG y la producción de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis* (Figura 3).

Figura 3. Comparación del porcentaje de supervivencia de *M. bovis* BCG con la producción de IFN- γ hacia el PPDB y al cóctel proteico E6-C10 en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*. Los resultados se expresaron como un índice de densidad óptica (IDO). ($P= 0.723$).



El objetivo de este estudio fue identificar la capacidad de los macrófagos en el control de la infección por *M. bovis* y la producción de IFN- γ de los linfocitos en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*; para satisfacer este objetivo se tomaron diferentes precauciones, por ejemplo se seleccionaron animales provenientes de un hato con alta prevalencia de TBB donde se tuviera la certeza de la presencia del agente en el ambiente. Además, se evitó el empleo de animales negativos a la prueba de tuberculina, para no incluir animales anérgicos. En condiciones de campo existe la dificultad de establecer la etapa de infección en la que se encuentra cada animal, por lo que la inclusión de bovinos PPD negativos podría impedir la evaluación de la respuesta inmune celular (producción de IFN- γ). Así mismo, se analizaron animales en la misma etapa de producción con 3.5 años en promedio. Por otra parte, se corroboró que los bovinos incluidos en el estudio tuvieran evidencias del contacto con *M. bovis*.

La prueba de oro de la infección por TBB es el aislamiento bacteriano a partir de tejidos con lesiones sugestivas a la infección; no obstante, la eliminación de animales en producción sin signos clínicos de la enfermedad representa una pérdida económica de consideración para los hatos lecheros. Es por eso que se han desarrollado diversas herramientas de biología molecular que permiten una identificación rápida de la infección, una de ellas es el PCR a partir de la extracción de ADN de exudados nasales. A pesar de ser una herramienta muy útil es necesario que el animal esté excretando la micobacteria para que ésta pueda ser detectada. Los períodos de excreción son intermitentes y varían de un animal a otro debido al estado de infección, por lo que un resultado negativo en la PCR no significa que el animal no está infectado, sólo que no está en un periodo de eliminación⁽²⁰⁾. En este estudio, a excepción de un animal, en todos los animales se identificó el ADN de la micobacteria mediante PCR. Existen otros factores que afectan los resultados de cualquier PCR, como la presencia de inhibidores, el método de extracción de ADN y el límite de detección. En este estudio se empleó PCR anidada para aumentar el límite de sensibilidad^(17,18); empero un animal resultó negativo a dicha prueba, aunque no se detectó la presencia de inhibidores, por lo que es posible que dicho animal estuviera en un estado de no excreción de la micobacteria, o su presencia estuviera lejos del límite de detección de la PCR. El éxito de la PCR a partir de exudados nasales observado en el presente estudio puede estar influenciado por la alta prevalencia de la infección en el hato; no obstante, es una demostración de su utilidad en casos donde el sacrificio de los animales no pueda realizarse.

Otra de las herramientas utilizadas para caracterizar a los bovinos del estudio fue mediante la prueba de IFN- γ . Diferentes autores han demostrado que esta prueba es más sensible y específica que la prueba intradérmica^(17,21,22). Sin embargo, la exposición a otras micobacterias o la co-infección con *M. avium* subsp paratuberculosis, afecta la especificidad de las pruebas basadas en el uso del PPD, incrementando el número de reacciones falsas positivas, fenómeno que puede ser evitado usando antígenos altamente inmunogénicos como ESAT-6 y CFP-10⁽²³⁾. En el presente estudio se observó que el cóctel proteico E6-C10 identificó más animales infectados que el PPDB en la prueba de IFN- γ , el 72.7 % (n= 8) de los animales se identificaron positivamente por el cóctel proteico E6-10, mientras que solo el 36.3 % (n= 4) por el PPDB^(15,24). Estas diferencias se atribuyen principalmente a la pobre definición de antígenos presentes en el PPDB, pues aunque éste proporciona una excelente sensibilidad, su especificidad es limitada, debido a que muchos antígenos presentes en el PPDB también se encuentran presentes en micobacterias ambientales. Por otro lado, el cóctel proteico E6-C10 está formado por dos antígenos que solo están presentes en bacterias del complejo *M. tuberculosis*, pero están ausentes en todas las cepas de *M. bovis* BCG y micobacterias ambientales, por lo que la especificidad de este cóctel es mucho mayor^(15,17,24).

Para evaluar la sobrevivencia de *M. bovis* BCG en los macrófagos provenientes de animales naturalmente infectados se utilizó un ensayo bactericida. El principal hallazgo de este reporte indica que existe una variación en la susceptibilidad a *M. bovis* por parte de los bovinos

naturalmente infectados con este patógeno. Las diferencias en el grado de sobrevivencia del *M. bovis* o susceptibilidad a la infección reflejan principalmente el desempeño de los macrófagos frente a *M. bovis*, aunque también podría significar diferencias en el estado de infección, nutrición, salud del bovino u otros factores ambientales^(12,13,25). Estudios con macrófagos provenientes de bovinos resistentes han mostrado que estos poseen una mayor actividad bacteriostática, producen mayores concentraciones de óxido nítrico y tienen una mayor expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias que los macrófagos de individuos susceptibles^(14,19,25). En este estudio no se encontraron bovinos con el fenotipo de animales resistentes que permitiría una comparación de los resultados. Sin embargo, la variación amplia de la susceptibilidad encontrada permite evaluar la asociación de esta capacidad inmunológica con la producción de IFN- γ por cada individuo.

Es importante puntualizar que la respuesta inmune contra la tuberculosis es un proceso muy complejo^(1,8,26). Como se mencionó al inicio, después de la exposición inicial a *M. bovis*, se desarrolla una respuesta inmune celular T, pero para controlar la proliferación bacteriana se requiere un equilibrio muy fino entre la producción de citocinas pro y antiinflamatorias. La producción de IFN- γ inducida por IL-12 es la vía de citocinas más estudiada y posiblemente mejor validada que regula la infección por *M. bovis*⁽²⁷⁾. Esta vía es crítica en el desencadenamiento de funciones antimicobacterianas por los macrófagos, en particular la activación de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)⁽²⁸⁾. Sin embargo, a pesar de los datos que respaldan el papel esencial del IFN- γ en el control de la progresión de la tuberculosis, investigaciones recientes indican que el aumento de los niveles de IFN- γ durante la infección micobacteriana puede reflejar el estado inflamatorio y la progresión de la enfermedad más que una respuesta inmune protectora⁽²⁹⁾. Es probable que la variación del IDO observado en el presente estudio sea un reflejo de las distintas etapas de infección en la que se encuentran los animales evaluados; empero, es imposible confirmar dicha conclusión por la falta de la evaluación de la patología de la infección en los tejidos de los bovinos infectados.

Estudios previos indican que los bovinos con mayor número de lesiones producen más óxido nítrico, TNF- α e IFN- γ , por lo que es posible plantear la hipótesis de que los animales identificados en este estudio no pudieron controlar la infección por *M. bovis* a pesar de la fuerte respuesta inmunitaria proinflamatoria que en este caso, solo aumentó la patología de la enfermedad⁽²¹⁾. Por otra parte, estudios previos han mostrado que los macrófagos de bovinos resistentes producen más óxido nítrico que los macrófagos de bovinos susceptibles⁽¹⁹⁾. Por lo tanto, es posible que una de las razones de la incapacidad para controlar el crecimiento de *M. bovis* por los macrófagos de los bovinos susceptibles identificados en este estudio sea la pobre producción de óxido nítrico por las células⁽²⁵⁾. Así mismo, se sabe que diferentes tipos de subpoblaciones de linfocitos T participan en la respuesta inmune contra las micobacterias. Diversos estudios han demostrado que personas con una infección latente de tuberculosis muestran mayores frecuencias de linfocitos T CD4⁺

trifuncionales, capaces de producir IFN- γ , TNF- α e IL-2, con una mayor capacidad efectora y proliferativa⁽³⁰⁾, en contraste con personas con la enfermedad activa que muestran frecuencias elevadas de linfocitos T CD4⁺ con función simple o doble⁽²⁶⁾. Por lo tanto, es posible que la polifuncionalidad pueda correlacionarse con la resistencia a la tuberculosis en humanos y bovinos⁽³¹⁾.

No hay duda de que la resistencia a la infección por *M. bovis* es un fenómeno multifactorial, por lo que es importante vincular las respuestas inmunes innatas y adaptativas, con el fin de buscar biomarcadores que ayuden a discriminar entre bovinos susceptibles y resistentes. Este reporte, es una aproximación de la evaluación de la actividad microbicida de macrófagos provenientes de animales naturalmente infectados, aunque los datos no apoyan una correlación entre la susceptibilidad de *M. bovis* y la producción de IFN- γ en bovinos naturalmente infectados con *M. bovis*, no se descarta la hipótesis de que las limitaciones en el funcionamiento de los macrófagos y los linfocitos T desempeñan un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad.

❖ Agradecimientos ❖

Este trabajo fue financiado por CONACYT CB-167488 y CONACYT SNI-Licenciatura 0102958.

● Literatura citada

1. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J* 2002;163:115-27.
2. Perry BD, Randolph TF, McDermott JJ, R. SK, Thornton PK. Zoonotic diseases and their impact on the poor. In: Perry BD, *et al*, editors. Investing in animal health research to alleviate poverty. Nairobi: ILRI (International Livestock Research Institute). 2002.
3. Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, *et al*. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(4):e2177. doi: 10.1371/journal.pntd.0002177.

4. Milián-Suazo F, Pérez-Guerrero L, Arriaga-Díaz C, Escartín-Chávez M. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med* 2010;97:37-44.
5. Rodwell T, Moore M, Moser K, Brodine S, Strathdee S. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in Binational Communities, United States. *Emerg Infect Diseases* 2008;14(6):1-16. doi: 10.3201/eid1406.071485.
6. Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23:464-72. doi: 10.1016/j.coi.2011.06.002.
7. Rossouw M, Nel HJ, Cooke GS, van Helden PD, Hoal EG. Association between tuberculosis and a polymorphic NFkappaB binding site in the interferon gamma gene. *Lancet* 2003;361(9372):1871-1872.
8. Pollock JM, Pollock DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, *et al.* Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996;87:236-241.
9. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Reviews* 2008;226:191-204.
10. Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Reviews* 2015;264:182-203.
11. Templeton J, Estes D, Price R, Smith III R, Adams L, editors. Immunogenetics of natural resistance to bovine brucellosis. *Proc 4th World Cong Genetics Applied to Livestock Production*. Edinburgh. Poultry, fish and horse genetics and breeding, growth and reproduction, immune response and disease resistance; 1990.
12. Harmon BG, Adams LG, Templeton J, Smith Rr. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1989;50(4):459-65.
13. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopath* 1996;50:55-65.
14. Gutierrez-Pabello JA, Adams LG. Survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from cattle naturally resistant and susceptible to intracellular pathogens. *Vet Méx* 2003;34(3):277-281.
15. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, Gutierrez-Pabello JA, Suarez-Guemes F, *et al.* Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with

- different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4326-35. doi: 10.1128/jcm.01184-06.
16. Belisle J, Sonnenberg G. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Methods in molecular biology*. 1998;101:31-44. doi: 10.1385/0-89603-471-2:31.
 17. Flores-Villalva S, Suarez-Guemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutierrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19(5):797-803. doi: 10.1128/cvi.05668-11.
 18. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1991;27:187-95.
 19. Esquivel-Solis H, Vallecillo AJ, Benitez-Guzman A, Adams LG, Lopez-Vidal Y, Gutierrez-Pabello JA. Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *PLoS One*. 2013;8(5):e63464. doi: 10.1371/journal.pone.0063464.
 20. Kao RR, Gravenor MB, Charleston B, Hope JC, Martin M, Howard CJ. *Mycobacterium bovis* shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. *J Royal Soc Interface* 2007;4(14):545-51. doi: 10.1098/rsif.2006.0190.
 21. Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Carlson MP, Nonnecke BJ. Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinic Diagnos Lab Immunol* 2003;10(5):960-966.
 22. Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, *et al*. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014;97(Suppl:S44):52. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.04.002.
 23. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutierrez-Pabello JA, McNair J, Andersen P, *et al*. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med* 2010;96(3-4):161-169. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.06.007.
 24. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle 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.

25. Castillo-Velázquez U, Aranday-Cortés E, Gutierrez-Pabello JA. Alternative activation modifies macrophage resistance to *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 2011;151:51-59.
26. Pollock KM, Whitworth HS, Montamat-Sicotte DJ, Grass L, Cooke GS, Kapembwa MS, *et al.* T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. *J Infect Dis* 2013;208(6):952-968.
27. Mayer-Barber KD, Sher A. Cytokine and lipid mediator networks in tuberculosis. *Immunol Reviews* 2015;264:264-275.
28. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN- γ and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 2002;10(5):221-226.
29. Abebe F. Is interferon-gamma the right marker for bacille Calmette–Guérin-induced immune protection? The missing link in our understanding of tuberculosis immunology. *Clinic Exper Immunol* 2012;169(3):213-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04614.x.
30. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Reviews* 2015;264:74-87.
31. Whelan AO, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hogarth PJ. Development of an antibody to bovine IL-2 reveals multifunctional CD4 T(EM) cells in cattle naturally infected with bovine tuberculosis. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e29194. doi: 10.1371/journal.pone.0029194.