

Respuesta inmune humoral de cobayos hacia componentes proteicos de micobacterias

Humoral immune response to protein components of mycobacteria in guinea pigs

Fernando Díaz Otero^a, Leticia García Casanova^a, Ciro Estrada-Chávez^a, Marco Antonio Vega López^b, Víctor Banda Ruíz^a, Camila Arriaga Díaz^a

RESUMEN

La respuesta de anticuerpos hacia tres diferentes antígenos micobacterianos se analizó en cobayos inmunizados con *Mycobacterium bovis* AN5, *M. avium* D4 o *M. bovis* BCG. Los resultados de ELISA demostraron una mayor respuesta inducida por la cepa *M. bovis* AN5 inactivada por calor. Los animales inoculados con dicha cepa reconocieron preferentemente antígenos de 22-24 y de 28 kilodaltones. Estos antígenos no fueron reconocidos por los animales inoculados con *M. avium* o con la cepa vacunal, sugiriendo su potencial para diferenciar animales infectados de vacunados.

PALABRAS CLAVE: *Mycobacterium bovis* AN5, *M. bovis* BCG, Cobayos, Respuesta humoral.

ABSTRACT

Antibody response to three different mycobacterial antigens was assessed in guinea pigs immunized with *M. bovis* AN5, *M. avium* D4 or *M. bovis* BCG. ELISA results demonstrated a stronger response elicited by heat killed *M. bovis* AN5. Animals inoculated with this strain recognized preferentially antigens of 22-24 and 28 kilodaltons. These antigens were not recognized by animals inoculated with either *M. avium* or the vaccine strain suggesting their potential usefulness to differentiate infected from vaccinated animals.

KEY WORDS: *Mycobacterium bovis* AN5, *M. bovis* BCG, Guinea pigs, Humoral response.

La caracterización de antígenos de *Mycobacterium bovis* es fundamental para el entendimiento de la patogenia y respuesta inmune durante la tuberculosis bovina. La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados a la fecha son proteínas solubles, entre las que destacan aquéllas secretadas activamente en el medio de cultivo⁽¹⁾. Para la caracterización de antígenos se han utilizado cepas de *M. bovis* BCG, mientras que la información referente a cepas virulentas de *M. bovis* es limitada⁽²⁾. Se han identificado proteínas inmunodominantes de cepas vacunales en cobayos inmunizados⁽³⁾, algunas de las cuales podrían estar

Characterization of *Mycobacterium bovis* antigens is indispensable to understand pathogenesis and immune response in bovine tuberculosis. Most of *M. bovis* antigens characterized so far are soluble proteins, and those secreted actively in a culture medium stand out⁽¹⁾. *M. bovis* BCG strains have been used for antigen characterization, whereas information referred to virulent strains of *M. bovis* remains limited⁽²⁾. Immune dominant proteins coming from vaccine strains have been identified in immunized guinea pigs⁽³⁾, some of which could be absent in pathogenic mycobacteria belonging to the *M. tuberculosis* complex⁽⁴⁾. Also, it has been

Recibido el 17 de diciembre de 2001 y aceptado para su publicación el 15 de marzo de 2002.

a Departamento de Biotecnología Aplicada, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, INIFAP, Carretera México-Toluca KM. 15.5, Col Palo Alto, 05110, México D. F. Teléfono: 55701720, Fax: 55704073, camila@micro.inifap.conacyt.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al sexto autor.

b Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN.

ausentes en micobacterias patógenas del complejo *M. tuberculosis*⁽⁴⁾. Asimismo, se ha demostrado que existen proteínas preferentemente expresadas por aislados de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en comparación con cepas vacunales⁽⁵⁾. El objetivo del presente trabajo fue determinar mediante ELISA y Western Blot la respuesta inmune humoral de cobayos inoculados con *M. bovis* AN5, *M. avium* D4 o *M. bovis* BCG hacia el extracto proteínico de los filtrados de cultivo (CFPE) de *M. bovis* y *M. avium* y hacia el extracto sonicado (ES) de *M. bovis* BCG.

Se emplearon cobayos de tres meses de edad (hembras) de 300 a 400 g de peso corporal, distribuidos en cuatro grupos de nueve cobayos cada uno, los cuales se inmunizaron en el cojinete plantar izquierdo. El grupo A se inoculó con 4 mg de masa bacteriana seca de *M. bovis* AN5, resuspendida en 1 ml de vaselina estéril. El grupo B se inoculó con 4 mg de masa bacteriana seca de *M. avium* D4, resuspendida en vaselina. El grupo C se inoculó con 500,000 unidades formadoras de colonia de *M. bovis* BCG, cepa Danesa 1331 (Secretaría de Salud, México). Para control del estudio, al grupo D se le aplicó únicamente 0.5 ml de vaselina.

Para caracterizar la respuesta de anticuerpos contra antígenos micobacterianos, los cobayos fueron sangrados semanalmente mediante punción cardiaca a partir de la cuarta y hasta la dieciseisava semana posinoculación (p.i.). Los sueros obtenidos se analizaron por ELISA en placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate MaxiSorb), sensibilizadas con 1 mg/pozo con tres distintos antígenos: PPD bovino y PPD aviar (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) dializados en solución salina de fosfatos 0.01 M, pH 7.2 (PBS) y extracto sonicado (ES) de *M. bovis* BCG, cepa Danesa 1331 (donado por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, México). Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5 % en PBS- Tween 20 al 0.5 %. Los sueros se agregaron a una dilución 1:100, excepto en aquéllos del grupo A donde también se probó una dilución 1:200, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de lavar se agregó proteína A/G conjugada con peroxidasa (Dako) diluida 1:5,000 y

demonstrated that some proteins are preferentially expressed by field isolates of *M. tuberculosis* or *M. bovis* compared to vaccine strains⁽⁵⁾. The objective of this study was to determine through ELISA and Western Blot analyses the immune humoral response towards protein extracts of *M. bovis* and *M. avium* culture filtrates (PECF) and also towards a *M. bovis* BCG sonicated extract (SE), in guinea pigs inoculated with *M. bovis* AN5, *M. avium* D4 and *M. bovis* BCG.

Female guinea pigs three months old, weighing between 300 and 400 g were used. They were distributed in four groups of nine guinea pigs each, and immunized in the foot pad. Group A was inoculated with 4 mg of a *M. bovis* AN5 dry bacterial mass resuspended in 1 ml of sterile vaseline. Group B was inoculated with 4 mg of a *M. avium* D4 dry bacterial mass resuspended in vaseline. Group C was inoculated with 500,000 forming colony units of *M. bovis* BCG, Danish strain 1331 (Secretaría de Salud, Mexico). Group D was used as control, to which, 0.5 ml vaseline only was injected.

In order to characterize a response of antibodies to mycobacteria antigens, all guinea pigs were bled every week from the 4th through the 16th wk post inoculation (p.i.) date through heart puncture. The sera obtained were analyzed by means of ELISA in 96-well plates (Nunc - Immuno Plate MaxiSorb), coated with three different antigens (1 g/well): bovine PPD and avian PPD (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) dialized in 0.01M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.2 and *M. bovis* BCG, Danish strain 1331 SE (donated by the Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, Mexico). Unspecific binding sites in the plates were blocked with 0.5 % bovine serum albumin (BSA) in 0.5 % PBS - Tween 20 solution. Guinea pigs serum samples diluted 1:100 were added (except those of the Group A where also a 1:200 dilution was tested) and incubated for 1 h at 37°C. After washing, A/G protein-peroxydase conjugate (Dako) diluted to 1:5,000 was added, and incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was revealed with a 0.4 % orto-phenylenediamine, 0.3 % H₂O₂ in 0.1 M sodium citrate solution, pH 5, and was stopped through the addition of 2.5 M

se incubó por 1 h a 37 °C. La reacción se reveló con una solución de O-fenildiamina al 0.4 % y H₂O₂ al 0.3 % en citrato de sodio 0.1 M, pH 5. La reacción se detuvo mediante adición de H₂SO₄ 2.5 M y la densidad óptica (DO) se determinó en un lector de ELISA (SIGMA) a 492 nanómetros.

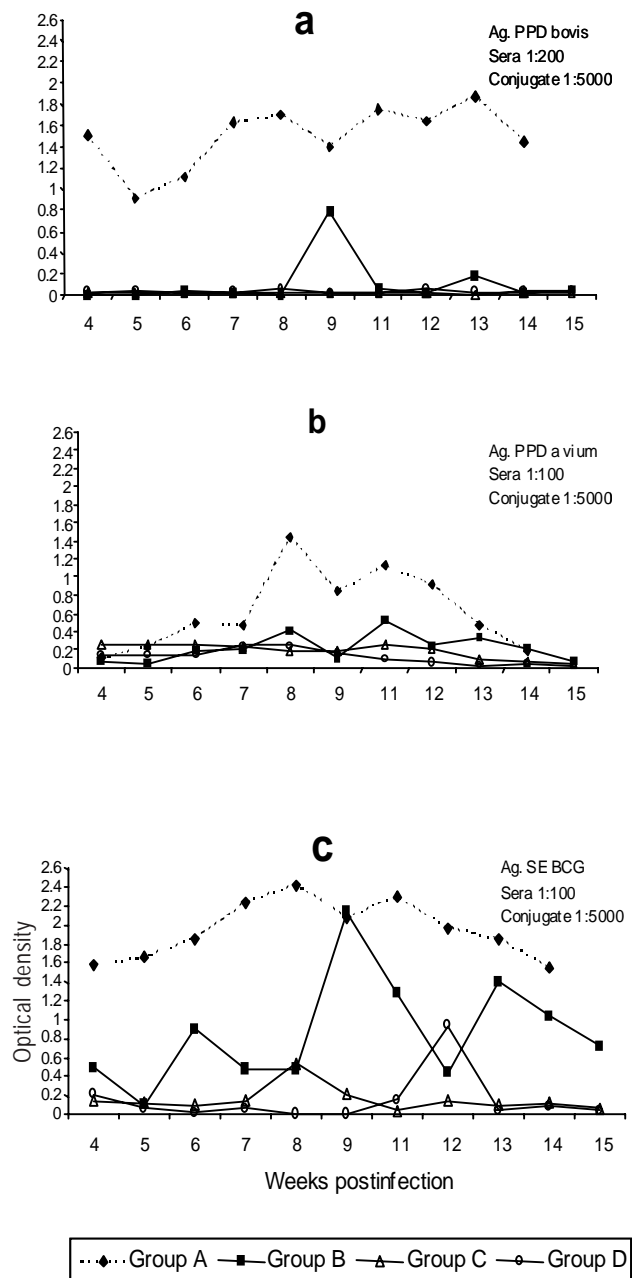
En los análisis de Western Blot se utilizó CFPE de la sexta semana de *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4 (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) y ES de *M. bovis* BCG, similar al empleado para ELISA. Estos antígenos fueron resueltos en geles de poliacrilamida - duodecilsulfato de sodio al 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los sitios no ocupados por el antígeno se bloquearon con BSA al 3 % a 4 °C toda la noche. Las membranas se cortaron en tiras de 5 mm y se incubaron durante 2 h a 37° C con los sueros diluidos 1:50. Después de lavar se agregó proteína A/G peroxidasa (Dako) diluida 1:1000 durante 1 h a 37° C y se reveló empleando 4 cloronaftol al 0.5% y H₂O₂ al 0.01 % en PBS.

Los cobayos del grupo A mostraron altos valores de DO (> 1.0) desde la cuarta semana p.i. hacia el PPD bovino, y se mantuvieron durante el periodo de estudio, aunque se observó un descenso en la quinta semana p.i. En el grupo B se observó respuesta solamente en la novena semana (Figura 1a). La reactividad del grupo A hacia el PPD aviar fue ascendente desde la cuarta semana p.i. con un pico máximo en la octava semana seguido de un descenso paulatino a partir de la undécima semana p.i. El grupo B mostró valores de DO inferiores a los observados en el grupo A, con dos picos a la octava y undécima semana p.i (Figura 1b). Sin embargo, la mayor reactividad se observó en contra del ES de BCG (Figura 1c), en el grupo A ésta se mantuvo desde la cuarta semana p.i. con un pico máximo (> 2.0) a la octava semana. El grupo B mostró un ascenso sostenido desde la sexta semana, con un pico muy marcado a la novena semana (> 2.0). En general los grupos C y D mostraron baja reactividad hacia los componentes de los antígenos empleados en ELISA.

El grupo A reconoció principalmente tres antígenos del CFPE de *M. bovis* AN5 de 45, 28 y 22-24

Figura 1. Valores de densidad óptica (DO) obtenidos en ELISA usando sueros de cobayos inmunizados con micobacterias y distintos antígenos

Figure 1. Optical density (OD) obtained by ELISA with sera of guinea pigs immunized with different *Mycobacterium* strains



Animals were inoculated with *M. bovis* AN5 (Group A); *M. avium* D4 (Group B); *M. bovis* BCG (Group C); or vaseline (Group D).

kilodaltones (kDa), a este último con mayor intensidad prácticamente durante todo el estudio (Figura 2A1). Los grupos B y C no reconocieron componentes de este CFPE (Figura 2B1 y 2C1). En el CFPE de *M. avium* D4 los grupos A, B y C reconocieron únicamente un componente de 45 kDa a partir de la octava semana p.i, siendo mayor esta reactividad en el grupo A (Figuras 2A2, 2B2 y 2C2).

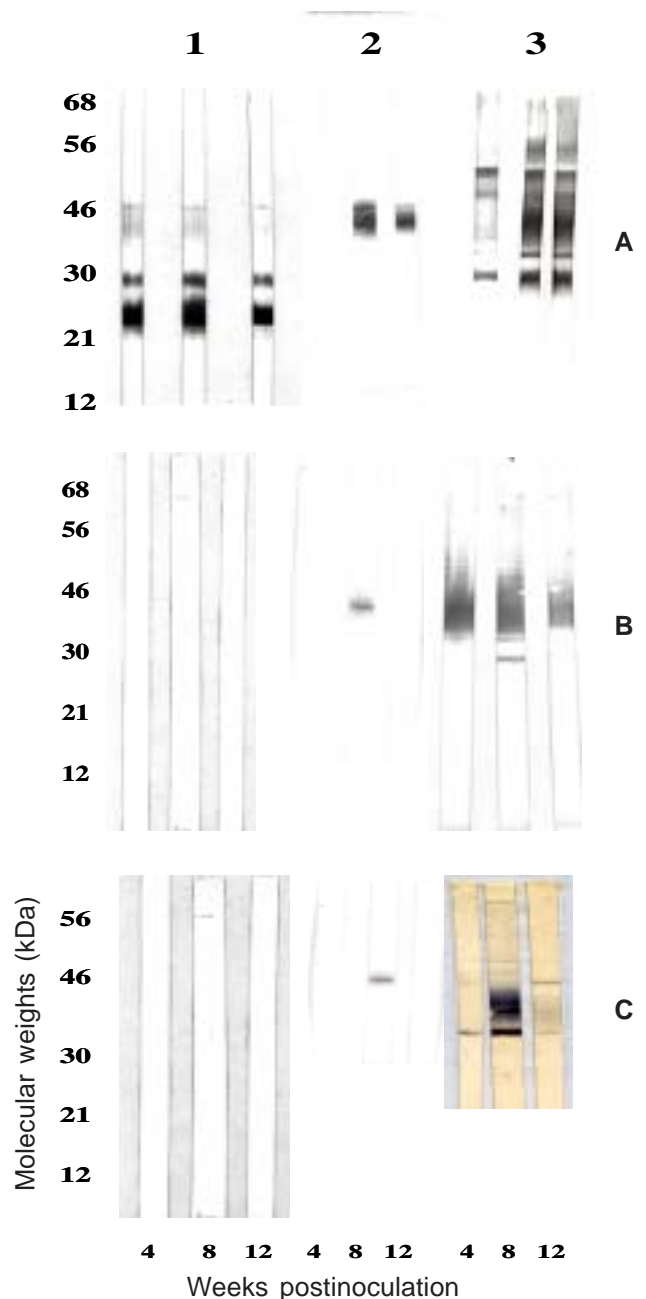
Por otra parte, el reconocimiento de componentes en el ES de *M. bovis* BCG fue muy intenso en los grupos inoculados con micobacterias, principalmente hacia proteínas de un peso molecular mayor a 30 kDa. El grupo A reconoció proteínas en un rango de 24 a 45 kDa hasta la duodécima semana p.i, destacando el reconocimiento de una proteína de 28 kDa (Figura 2A3). El grupo B reconoció preferentemente componentes del ES en el rango de 38 a 65 kDa (Figura 2B3). El grupo C reaccionó de manera similar al grupo B a la octava semana, siendo evidente un reconocimiento constante de una proteína de 38 kDa durante el estudio (Figura 2C3). El grupo D no mostró reconocimiento hacia ninguno de los componentes de los CFPE o ES.

El grupo de cobayos inoculados con *M. bovis* AN5 inactivado produjo mayores niveles de anticuerpos, determinados mediante ELISA, contra antígenos micobacterianos, tanto de esta cepa como contra la cepa *M. bovis* BCG. En contraste, la reactividad hacia cualquiera de los antígenos fue mucho menor en el grupo inoculado con BCG semejante a lo observado por otros, tanto en la misma especie como en bovinos⁽⁶⁾. Aunque el grupo A inoculado con la cepa *M. bovis* AN5 mostró reactividad cruzada contra el PPD aviar, el reconocimiento fue mayor hacia el PPD bovino.

A diferencia de los demás grupos, el grupo A reconoció fuertemente una banda 22-24 kDa en el CFPE de *M. bovis* AN5. Dentro de ese rango han sido descritos varios antígenos inmunodominantes, específicos del complejo *M. tuberculosis*; uno de ellos, conocido como MPB70⁽⁷⁾, constituye la proteína de secreción mayormente producida por *M. bovis*, en comparación con otras especies del complejo^(8,9). La MPB70 representa una glicopro-

Figura 2. Antígenos reconocidos en Western Blot por sueros de cobayos inmunizados con micobacterias a las 4, 8 y 12 semanas

Figure 2. Antigens recognized in Western Blot by sera of guinea pigs immunized with mycobacterias at 4, 8 and 12 weeks



A=inoculated with *M. bovis* AN5; B=inoculated with *M. avium* D4; C=inoculated with *M. bovis* BCG.

Antigens analyzed were: CFPE of *M. bovis* AN5 (1), CFPE de *M. avium* D4 (2), and SE of *M. Bovis* BCG (3).

teína cuyo peso molecular puede oscilar entre 22 a 25 kDa dependiendo del grado de glicosilación⁽¹⁰⁾. Otra es la variante soluble de 23 kDa de una lipoproteína denominada MPB83, que en su forma nativa de 26 kDa se localiza asociada a la superficie bacteriana⁽¹¹⁾. También se ha descrito una proteína de 24 kDa, denominada MPT64⁽²⁾, que al parecer no es expresada en las cepas vacunales⁽¹²⁾. Es importante señalar que la reactividad observada hacia el componente de 22 kDa es semejante en bovinos reactivos a la tuberculina^(10,13,14). En relación con lo anterior, se ha observado que los antígenos de secreción de las micobacterias inducen una fuerte respuesta inmune tanto celular como humoral, y aparentemente juegan un papel primordial en el desarrollo de la inmunidad protectora⁽¹⁵⁾.

El grupo A reconoció también un componente de 28 kDa presente en el ES de BCG y en el CFPE de *M. bovis*, pero no en el de *M. avium*. Recientemente se describió una proteína de este peso molecular en CFPE de *M. tuberculosis* usando el mismo modelo animal⁽¹⁶⁾. En estudios para determinar la respuesta humoral en pacientes con tuberculosis activa, se han identificado antígenos de 28 kDa al parecer específicos del complejo *M. tuberculosis*^(17,18). Estudios similares en bovinos infectados experimentalmente o de campo han demostrado el reconocimiento preferencial de antígenos de un peso molecular similar, presentes tanto en el CFPE como en los ES de *M. bovis*^(19,20).

La amplia variedad de antígenos presentes en el ES coincidió con los valores de DO más elevados del estudio. Los tres grupos sensibilizados reconocieron antígenos de mayor peso molecular en el ES; destaca el reconocimiento de una banda de 38 kDa de forma constante, ausente en el CFPE. Es muy probable que dicha banda corresponda a la lipoproteína inducida por bajas concentraciones de fosfato, la cual se localiza principalmente asociada a la pared celular y prácticamente no está presente en el CFPE⁽²¹⁾.

Los cobayos son considerados un excelente modelo para el estudio de la tuberculosis, debido a su fácil manejo y a su alta susceptibilidad a las micobac-

H_2SO_4 . Optical density (OD) was determined in an ELISA reader (SIGMA) at 492 nanometers.

For Western Blot analyses, week 6 *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4 PECFs and *M. bovis* BCG SE, similar to those employed for ELISA, were used. These antigens were separated in 12 % polyacrylamide- sodium dodecyl-sulphate gels and transferred to nitrocellulose membranes. Spaces not occupied by the antigen were blocked with 3 % BSA at 4 °C, overnight. The membranes were cut into 5 mm strips and incubated for 2 h at 37 °C with the sera diluted to 1:50. After washing, protein A/G - peroxidase (Dako), diluted to 1:1000 was added, incubated for 1h at 37 °C and revealed using 0.5 % 4-chloronaphthol and 0.01 % H_2O_2 in PBS.

Guinea pigs in Group A showed high values of OD (> 1.0) to bovine PPD since the 4th wk p.i., for the period being studied, although a decrease was observed in the 5th wk. In Group B, a response was observed only during the 9th wk (Figure 1a). Group A reactivity towards avian PPD was on the rise since week 4 with a maximum peak at week 8, followed by a gradual decrease starting on week 11 p.i. Group B showed OD lower values than those observed in Group A, with two peaks at week 8 and week 11 (Figure 1b). However, the highest reactivity was observed against BCG SE (Figure 1c); in Group A this reactivity began at week 4 p.i., showing a maximum rise (> 2.0), up to week 8. Group B showed a sustained increase from week 6, with a very marked peak, to week 9 (> 2.0). In general, groups C and D showed low reactivity towards the antigens used in ELISA.

By Western blotting, group A recognized mainly three antigens of *M. bovis* AN5 PECF with molecular weight of 45, 28 and 22-24 kilodaltons (kDa), this last one with more intensity for the whole study (Figure 2A1). Groups B and C did not recognize components of this PECF (Figures 2B1, 2C1). In *M. avium* PECF D4, groups A, B and C only recognized a 45 kDa component from week 8 p.i. onwards, this reactivity being higher in Group A (Figures 2A2, 2B2, 2C2).

On the other hand, recognition of *M. bovis* BCG SE components was very intense in groups inoculated with mycobacteria, especially for proteins

terias⁽¹⁵⁾. En este estudio se confirmó su utilidad para identificar antígenos inmunodominantes de micobacterias, destacando la especificidad en el reconocimiento de antígenos de la cepa *M. bovis* AN5, así como la baja inducción de anticuerpos por la cepa vacunal BCG. Al respecto, se ha demostrado que cepas vacunales de *M. bovis* BCG, no son capaces de expresar proteínas (ESAT-6) que sí están presentes en las cepas de campo⁽²²⁾. Estos resultados permiten concluir que es posible distinguir los cobayos vacunados con BCG de los inmunizados con cepas patógenas. Por otra parte, el reconocimiento de antígenos de bajo peso molecular fue similar al descrito en bovinos infectados naturalmente⁽¹⁴⁾. En lo futuro sería interesante demostrar si los bovinos vacunados con BCG no reconocen a estos antígenos a diferencia de los infectados.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, por la donación del CFPE y PPD de *M. bovis* y *M. avium* empleados en este estudio y al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica, México, por proporcionar el ES de *M. bovis* BCG. Este trabajo fue financiado en parte por CONACYT (N° de proyectos 29137-B y G34799).

LITERATURA CITADA

1. Fifis T, Rothel JS, Wood PR. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation. *Vet Microbiol* 1994;(40):65-81.
2. Hasløv K, Andersen A, Nagai S, Gottschau A, Sørensen T, Andersen P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;(63):804-810.
3. Haga S, Yamaguchi R, Nagai S, Matsuo K, Yamazaki A, Nakamura RM. Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, PB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* 1995;(57):221-225.
4. Kumar D, Srivastava BS, Singh NB, Srivastava R. Identification of a 25-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG to distinguish BCG strains from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996;(34):224-226.

of molecular weight higher than 30 kDa. Group A recognized proteins in the range of 24 to 45 kDa up to week 12 p.i, highlighting the recognition of a 28 kDa protein (Figure 2A3). Group B recognized preferably SE components in the range of 38 to 65 kDa (Figure 2B3). Group C reacted as group B up to week 8, being evident a constant recognition of a 38 kDa protein during this study (Figure 2C3). Group D did not show any recognition toward any of the PECF or SE components.

The group inoculated with inactivated *M. bovis* AN5 produced higher levels of antibodies, against mycobacteria antigens, determined by ELISA, as much for this strain as against the *M. bovis* BCG strain. On the contrary, reactivity towards any of the antigens was much lower in the group inoculated with BCG, similar to results observed by other authors, in this same specie as in bovines⁽⁶⁾. Although the group inoculated with the *M. bovis* AN5 strain showed crossed reactivity against avian PPD, recognition was higher towards bovine PPD.

Quite the opposite to the other groups, Group A strongly recognized a 22-24 kDa band in the *M. bovis* AN5 PECF. Several immune dominant antigens have been described in this range, specific to the *M. tuberculosis* complex; one of them, the well-known MPB70⁽⁷⁾, constitutes a secretion protein mostly produced by *M. bovis*, compared to other species of this complex^(8,9). This antigen is a glycoprotein whose molecular weight can oscillate between 22 to 25 kDa depending on the grade of glycosilation⁽¹⁰⁾. Another is a 23 kDa soluble variant of a lipoprotein known as MPB83, which in its native form of 26 kDa is located in association to the bacterial surface⁽¹¹⁾. A 24 kDa protein, identified as MPT64 has also been described⁽²⁾ which apparently is not expressed in vaccine strains⁽¹²⁾. It is important to point out that the reactivity observed towards the 22 kDa component is similar to that of bovine tuberculin reactors^(10,13,14). In connection to what has been stated before, mycobacteria secretion antigens induce a strong immune response, cellular as well as humoral. Seemingly, they play a basic role in protection immunity development⁽¹⁵⁾.

Group A recognized also a 28 kDa component present in BCG SE and in *M. bovis* PECF, but not

5. Roche PW, Triccas JA, Avery DT, Fifis T, Billman-Jacobe H, Britton WJ. Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1994;(170):1326-1330.
6. 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.
7. Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand J Immunol* 1989;(29):91-101.
8. Abou-Zeid C, Smith I, Grange J, Steele J, Rook G. Subdivision of daughter strains of bacille Calmette-Guerin (BCG) according to secreted protein patterns. *J Gen Microbiol* 1986;(132):3047-3053.
9. Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Res Dis* 1984;(129):444-452.
10. Fifis T, Costopoulos C, Radford AJ, Bacic A, Wood PR. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect Immun* 1991;(59):800-807.
11. Harboe M, Wiker HG, Ulvund G, Lund-Pedersen B, Andersen AB, Hewinson RG, Nagai S. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infect Immun* 1998;(66):289-96.
12. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993;(61):1730-1734.
13. Díaz OF. Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan linfocitos T de bovino [tesis doctorado]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.
14. García CL, Banda RV, Reyes SJA, Arriaga DC. Reconocimiento de filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* por sueros de bovino [resumen]. XX Congreso Nacional de Buiatría; Acapulco, Gro. 1996:63-65.
15. Pal PG, Horwitz MA. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 1992;(60):4781-4792.
16. Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhøj MJ, Andersen P. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun* 1998;(66):3492-3500.
17. Bassey EO, Catty D, Kumararatne DS, Raykundalia C. Candidate antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1996;(77):136-145.
18. Amicosante M, Paone G, Ameglio F, Bianchi EL, Piccolella E, Richeldi L, Bisetti A, Luisetti M, Saltini C. Antibody repertoire against the A60 antigen complex during the course of pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 1993;(6):816-822.
19. Cataldi A, Romano MI, Bigi F. A western blot characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res Microbiol* 1994;(145):689-698.
20. O'Loan CJ, Pollock JM, Hanna J, Neill SD. Immunoblot analysis of humoral immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: early recognition of a 26-kilodalton antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;(1):608-611.
21. Espitia C, Elinos M, Hernandez-Pando R, Mancilla R. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*:

in *M. avium*. Recently, a protein of this molecular weight was described in *M. tuberculosis* PECF using the same animal model⁽¹⁶⁾. In studies to determine a humoral response in patients with active tuberculosis, 28 kDa antigens have been identified, apparently specific for the *M. tuberculosis* complex^(17,18). Similar studies in bovines, experimentally or field infected, have reported a preferential recognition of antigens of similar molecular weight, present in *M. bovis* PECF and SE^(19,20).

The wide variety of antigens present in the SE corresponded with the higher OD values of this study. The three sensitized groups recognized antigens of higher molecular weight in the SE. Noteworthy is a constant recognition of a 38 kDa band, which is absent in the PECF. Most probably this band corresponds to a lipoprotein induced by low phosphate concentrations, and which is located mainly in association to the cellular wall and which is practically absent in PECF⁽²¹⁾.

Guinea pigs are considered an excellent model for the study of tuberculosis, due to their easy handling and to their high susceptibility to mycobacteria⁽¹⁵⁾. In this study, their ability to identify immune dominant antigens of mycobacteria was confirmed, emphasizing a specificity for recognition of antigens to the *M. bovis* AN5 strain, as well as a small induction of antibodies for the vaccine BCG strain. In this respect, it has been shown that *M. bovis* BCG vaccine strains are not able to express proteins (ESAT-6) which are present in field strains⁽²²⁾. These results allow to conclude that it is possible to distinguish guinea pigs vaccinated with BCG from those immunized with pathogenic strains. On the other hand, recognition of low molecular weight antigens was similar to the one described for naturally infected bovines⁽¹⁴⁾. In the future it should be interesting to study if bovines vaccinated with BCG do not recognize these antigens, unlike those naturally infected.

ACKNOWLEDGMENTS

To Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, for the donation of *M. bovis* and *M. avium* PECF

demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun* 1992;(60):2998-3001.

22. Vordermeier HM, Cockle PC, Whelan A, Rodees S, Palmer N, Bakker D, Hewinson RG. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clinic Diag Lab Immunol* 1999;(6):675-682.

and PPD used in this study; and to Dr. Alejandro Escobar Gutierrez of the Instituto Nacional de Referencia Epidemiologica, Mexico, who provided the *M.bovis* BCG SE. This work was funded in part by CONACYT (Projects 29137-B and G34799).