



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL EN BOVINOS INMUNIZADOS CON PROTEÍNAS DE FILTRADO DE CULTIVO DE *Mycobacterium bovis*, INMUNOMODULADOS CON INTERFERÓN GAMMA Y BCG CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
JESÚS PADILLA URBINA

**ASESORES:**  
DR. FERNANDO DÍAZ OTERO.  
DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ.  
M.V.Z. RAFAEL PEREZ GONZALEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005

m. 340571



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JESÚS PADILLA

LIBRINA

FECHA: 09 de Noviembre de 2004

FIRMA: 

1 F20 HC . M

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en bovinos inmunizados con proteínas de filtrado de cultivo de Mycobacterium bovis, inmunomodulados con interferón gamma y BCG contra la tuberculosis de bovina.

que presenta el pasante: Jesús Padilla Urbina  
con número de cuenta: 9502639-8 para obtener el título de:  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Septiembre de 2004.

PRESIDENTE	MVZ. <u>Heriberto Contreras Angeles</u>	
VOCAL	MVZ. <u>Rafael Pérez González</u>	
SECRETARIO	MVZ. <u>Blanca Rosa Moreno Cardenti</u>	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. <u>Ramón González Pacheco</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. <u>Rigoberto Hernández Hernández</u>	

## DEDICATORIAS

### *A MI QUERIDA MADRE*

*María Elena Urbina M. como agradecimiento y homenaje a su amor, sacrificios, a su permanente confianza en mí y por darme su apoyo para que yo pudiera alcanzar una de mis metas. Te dedico este trabajo y mi profesión con todo mi amor, respeto y admiración.*

### *A MIS HERMANOS*

*Luis Y Ricardo por su apoyo incondicional y porque siempre he podido contar con ustedes en cualquier momento*

### *A MI MASCOTA*

*Loba, en memoria a un ser inolvidable en mi vida, por darnos tantas alegrías a mí y mi familia, por haber sido mi gran compañera entrañable de mi infancia, adolescencia y haber influido positivamente en mí aun en mis estudios profesionales.*

El trabajo desarrollado a continuación se realizó en el laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del INIFAP. Como parte de las Investigaciones del proyecto "Evaluación de la inmunidad protectora contra la tuberculosis bovina empleando BCG y extracto proteico de filtrado de cultivo". Este proyecto fue financiado con recursos de los proyectos D43244-Z y G-34799-B del CONACYT

## **AGRADECIMIENTOS**

- A todos los que de una u otra forma ayudaron a la realización de este trabajo, en especial al Dr. Fernando Díaz Otero, por su gran apoyo y darme la oportunidad de colaborar con él, para la elaboración de éste proyecto de investigación, gracias por su enseñanza y amistad.
- M.V.Z. Rafael Pérez González, por su gran apoyo y amistad en todos estos años, además de tu gran influencia en mi formación profesional.
- Dra. Camila Arriaga Díaz, por su confianza y apoyo económico.
- Al M. en C. Dante González, por su colaboración tan valiosa en este trabajo y por su agradable amistad.
- Al Q.F.B. Juan Jiménez, por todas aquellas veces que me apoyaste para realizar este trabajo.
- Dr. Fernando Diosdado, por su gran ayuda para la realización del análisis estadístico.
- M. en C. Laura Jaramillo, por todas sus atenciones y colaboración en todo este proyecto.
- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM, por la donación del Inóculo bacteriano de la cepa aislada de campo de *M. bovis*.
- A mis sinodales por su mejor disposición para la presente tesis.
- A la UNAM y FES-C, por la oportunidad de realizar mis estudios de bachillerato y profesionales, y permitirme ser parte de esta gran Institución.

# ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
1.1 Características de las Micobacterias	3
1.2 Epidemiología	5
1.3 Patógenia	7
1.4 Inmunidad	11
1.4.1 Perfil de citocinas	11
1.4.2 Anergia	15
1.5 Diagnóstico	16
2. VACUNAS	18
2.1 Extracto proteico de filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i>	19
2.2 Vacuna de la cepa de <i>M. bovis</i> del bacilo Calmette-Guerin (BCG).	21
2.3 Interferón- $\gamma$ como inmunomodulador	23
3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVO GENERAL	25
5. OBJETIVOS PARTICULARES	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Animales de estudio	26
6.2 Diseño experimental	26
6.3 Interferón gamma bovino recombinante como inmunomodulador	27
6.4 Vacuna del Bacilo Calmette-Guerin (BCG)	27
6.5 Obtención de extractos proteicos de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i> (CFPE's)	27
6.6 Prueba de intradermorreacción (ID)	28
6.7 Prueba de interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	29
6.8 Prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	30
6.9 Preparación del inóculo bacteriano	31
6.10 Desafío	32
6.11 Inspección post-mortem	32
6.12 Análisis estadístico	32
7. RESULTADOS	33
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	51
10. ANEXO DE REACTIVO Y FÁRMACOS	52
11. ABREVIATURAS	54
12. BIBLIOGRAFÍA	55

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar el grado de protección conferida por el empleo de la vacuna BCG, ó el extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE's) de *Mycobacterium bovis* contra la tuberculosis bovina; así como el efecto inmunomodulador del interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), en la respuesta de bovinos vacunados. Para lo cual se utilizaron 24 becerras Holstein de 8-16 meses de edad, negativas a las diferentes pruebas de diagnóstico (tuberculina, IFN- $\gamma$ , ELISA y PCR), divididas en cuatro grupos (seis animales cada grupo). El primer grupo vacunado con CFPE's de *M. bovis*; el segundo grupo con CFPE's más IFN- $\gamma$ ; el tercero con la vacuna BCG cepa Pasteur; el cuarto grupo fue control sin inmunizar. Posteriormente se revacunaron a los 21 días y a los 6 meses se desafiaron intratraquealmente con  $10^4$  UFC de una cepa de campo. A los 6 meses post-desafío se sacrificaron para evaluar el grado de lesiones. La respuesta inmune celular se monitoreo por intervalos de 21 días mediante la producción de IFN- $\gamma$ , en cultivo de células estimuladas con PPD de *M. bovis* y *M. avium*; para evaluar la respuesta humoral se efectuó un ELISA comparativo empleando CFPE's de *M. bovis* y *M. avium*. Se realizó la prueba de tuberculina previó al desafío y antes del sacrificio a todos los animales. Con respecto a la producción de IFN- $\gamma$ , los animales vacunados con BCG, mostraron los niveles más elevados, que el resto de los grupos, aunque al realizar el análisis de varianza los tres grupos vacunados mostraron diferencias significativas a ( $P < 0.05$ ) hacia plasmas estimulados con *M. bovis*, mientras que, los plasmas estimulados con *M. avium* mostraron diferencias significativas hasta la 17° semana en los grupos vacunados. En relación a la respuesta humoral el grupo inmunizado con CFPE's más IFN- $\gamma$  manifestó una mayor respuesta de anticuerpos a *M. bovis*, en está prueba no se mostró en ninguna etapa de la vacunación o desafío diferencias significativas a ( $P < 0.05$ ). Los resultados de la prueba intradérmica comparativa antes del desafío, muestra que dos animales del grupo de BCG fueron reactivos al PPD bovino; del grupo CFPE's solo uno fue; del grupo CFPE's más IFN- $\gamma$  uno fue sospechoso y del grupo control uno fue reactivo. Posterior al desafío la generalidad de los animales fueron reactivos al PPD bovino. Los animales del grupo de BCG, mostraron una disminución significativa en número y severidad de las lesiones respecto a los animales no vacunados; dos animales no mostraron ninguna lesión. También en animales Inmunizados con CFPE's y los vacunados con CFPE's más IFN- $\gamma$  presentaron disminución aunque en menor proporción. Los animales del grupo control mostraron mayor número y extensión de lesiones. Por tanto, la vacunación empleando la BCG o el CFPE's podría ser una excelente herramienta a considerar contra la tuberculosis bovina, que puede coadyuvar en el control y erradicación de ésta.

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico y progresivo, donde *Mycobacterium bovis* es el agente causal específico de la tuberculosis del ganado vacuno. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, que merman la condición física y productiva, causando pérdidas económicas de consideración. Los humanos, becerros y cerdos pueden contagiarse de tuberculosis bovina cuando ingieren leche cruda (no pasteurizada), proveniente de vacas enfermas (1).

Los humanos o animales que desarrollan este mal, por lo general son afectados con anterioridad por alguna enfermedad debilitante o que afecta directamente su sistema Inmunológico. En los bovinos se relaciona con estados de estrés prolongados, muchas veces debido a sus características de producción, esto hace más susceptible a las vacas lecheras a desarrollar tuberculosis (2).

Esta enfermedad figura dentro de la Ilista B de la Oficina Internacional de Epizootias, lo que indica que es considerada como importante por sus repercusiones socioeconómicas o de salud pública, y también por su incidencia en el comercio internacional de animales o productos de origen animal por su presencia de TB (3).

Estudios realizados indican que la fauna silvestre es una fuente importante para que se de el contagio. Se puede contraer la enfermedad por ingerir leche de sus madres infectadas, pero la vía más común de infección es a través de la inhalación del microorganismo (1).

En México uno de los principales problemas que enfrentan las cuencas lecheras, es el elevado índice de animales con tuberculosis; con prevalencias que van del 2% al 24%, lo que representa una gran merma económica para el productor por el sacrificio de animales (4).

La vacunación puede llegar a convertirse en un instrumento práctico para luchar contra la tuberculosis bovina, en países donde no pueden costear programas clásicos de control o puede resultar económicamente imposible llevar a cabo un programa de pruebas sistémicas y sacrificio de todos los animales infectados. Existen ahora modelos de confrontación, elaborados para ensayar posibles vacunas en muchas especies domésticas y salvajes, que se están utilizando para evaluar vacunas contra la tuberculosis. La mayoría de los estudios para determinar la eficacia de esas vacunas en los animales, se han concentrado en el uso de la

vacuna BCG (bacilo de Calmette y Guérin), que es una cepa atenuada de *M. bovis*. Los recientes avances en el campo de la inmunología y la biología molecular micobacteriana, han ampliado mucho el repertorio de posibles vacunas. Entre los nuevos tipos de vacuna que en el futuro van a probarse figuran las de nuevas cepas atenuadas de *M. bovis*, las de subunidades proteicas y las de ácido desoxirribonucleico recombinante. Sometidas a prueba en pequeñas especies, varias de esas vacunas han ofrecido ya resultados prometedores (5).

### 1.1 Características de las Micobacterias

Las micobacterias se han clasificado en el orden Actinomycetales; en donde *M. bovis* es parte del complejo de *M. tuberculosis*. Los bacilos son ligeramente curvados, alrededor de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo por 0.2-0.5 de ancho, son aeróbicos obligados, ácido alcohol-resistentes, pueden tñirse como Gram positivos, pero toman la tñción débil e irregular, por lo que no son clasificados como Gram positivo y se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a su estructura y composición química particular de la pared. Las cepas difieren en su tendencia para crecer como bacilos aislados o como largas hebras llamadas cordones (6).

Las micobacterias se caracterizan, por tener una pared celular completamente diferente a las restantes eubacterias; las paredes contienen un elevado contenido de lípidos (hasta del 60%), que las hacen impermeables a los agentes hidrofílicos, por lo tanto estos microorganismos no se tñen adecuadamente con los reactivos utilizados en la coloración de Gram. Las micobacterias son tñidas adecuadamente por el método de Ziehl-Neelsen, que utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico. Estos microorganismos una vez coloreados son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denominan bacilos ácido alcohol resistente (BAAR). Los microorganismos de este género contienen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica similar a las restantes eubacterias. Por encima de esta membrana se encuentra el rígido peptidoglicano (mAGP) con diaminopimelato, del cual gran parte esta adherido al polisacárido; estos que incluyen el glucano, manano, arabinogalactano y arabinomanano, se encuentran también en los filtrados de cultivo; que contiene N-glucosilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano se halla unido covalentemente al arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan fijados los ácidos micólicos que tienen cadenas carbonadas largas (C60 a C90). El lipoarabinomanano (LAM) es un compuesto que se halla anclado en la membrana

citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas, la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM), a diferencia de las cepas no virulentas. Además, el LAM también podría servir como poro para el paso de los nutrientes a través de la pared celular. En la pared celular también se encuentran proteínas inmunoreactivas que son utilizadas con fines diagnósticos. (figura 1) (7,8,9).

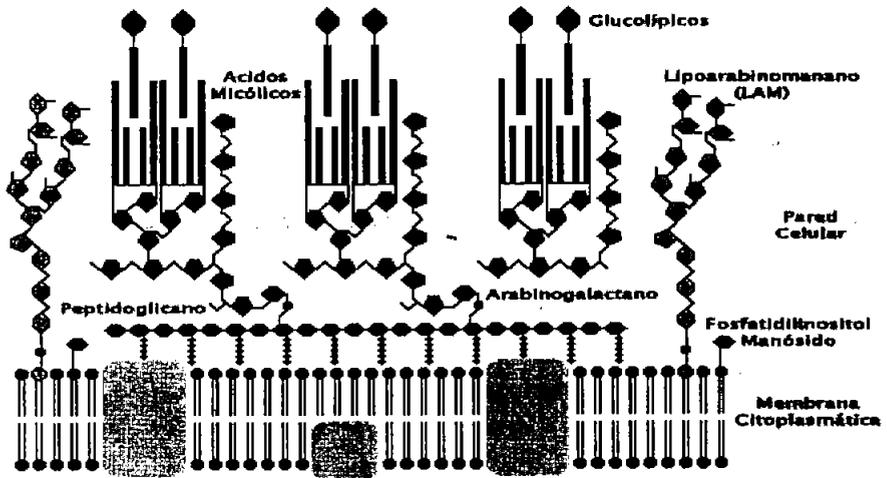


Fig. 1. Esquema de las envolturas de una eubacteria Ácido-Alcohol Resistente (7).

El mAGP es un fuerte inmunógeno, pero se desconoce mucho acerca de sus interacciones con las células del hospedero y por otro lado, se ha especulado que éste provee una barrera protectora al paso de las drogas (10). El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunoregulatoras, entre las que se encuentran la activación de las células T, inhibir la activación de los macrófagos mediada por el IFN- $\gamma$ , así como la actividad de la proteína quinasa C; también estimula la producción de citoquinas por los macrófagos, las cuales provocan muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis (11). Los glucolípidos y las proteínas se ubican en la capa externa firmemente adherida a la pared y esta ubicación externa del lípido es la responsable del carácter hidrófobo de las células.

Su crecimiento puede ser en medios sintéticos simples, con glicerol u otros componentes como única fuente de carbón y con sales de amonio como fuente de nitrógeno. El crecimiento del bacilo de la tuberculosis en los medios de cultivo ( y en los animales), es generalmente

muy lento, en medios ricos, el periodo mas corto de duplicación observado esta alrededor de 18 horas, por lo que su crecimiento en medios de cultivo no se consigue hasta la 3 o 4 semanas como mínimo, las micobacterias saprofitas crecen mas rápidamente, pero no tanto como la mayoría de las bacterias (que tienen tiempos de duplicación de hasta 20 min.) (12).

## 1.2 Epidemiología

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más diseminadas del mundo, siendo el agente causal el *Mycobacterium tuberculosis*. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que en humanos su incidencia y muertes de 1990 a 1999 son de 88 millones y 30 millones, respectivamente, (donde el 8% de estos son reportados en el continente Americano) con muchos casos en ciudades subdesarrolladas. (13,14). En Europa y Norte de América de 0.5% a 1.0 % de casos de tuberculosis humana se estiman que son el resultado de infecciones por *M. bovis*. En países en los cuales la TB es aún común, un estimado de 10 a 15% de casos humanos de tuberculosis son causados por *M. bovis*. En países industrializados donde si hay programas de control y erradicación de la TB y junto con la pasteurización de la leche se observa una reducción drástica de la incidencia de la enfermedad causada por *M. bovis*, siendo esta responsable del 1 a 6 % de los casos de tuberculosis humana (15, 16).

La tuberculosis en humanos es mas oportunista en personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), la inmensa mayoría de personas portadoras de la infección viven en ciudades subdesarrolladas sin embargo ambas infecciones se han reportado en todo el mundo; siendo la tuberculosis una seria amenaza de Salud Pública de personas en riesgo (17).

Una de las razones del porque no se ha logrado la erradicación de TB en países industrializados, ha sido la existencia de reservorios de vida libre, que varía enormemente de acuerdo al área geográfica (18).

A nivel nacional el control de la TB, se encuentra dirigida por la Dirección General de Salud Animal, dependencia adscrita a la Secretaría de Agricultura (SAGARPA), donde se menciona que la prevalencia a nivel nacional de TB en ganado de leche es de 11.1% y en ganado de carne 2.9%. En el 2002 México contaba con 30,702,115 de cabezas de ganado bovino, de las cuales el 10% corresponden a bovinos productores de leche y el 90%,

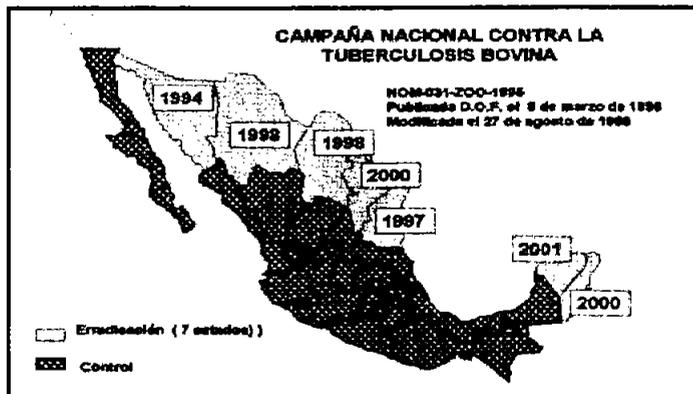
corresponden a bovinos productores de carne. En este año, el Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA), informó los casos y focos reportados tanto en bovinos como en humanos (cuadro 1), además se indican las medidas de control recomendadas por esta dependencia de la SAGARPA (18).

Cuadro 1: Información de casos reportados.

Tuberculosis bovina (SENASICA)					Casos de tuberculosis en humanos
	Focos	Casos	Muertos	Medidas de control	
bov	2258	3286	0	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Sacrificio sanitario parcial</li> <li>&gt; Declaración obligatoria</li> <li>&gt; Rastreo</li> <li>&gt; Vigilancia Epidemiológica</li> <li>&gt; Cuarentena</li> <li>&gt; Seguimiento epidemiológico</li> <li>&gt; Zonificación</li> </ul>	<p>15,622</p> <p>El número de casos registrados corresponde a diferentes bacterias y no exclusivamente a <i>M. bovis</i>.</p> <p style="text-align: right;">(19)</p>

La TB solo se encuentra en etapa de erradicación en 7 estados de la República, principalmente en los estados del norte del país y mas recientemente en la península Yucatán, en los demás estados se encuentra en etapa de control sanitario\* (figura 2)(19).

Figura 2: Avances de las campañas sanitarias contra la tuberculosis bovina



Nota (\*): **Erradicación:** Etapa en los estados en donde la enfermedad no se ha presentado por un año.  
**Control:** Etapa en los estados en donde se manifiesta la enfermedad, debiéndose aplicar procedimientos sanitarios (19).

### 1.3 Patogenia

Las micobacterias penetran en el organismo por inhalación o ingestión, en el caso de la inhalación, siendo la vía de entrada más común, las gotas de secreción respiratoria de 1 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, se inhalan y llegan a los alvéolos o sobre las mucosas de la faringe o del intestino (20). La infección por ingestión también es posible, en las praderas a través de la contaminación por heces del pasto, del agua de los bebederos colectivos o de los pesebres(21).

Una de las formas típicas de infección es a través de la toma de leche, en zonas endémicas, pero la infección mamaria solo aparece de manera tardía en la evolución de la enfermedad y es menos frecuente en países con programas de control más avanzados. Otras vías infrecuentes de transmisión, son la infección intrauterina durante el coito, el empleo de semen infectado o de pipetas uterinas de inseminación infectadas y la infección intramamaria por el empleo de sifones de ordeño contaminados o de copas infectadas en las máquinas ordeñadoras. También se han registrado casos de transmisión, cuando el personal del establo con tuberculosis genitourinaria orina en los establos (22).

Se sabe que la mayor parte, si no toda, la patología asociada a la enfermedad se debe a una respuesta inmune de tipo celular y un proceso inflamatorio exacerbados(23) (diagrama 1). Cuando la micobacteria consigue llegar al alveolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria en la que predominan los polimorfonucleares, estas células son rápidamente sustituidas por macrófagos alveolares que los fagocita, al principio le suministra el ambiente nutricional que necesita dentro del fagosoma, donde el bacilo sobrevive y se multiplica (24). Los micósidos como los fosfolípidos protegen a los bacilos frente a la destrucción de los fagocitos. Los demás lípidos son capaces de producir granulomas y, junto con las tubérculo-proteínas, favorecen la respuesta alérgica mediada por células, distintivo central de la tuberculosis (25). Estos macrófagos tienen poca capacidad para erradicar al bacilo en las etapas iniciales, quizá por que su función se ve interferida por varios factores, estudios indican que el bacilo puede inhibir la fusión fagocitosoma y que los patrones de fusión de los macrófagos infectados con el bacilo virulento, es afectado por la presencia o ausencia de componentes serológicos en el momento de la infección (26), además diversos componentes de la pared celular de la micobacteria le permite escapar de la destrucción inducida por la defensa del organismo. En primer lugar, el factor cordonal, un glucolípido de la superficie

que hace que la micobacteria crezca *in vitro* en cordones con configuraciones de serpentinas y solo lo presentan las cepas virulentas. La virulencia esta dada por la capacidad de formar cordones. Este factor inhibe la migración de los leucocitos e induce la aparición del granuloma. En segundo lugar, el LAM tiene una estructura similar a la de la endotoxina de las bacterias Gram negativas, que inhibe la activación de los macrófagos por el Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) hace que el macrófago también secreta el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- $\alpha$ ), ocasionando fiebre, pérdida de pesos y lesión tisular, en el caso de interleucina-10 (IL-10), suprime la proliferación de células T inducida por la micobacteria. En tercer lugar, el complemento activado en la superficie de la micobacteria, puede dar lugar a la opsonización de la micobacteria y facilitar su captación por el receptor CR3 del complemento existente en los macrófagos (integrina Mac-1). Así la micobacteria ocupa una posición intracelular en los macrófagos, con lo que aumenta la resistencia microbiana y en humanos dificulta la quimioterapia. En cuarto lugar, presenta una proteína de choque térmico que es intensamente inmunogénica y puede desempeñar un papel importante en las reacciones autoinmunitarias, el cual consiste en que los fagosomas que no son acidificados en los lisosomas y no puede por consiguiente degradar a la micobacteria (27).

En animales no expuestos, la multiplicación local tiene lugar cuando los macrófagos presentes, ingieren a los microorganismos. La resistencia a la destrucción por los fagocitos, permite su multiplicación continua. Alrededor del foco los microorganismos se multiplican y se desarrolla una respuesta inflamatoria en la que intervienen los macrófagos de gran tamaño. Las células hospedadoras infectadas y las bacterias, alcanzan los nódulos linfáticos regionales, en los que continúan tanto la multiplicación de los bacilos, como las respuesta inflamatorias. Transcurrida la primera semana, las reacciones inmunes mediadas por células, empiezan a modificar la respuesta del hospedador, una reacción esencialmente por cuerpos extraños pasa a ser una reacción típica de los granulomas infecciosos. Los macrófagos infectados secretan IL-12, una citocina responsable de la activación de linfocitos CD4(TH1) que producen IFN- $\gamma$ , factor de activación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de inhibición de migración (MIF); que atraen y activan macrófagos. Activados los macrófagos, adquieren la capacidad de fagocitar o destruir a la micobacteria, esta eficiencia por lo tanto depende de la adecuada respuesta inmune y de la virulencia de la bacteria. Cuando los linfocitos CD4 TH1 son estimulados como también los linfocitos T $\gamma\delta$ , lisan la micobacteria contenida en los macrófagos. Una vez que el macrófago es reconocido como infectado, es probable que ambos incrementen la expresión de proteína por el macrófago

infectado. Entre los macrófagos aparecen células epiteloides y un tercer tipo de población celular son las células Gigantes de Langhans (28).

Las células T activadas por las micobacterias, interactúan con los macrófagos en 3 formas: en primer lugar, las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> secretan IFN- $\gamma$ , que activa a los macrófagos para producir una destrucción intracelular de las micobacterias a través de intermediarios de nitrogenados como óxido nítrico (NO), óxido nítrico (NO<sub>2</sub>) y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>). Segundo, las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, destruyen los macrófagos infectados por las micobacterias y así destruyen también las micobacterias. Tercero, las células T doblemente negativas (CD4<sup>-</sup> y CD8<sup>-</sup>), lisan a los macrófagos sin destruir a las micobacterias. En consecuencia aparecen macrófagos más competentes, que inhiben la multiplicación intracelular de las bacterias al fragmentarse los macrófagos, que dificultan la multiplicación bacilar, engloban a las micobacterias y limitan su crecimiento. La lisis de los macrófagos da lugar a la formación de granulomas caseificantes (reacción de hipersensibilidad retardada) (27), dos semanas más tarde comienza la calcificación de la lesión, al centro aparece una necrosis caseosa. El foco necrótico inicial queda rodeado por tejido de granulación, macrófagos y linfocitos. Aparecen los fibrocitos y por último una capa fibrosa rodea al tubérculo. En el ganado vacuno el 90% de los casos, las lesiones pulmonares se encuentran en los lóbulos caudales (28,23).

En la primoinfección, el bacilo siempre se disemina a partir del sitio inicial, a través de los vasos linfáticos a los nódulos linfáticos regionales. Los bacilos se pueden diseminar más lejos y alcanzar el conducto torácico y la sangre, medio que a su vez disemina los bacilos a todos los órganos (distribución miliar) (30). Se conocen dos formas de infección tuberculosa: la primera corresponde a la primoinfección por el bacilo, la que se ha explicado anteriormente y la secundaria o de reactivación, que es el resultado de la reinfección exógena o de la reactivación de la infección primaria. Los granulomas de la tuberculosis secundaria suelen localizarse en el vértice de los pulmones, aunque también pueden estar diseminados en médula ósea, meninges y otros órganos. Estos granulomas no consiguen detener la expansión de la infección, son la causa principal de la lesión tisular en la tuberculosis y reflejan una hipersensibilidad de tipo retardada. Los rasgos característicos de la tuberculosis secundaria son la presencia de necrosis caseosa y de cavidades, que al romperse en los vasos sanguíneos, extienden la micobacteria por todo el organismo y cuando se abren las vías respiratorias liberan micobacterias infecciosas en aerosoles (31).



## 1.4 Inmunidad

### 1.4.1 Perfil de citocinas

Durante la respuesta inmunitaria en la tuberculosis participan una gran cantidad de poblaciones celulares, y una amplia red de mediadores solubles, el éxito en la eliminación del bacilo, depende de una correcta integración de las defensas del hospedador hacia infecciones intracelulares, involucran una respuesta inmune innata así como una inmunidad adaptativa mediada por células (32).

Una vez que el bacilo llega a pulmón, se inicia una serie de mecanismos destinados a su eliminación. Se han descrito cuatro posibles consecuencias durante el proceso infeccioso: a) la respuesta puede ser efectiva conduciendo a la eliminación y muerte del bacilo, el individuo jamás desarrollará tuberculosis clínica; b) la micobacteria no es eliminada totalmente y empieza a multiplicarse inmediatamente causando tuberculosis primaria como manifestación clínica; c) el sistema inmunitario puede impedir el crecimiento del bacilo sin causar eliminación total, esto puede sospecharse con la positividad a la prueba intradérmica de PPD y, d) los microorganismos que han estado latentes, eventualmente vuelven a multiplicarse causando reinfección (33).

Las micobacterias, dentro de las células fagocíticas, son capaces de evadir la respuesta humoral y mantener viabilidad por largos periodos de tiempo. Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos, y subsecuentemente en el control del crecimiento micobacteriano. La respuesta TH1 que constituye la respuesta inmune protectora contra *M. bovis*, es mediada por células T CD4 secretando IL-2 e IFN- $\gamma$ , algunas células T CD4 se diferencian y se convierten en células T de memoria de larga vida. En la inmunidad antimicobacteriana están involucrados diferentes grupos de células T, incluyendo las células T CD4 alfa/beta, las células T CD8 alfa/beta y las células T gamma/delta (T $\gamma\delta$ ) (34).

En la respuesta inespecífica contra la TB, las células implicadas en limitar y eliminar al bacilo son los macrófagos, los cuales han sido reclutados por citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y por quimiocinas. Estas moléculas son producidas por células epiteliales, endoteliales y macrófagos alveolares. Las citocinas proinflamatorias regulan la expresión de moléculas de adhesión como CD54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1) Y CD62-E (selectina E) en el endotelio y leucocitos, favoreciendo la migración de leucocitos circulantes al sitio de la lesión (35).

Las quimiocinas inducen la migración direccional de los leucocitos, regulando la adhesión celular, el tráfico y la activación, en la fase temprana de la infección. La IL-8 atrae neutrófilos, siendo la función de éstos contener a las micobacterias evitando su diseminación, mientras son sustituidos gradualmente por macrófagos activados. Otras quimiocinas (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, IP-10, I-TAC), dirigen la migración de monocitos y linfocitos para la formación del granuloma, el cual tiene la finalidad de restringir el crecimiento bacilar. También pueden dirigir a los linfocitos cooperadores (CD4<sup>+</sup>), hacia los sitios donde se está iniciando una respuesta de hipersensibilidad retardada que culmine con la formación del granuloma. Las quimiocinas son quenes regulan la hipersensibilidad retardada en la tuberculosis, diferenciando este tipo de respuesta de la inmunidad mediada por células, es decir, las que participan en la prevención de la diseminación del bacilo, favoreciendo la migración y activación de las células fagocíticas circulantes. Dirigiendo además, la migración de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 (36).

Otras citocinas favorecen la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1, como la IL-12 y la IL-18, producidas por los macrófagos reclutados y activados, induciendo la producción de IFN- $\gamma$  en las células NK (natural Killer); estas citocinas incrementan la actividad citotóxica de las células NK. Estas células comparten con los linfocitos TCD8<sup>+</sup> enzimas como granzima y perforina, que al ser liberados inducen la lisis de la célula blanco (37).

También se ha observado que la micobacteria puede entrar a los macrófagos a través de los receptores para las fracciones CR1 y CR3 del complemento, sugiriendo que la ruta de ingreso, puede influir en el curso de los eventos posteriores a la ingestión del bacilo por los macrófagos, dando como resultado falla en la fusión del fagolisosoma o una inapropiada explosión respiratoria y otros mecanismos citocidas. En general, se cree que la muerte e inhibición del crecimiento de los patógenos intracelulares dentro de los fagocitos mononucleares son dependientes de la fusión del fagolisosoma, debido a que en este organelo existen enzimas hidrolíticas que actúan óptimamente en un pH ácido (4.5-5.0) (38). Pero el bacilo, por su capacidad de producir cantidades significativas de amoníaco, puede evadir el ambiente tóxico dentro de la vacuola lisosomal, inhibiendo el fagolisosoma y disminuyendo la potencia de las enzimas intraliosomales vía alcalinización. Dos enzimas que pertenecen al metabolismo del amoníaco, la ureasa micobacteriana y la glutamino-sintetasa,

han sido asociadas a la interrupción de la fusión fagolisosomal y a la sobrevivencia micobacteriana (39).

El control inmunológico de la infección por *M. bovis*, esta basado en una respuesta de células T tipo 1 (TH1). La protección inmunitaria específica contra *M. bovis* se inicia tras la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, capaces de secretar IFN- $\gamma$ , pero existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos T $\gamma$  $\delta$ ; que están involucrados en la respuesta temprana, proveen una rica fuente de quimiocinas y también secretan IFN- $\gamma$  (40).

Dos tipos de respuesta inmune son producidos por este tipo de células T. La respuesta inmune de tipo 1, es asociado con inmunidad mediada por células (CMI), respuesta importante en la protección contra tuberculosis y es caracterizada por liberar de las células T numerosas citocinas principalmente IL-12 e IFN- $\gamma$ . Inversamente la respuesta inmune de tipo 2 es asociada con la respuesta humoral y no hay protección en contra de la tuberculosis. Este tipo de respuesta se caracteriza por células Th-2 produciendo IL-4, IL-5 e IL-10 (41).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> encabezan la respuesta inmunitaria protectora a través de tres mecanismos: el primero, es el reconocimiento de los antígenos de la micobacteria mediante los receptores de células T (TCR) en el contexto de la molécula de histocompatibilidad mayor (MHC) clase II, así los linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno específico, inician el segundo mecanismo el cual es la activación celular. El tercer mecanismo es la fase efectora, que consiste de un patrón específico de citocinas. Así, la subpoblación Th1 producirá grandes cantidades de IL-12, TNF- $\beta$ (Infitoxina) e IFN- $\gamma$ , promoviendo la respuesta inmune celular y la activación de macrófagos. Además, esta respuesta induce la activación y proliferación de linfocitos T $\gamma$  $\delta$  (42).

El IFN- $\gamma$  es clave en la infección por *M. bovis*. Esta citocina es producida por células CD4 y CD8 y por células NK durante la infección tuberculosa; se ha reportado la producción de IFN- $\gamma$  dependiente de IL-12 en los macrófagos alveolares infectados. En individuos con deficiencias en los genes del IFN- $\gamma$ , del receptor del IFN- $\gamma$ , están en riesgo de padecer infecciones micobacterianas graves (43). Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  puede ejercer su acción a través de los productos de los genes Nramp (natural resistance associated

macrophages protein), esta proteína transportan nitritos del citosol a los compartimentos celulares ácidos (fagolisosomas), donde son convertidos óxido nítrico. El óxido nítrico es el principal radical oxidante contra la micobacteria, de ahí que las proteínas Nramp se encuentren asociadas con la resistencia. (44)

Mientras que los linfocitos CD8<sup>+</sup> reconocen el antígeno micobacteriano en el contexto MHC-1, una vez activados estos linfocitos también producen IFN- $\gamma$ , y pueden producir lisis de las células que expresan antígeno micobacteriano. Las moléculas liberadas de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas del tipo de saponinas, que interactúan con los lípidos de la membrana, activando otras enzimas de degradación para inducir la apoptosis, este mecanismo conduce a la muerte de la célula blanco y eliminación de los bacilos intracelulares. Las células T CD8<sup>+</sup> parecen ser más cruciales en la etapa posterior de la respuesta y pueden ser importantes en controlar la fase crónica de la enfermedad (45).

En los rumiantes las células T  $\gamma\delta$ , constituyen más del 75% de las células mononucleares presentes en sangre periférica (PBMC) en animales jóvenes, mientras que en los adultos esta población se reduce al 40%, a diferencia de estos animales, en el humano esta población representa solo el 7% de células mononucleares (46).

Se ha involucrado a las células T  $\gamma\delta$  en la respuesta inmune en infecciones con *M. bovis*. Después de la infección experimental, se observan cambios en la cinética en la población de estas células en la infección temprana. En humanos y modelos murinos de tuberculosis se ha revelado que las células T  $\gamma\delta$  presentan fuerte activación (expresión de CD25), proliferación, secreción de IFN- $\gamma$  y exhiben citotoxicidad en respuesta a macrófagos infectados con micobacterias. También están correlacionadas con la aparición de las células asociadas con el desarrollo de la fase temprana de lesiones por *M. bovis*. (47)

Recientemente se ha demostrado que las células T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> en animales infectados con *M. bovis*, tienen gran actividad para una fuerte proliferación y liberación de niveles de IFN- $\gamma$  después de la estimulación *in vitro* con antígenos micobacterianos. También se ha demostrado que las células T  $\gamma\delta$  *in vivo* también tienen alta actividad sobre (CD25) en la circulación periférica de 3-4 semanas después del desafío con *M. bovis*. *In vivo* la disminución de células T  $\gamma\delta$  en ganado desafiado con *M. bovis* indica un papel para células T  $\gamma\delta$  en las Th1 predisponen a desarrollar inmunidad antimicobacteriana (48).

Es probable que las células T  $\gamma\delta$  jueguen un papel importante en la respuesta CMI, de los rumiantes particularmente en los bovinos, constituyendo una gran proporción de linfocitos circulantes. La mayoría de las células T  $\gamma\delta$  también expresan la molécula WC1, se ha observado la gran actividad de estas células en las infecciones por *M. bovis* y están involucradas en la respuesta Inmune Th1. Estas células tienen participación en la formación del granuloma, debido a que su presencia favorece el reclutamiento de monocitos; mientras que en su ausencia se desarrollan lesiones plogranulomatosas y su participación de estas células parece estar mediada por la producción de la quimiocina, proteína 1 quimioatrayente del macrófago (MCP-1) (49).

#### 1.4.2 Anergia

El estado de anergia ha sido referida como la ausencia de la respuesta celular, predominantemente TH2 y se define como la incapacidad de los linfocitos T para responder a un antígeno específico, se sabe que bajo ciertas circunstancias ocurre conforme avanza la enfermedad, posiblemente cuando la tuberculosis se ha diseminado, y la respuesta CMI ya no es detectada en el animal; entonces CMI no puede ser evaluada por la prueba de ID, pero el animal puede tener altos niveles de anticuerpos circulantes. Inicialmente los cambios patológicos son asociados con el comienzo de la respuesta CMI y la patología incrementa con el progreso de la enfermedad (figura 3) (34).

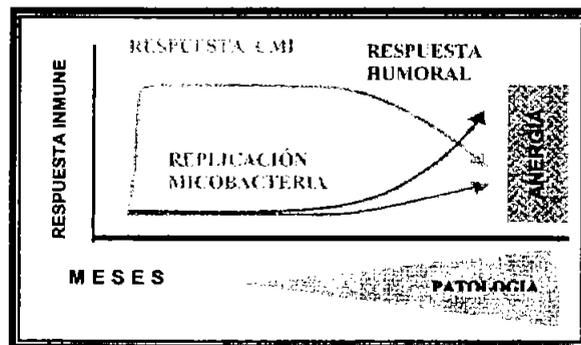


Fig. 3. Diagrama del espectro de la respuesta inmune de bovinos después de la infección con *M. bovis*. La CMI desarrolla una respuesta inicial, al incrementar número de bacilos se desarrolla la respuesta humoral (anticuerpos). El estado de anergia ocurre conforme avanza la enfermedad (34).

## 1.5 Diagnóstico

La prueba estándar para el diagnóstico de la TB es la prueba intradérmica (ID) de la tuberculina, la cual detecta una respuesta de hipersensibilidad retardada a una inyección de derivado proteico purificado (PPD) obtenido de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5. Pero su sensibilidad es insuficiente, así como su especificidad, e interfiere con el estado inmune del ganado con respecto a repeticiones de la prueba y no detecta la TB en etapas iniciales o finales de la enfermedad <sup>(51)</sup>.

Las razones para las fallas aparentes de la prueba ID bajo las condiciones de campo son complejas, tales como, la administración de corticoesteroides, infecciones con el virus de diarrea viral bovina, la influencia del estado de gestación y la lactancia. Se han realizado intentos por reemplazar la prueba ID, desarrollando pruebas serológicas (fijación de complemento, ELISA, pruebas de hemoaglutinación) pero no ha sido posible. Dentro de los problemas para emplear estas pruebas se menciona la alta proporción de infectados con pocos anticuerpos o anticuerpos no detectables hacia antígenos micobacterianos. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña nacional contra la TB, los animales reactivos a la tuberculina deben ser eliminados, sin embargo, aunque la mayoría de los animales reactivos se eliminan, algunos animales no reactivos que se encuentran en fases terminales de la enfermedad, con lesiones abiertas, permanecen dentro del hato y constituyen un foco potencial de infección para la población susceptible <sup>(52)</sup>, lo que pone de manifiesto la importancia de realizar un diagnóstico correcto.

Existe gran variedad de pruebas actualmente para el diagnóstico de la TB, pero ninguna de estas pruebas de laboratorio es el 100 % efectiva como prueba confirmatoria para detectar casos de TB. De manera resumida se muestran en el cuadro 2, las ventajas y desventajas de las diferentes pruebas más actuales para el diagnóstico de la TB, las cuales ayudan a detectar animales que no son identificados por medio de la prueba de ID <sup>(53)</sup>.

Cuadro 2. Pruebas diagnosticas empleadas para detectar TB.

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>TÉCNICAS QUE EVALUAN LA RESPUESTA CELULAR</b>		
<b>Prueba de tuberculina (ID)</b> > Simple en pliegue caudal > Doble comparativa en tablas del cuello	Combinada con el sacrificio de reactivos permite disminuir la prevalencia <1%	Mediana sensibilidad (77-87%) y baja especificidad (80-85%). Se requiere confirmar animales sospechosos
<b>Detección de Interferón-γ (ELISA de captura)</b>	Sensibilidad y especificidad mayor a la tuberculina. Empleando ambas pruebas se incrementa la sensibilidad a 95 %.	Costosa. Se usa un Kit comercial. No detecta animales anérgicos, como tampoco la prueba de tuberculina.
<b>TÉCNICAS QUE EVALUAN LA RESPUESTA HUMORAL</b>		
<b>ELISA comparativa (se usa PPD bovino ó aviar como antígenos). Se puede usar proteínas puras o CFPE</b>	Identifica animales anérgicos, no reactivos a la tuberculina. Muy económica. Menor manejo de los animales.	Baja sensibilidad, no identifica a todos los animales infectados, por lo tanto no se puede utilizar como única prueba de diagnóstico
<b>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>		
<b>PCR anidada (se amplifica el gen de la MPB 70)</b>	Alta sensibilidad. Se realiza con distintas muestras: tejido, leche, sangre, exudado nasal. Menor manejo de los animales En combinación con ELISA permite identificar animales infectados, no identificados con la prueba de la tuberculina.	Tiene alta sensibilidad, pero puede tener reacciones inespecíficas. No se recomienda como prueba única de dx. Es costosa. Requiere un laboratorio equipado y con gente entrenada en estas técnicas.
<b>PCR en tejidos embebidos en parafina (amplifica la IS6110)</b>	Confirma la presencia de micobacterias en lesiones observadas en rastro en pocos días, a diferencia del cultivo que requiere por lo menos 4 o 6 semanas.	Requiere un laboratorio equipado y con gente entrenada en estas técnicas.
<b>Spoligotyping (se amplifica la región DR)</b>	Se realiza con muestras clínicas como exudado nasal o en muestras de tejidos frescos. Detecta y caracteriza la micobacteria. Al combinar con ELISA permite identificar animales infectados, no identificados con la prueba de la ID. Permite distinguir distinguir si es <i>M. bovis</i> .	Es costosa. Requiere un laboratorio equipado y con gente entrenada en estas técnicas. No se recomienda como prueba única de diagnóstico.

## 2. VACUNAS

La vacunación en ganado contra la TB puede llegar a ser una importante estrategia de control de la enfermedad. Los avances en el estudio de los procesos involucrados en la respuesta inmune protectora hacia la infección por *M. bovis* y avances en las técnicas de biología molecular, junto con la complementación de la secuencia del genoma de *M. bovis*, pueden proveer oportunidades racionales para desarrollar y mejorar nuevas vacunas para la TB. Se han estudiado numerosos tipos de vacunas incluidas las basadas en microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos, subunidades vacúnales compuestas por proteínas purificadas, antígenos peptídico y de polisacáridos y vacunas de DNA, pero por ahora están en desarrollo y se están ensayando en el ganado (54).

Es necesario para que el proceso de elaboración y ensayo de nuevas vacunas resulte coherente, que antes se entiendan bien los procesos que intervienen en la respuesta inmunitaria protectora frente a la tuberculosis.

Los requerimientos de calidad para vacunas destinadas para la prevención de tuberculosis, en los animales domésticos se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3: Requerimientos de calidad para nuevas vacunas de TB.

REQUERIMIENTOS DE CALIDAD	BOVINOS	FAUNA SILVESTRE
Prevención de la infección en animales vacunados	+++ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>
Altos niveles de protección inducida	+++	++
Prevención de la transmisión	+++	+++
No interfiera con pruebas diagnósticas como la ID	+++	+
Segura para los humanos	+++	++ <sup>c</sup>
Mínima reacción en el sitio de inyección	+++	+/- <sup>d</sup>
Buena distribución en mucosas	+/-	+++
Una sola dosis	+	++
Aceptada en ciudades que importan carne y productos lácteos	+++ <sup>a</sup>	-

+++ muy importante

++ moderadamente importante

+ importante

+/- poco importante

a. esencial

b. útil

c. deseable

d. no necesaria

(55)

## 2.1 Extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis*.

Dentro de los posibles candidatos para ser evaluados como vacunas, están los preparados de filtrados de cultivo, que contienen proteínas de *M. bovis* ó *M. tuberculosis*, estos son buenos estimulantes de células T, en ratones y ganado, experimentalmente infectados con tuberculosis. Algunos estudios han demostrado una protección potencial de antígenos contenidos en filtrados de cultivo (56).

Estudios realizados en ratones y cobayos inmunizados con proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se han observado que pueden inducir altos niveles de protección, contra desafíos aerógenos con *M. tuberculosis* y *M. bovis*. El concepto de usar proteínas específicas que estimulen una respuesta inmune protectora para la tuberculosis, es que no inducen reacción a la prueba de tuberculina y la efectividad de la vacuna, puede no ser influenciada por previa sensibilización de micobacterias ambientales. Sin embargo, la protección contra enfermedades micobacterianas requiere de inducir una fuerte respuesta inmune celular y es esto difícil de lograr en ganado, usando este tipo de proteínas específicas si no se usa un correcto coadyuvante (54).

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados son proteínas solubles, entre las que destacan aquellas secretadas activamente en el medio de cultivo. Se han identificado proteínas inmunodominantes de cepas vacúnales, en cobayos inmunizados algunas de las cuales podrían estar ausentes en micobacterias patógenas del complejo *M. tuberculosis*. Así mismo, se ha demostrado que existen proteínas preferentemente expresadas por aislados de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en comparación con cepas vacunales (57).

Numerosas proteínas micobacterianas han sido aisladas y caracterizadas, algunas de las cuales se encuentran asociadas a la célula bacteriana y otras son secretadas. Los antígenos específicos que evocan la inmunidad protectora por los linfocitos Th1, aún no son completamente conocidos; sin embargo, se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas; esta observación se ha utilizado como argumento para sostener que los antígenos secretados presentes en los extractos de filtrado de cultivo (CFPE's) micobacterianos, producidos por el metabolismo activo bacteriano, son esenciales para la inducción de una inmunidad protectora. Existe una fuerte evidencia de que los

antígenos del CFPE's, son altamente reconocidos durante la infección en varios modelos animales; y varias de las proteínas que los constituyen evocan una respuesta en estados tempranos de la tuberculosis pulmonar en los bovinos y en el humano (58).

Por otro lado, se ha encontrado que en los extractos proteicos de filtrado de cultivo, obtenidos a partir de tiempos cortos de crecimiento (ST-CFPE), están presentes numerosos componentes, varios de los cuales también son reconocidos en las etapas tempranas de la infección por *M. bovis* en bovinos (59).

En el humano se ha observado, que en pacientes con una tuberculosis mínima, existe una fuerte respuesta celular reactiva a proteínas del ST-CFPE; principalmente dirigida a proteínas comprendidas en el rango de los 5 a 35 kDa. Observaciones similares hicieron Welding y col (60); quienes caracterizaron recientemente seis proteínas de bajo peso molecular a partir del filtrado de cultivo (CFPE's) de *M. tuberculosis*; las proteínas designadas como CFPEP17, CFPEP20, CFPEP21, CFPEP22, CFPEP25 y CFPEP28, fueron capaces de estimular la producción de IFN- $\gamma$  en cantidades significativas e inducir una fuerte respuesta celular. Uno de los antígenos ampliamente estudiados y descritos en *M. bovis*, es la proteína MPB70, la cual exhibe una alta especificidad de especie y ha mostrado ser un antígeno inmunodominante de *M. bovis*, capaz de inducir una inmunidad celular, estimular una respuesta linfoproliferativa e inducir la producción de anticuerpos en animales infectados por *M. bovis*. La proteína es una de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera forma parte del componente activo del PPD bovino (61).

Además, de las proteínas mencionadas, existe información de la presencia de proteínas secretadas de bajo peso molecular, que no son producidas por la cepa vacunal BCG, pero si por cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*, las cuales se ha observado, son altamente reconocidas en las fases tempranas de la infección y principales blancos de las diferentes poblaciones de células T, capaces de inducir una elevada producción de IFN- $\gamma$ , lo que las ha hecho blanco de atención para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y antígenos potenciales para nuevas vacunas, tal es el caso de la ESAT-6 (62).

## 2.2 Vacuna de la cepa de *M. bovis* del bacilo Calmette-Guerin (BCG).

La vacuna con BCG esta preparada con bacterias vivas liofilizadas, se ha obtenido de una serie de pases de una cepa virulenta atenuada de *M. bovis* y se ha utilizado para prevenir la tuberculosis humana desde 1921, es muy eficaz para prevenir la tuberculosis en infantes; pero esta eficacia se ve limitada contra enfermedad pulmonar en adultos en áreas endémicas (63).

Los investigadores franceses Calmette y Guérin, desarrollaron a principios del siglo pasado, a partir de una cepa de *M. bovis*, que fue originalmente aislado por Nocard de una vaca con mastitis tuberculosa. En 1906 los subcultivos de esta cepa fueron cultivadas en medio de papa glicerinizada a la que le añadieron bilis bovina. Después de 232 pases se noto un cambio en la morfología de la colonia, además de variar la virulencia. Después de replicarla durante 13 años en ganado, cobayos, ratones, monos y chimpancés, con esta cepa no produjo ninguna evidencia de reversión en la virulencia, pero en cambio confería resistencia después de 30 días, al desafiar a humanos con bovinos enfermos con tuberculosis, dando así origen a la BCG Calmette y Guerin concluyeron que una inmunización con una dosis única de 50 mg y 100 mg de BCG, protegieron al ganado de infecciones naturales y experimentales, pero la protección no era de larga duración. Además se reveló que la inmunización intradérmica era preferible a la inmunización por la ruta intravenosa; y que la revacunación no tiene ningún efecto (64).

Fue hasta la década de los 20' del siglo pasado donde Calmette y Guérin, intentaron eliminar la tuberculosis de una manada infectada por medio de la vacunación de recién nacidos con la BCG, al ser sacrificados estos animales se encontraron ser libres de tuberculosis, la desventaja de este experimento fue que carecieron de controles apropiados (65).

Durante la década de los 40', se realizaron estudios de vacunación con *M. bovis* BCG en un ganado con 150 animales infectados. El ganado fue vacunado con BCG dentro de los primeros 10 días de nacido, en 6 meses y luego anualmente con BCG sobre un periodo de 5 años. Después de la vacunación fue dada únicamente a animales recién nacidos. Las pérdidas de la infección y re-infección y el problema de la interferencia con pruebas de piel llevaron a la conclusión que el uso de una prueba y programa de sacrificio fue más económico que continuar con la vacunación (66).

En la década de los 50', Govorov usa la BCG en ranchos en donde existía tuberculosis aparente por largo tiempo y obtiene alguna protección con una dosis de 4mg de BCG administradas en dos dosis intradérmicas con un mes de intervalo entre una vacunación y otra (67).

Después de algunas décadas de ensayos en diferentes ciudades, se concluyó ser inefectiva la vacuna en contra de la infección natural, aunque la vacuna pudo proteger al ganado de infecciones experimentales. La incapacidad de la BCG para conferir una inmunidad absoluta, fueron reconocidos con el tiempo. Las micobacterias virulentas fueron obtenidas en nódulos linfáticos cercanos al punto de entrada, formando un tubérculo pero no mostró tendencia a formar lesiones extensivas en otras partes del cuerpo. Fue a partir de la década de los 70's cuando se implementaron programas de sacrificio de los animales positivos dando resultados dramáticos y los estudios de vacunación fueron grandemente acortados, en países como Canadá, Estados Unidos de América, Gran Bretaña (5).

Recientes estudios con BCG se han optimizado directamente la eficacia de la BCG y se ha utilizado en estudios como control positivo en otras vacunas de tuberculosis. Una serie de experimentos en los pasados diez años indica que, una o dos dosis de BCG ( $10^4$ - $10^6$  UFC) administradas subcutáneamente en becerros recién nacidos induce niveles significativos de protección contra desafíos con *M. bovis* virulentos. La vacunación de animales con BCG, al nacimiento tienen una eficacia del 100% de protección contra el desarrollo de lesiones macroscópicas, cuando son vacunados a las 6 semanas tiene una eficacia del 90%. (68).

La falla aparente de la BCG para proteger al ganado puede ser atribuidos a numerosos factores. Altas dosis de BCG equivalentes a  $10^8$ - $10^6$  UFC (unidades formadoras de colonias) fueron generalmente usadas para la vacunación subcutánea en el ganado; ahora se sabe que estas dosis pueden ser menos efectivas que las dosis bajas para estimular una protección inmune (55). La vacunación a menudo funciona en zonas de alta prevalencia, pero los recién nacidos pudieron haber sido expuestos a *M. bovis* previa a la vacunación a través del consumo de leche de vacas con mastitis tuberculosa (23).

Se han propuesto algunas razones de su limitada eficacia, varias se ven influenciadas por infecciones anteriores de micobacterias ambientales, a la ausencia de antígenos protectores contra *M. tuberculosis* (66). Comparando el genoma se han encontrado mas de 100 secuencias de códigos ausentes en la BCG pero que están presentes en *M. tuberculosis*, el agente principal de la tuberculosis en humanos (70).

## 2.3 Interferón- $\gamma$ como inmunomodulador

La inmunomodulación consiste en la manipulación del sistema inmunológico a través del uso de sustancias de origen biológico o químico para producir una respuesta inmune adecuada al estado que se desea tratar. La finalidad será aumentar la intensidad de la respuesta, principalmente de tipo celular (71).

El uso de inmunomoduladores en animales domésticos tiene como objetivos:

- La producción de una respuesta más intensa y efectiva contra agentes productores de enfermedades clínicas y subclínicas.
- Acelerar la maduración de la inmunidad específica e inespecífica en animales neonatos, jóvenes y susceptibles de infecciones.
- Provocar reacciones inmunes intensas en tejidos y órganos linfoides, invadidos por microorganismos, con la finalidad de incrementar la respuesta protectora en sitios como glándula mamaria, tracto gastrointestinal, respiratorio, etc.
- Incrementa la respuesta inmune específica, celular, y humoral, a través de la vacunación.
- Reducir los efectos de inmunosupresión, causada por el estrés o agentes infecciosos que interfieren en el funcionamiento de las células del sistema inmune o que producen infecciones permanentes.
- La estimulación selectiva de componentes de la inmunidad específica o inespecífica que conlleve a una protección contra la replicación de los agentes patógenos. (72)

Dentro de los inmunomoduladores considerados más importantes se encuentran los interferones (IFN), son una familia de proteínas producidas por las células nucleadas en respuesta precoz, anterior incluso a la respuesta antigénica, a las infecciones víricas u otros estímulos (bacterias, endotoxinas, mitógenos). Existen tres tipos de IFN: IFN alfa (producido por los linfocitos b y los monocitos en respuesta a las infecciones víricas), IFN beta (producido por fibroblastos en respuesta a infecciones víricas, particularmente a virus RNA bicatenarios), IFN- $\gamma$  (producido por las células T colaboradoras, en respuesta a varios antígenos y mitógenos). Los IFN poseen además de su acción antiviral, efectos biológicos notables, como la modulación de la respuesta inmune y acciones antiproliferativas. La acción inmunomoduladora, está en relación con una estimulación de la actividad fagocitaria de los macrófagos, la inducción en cascada de

citocinas, mediadoras de la activación del sistema linfocitario, y la maduración y activación de los linfocitos T citotóxicos (73).

Por otro lado, estudios realizados en modelos animales y en el humano muestran que la administración exógena de IFN- $\gamma$ , al momento de la inmunización incrementa la respuesta inmune celular, comprometida en la eliminación de bacterias intracelulares, debido a que se favorece tanto la presentación antigénica, como una mayor activación y proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> específicas y células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, entre otras funciones (74).

Como se menciona antes, los estudios que se han realizado a fin de determinar cuales son los antígenos micobacterianos inmunorelevantes a los que va dirigida la respuesta inmune, indican que estos se encuentran principalmente en las proteínas presentes en el filtrado de cultivo, así es factible que el empleo de CFPE's como inmunogeno estimule una respuesta inmune significativa en los bovinos inmunizados, la cual puede incrementarse con la aplicación exógena del IFN- $\gamma$ , lográndose reducir con ello el número de lesiones tuberculosas al desafío. Además de evaluar los niveles de protección que puede inducir la vacuna BCG en bovinos a una dosis baja.

### **3. HIPÓTESIS**

Las proteínas presentes en el filtrado de cultivo de *M. bovis* son antígenos relevantes, capaces de inducir una respuesta inmune protectora que se puede incrementar con la aplicación exógena de IFN- $\gamma$ , citocina que favorece la respuesta celular, necesaria para la eliminación de las bacterias intracelulares y de estimular una Inmunidad de memoria prolongada; así la inmunización de bovinos con extractos proteicos de filtrado de cultivo ofrecerá una mejor protección contra la enfermedad. Así como el uso de la BCG a bajas dosis en los bovinos, brindará una protección e inducirá reducir con ello el número de lesiones tuberculosas.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficacia de la BCG y del extracto proteico de cultivo (CFPE's) de *M. bovis* como inmunógeno para la prevención de la tuberculosis bovina y el efecto inmunomodulador que tiene el IFN- $\gamma$  para potenciar la respuesta inmune hacia la enfermedad.

### **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Inmunizar y comparar la respuesta inmune entre los bovinos inoculados con CFPE's, con los bovinos inoculados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , BCG y el grupo control.
2. Determinar la cinética de la respuesta inmune mediada por células y humoral en los grupos de animales inoculados y en el grupo control.
3. Determinar y comparar la protección ofrecida en los diferentes grupos por la inmunización en los diferentes tipos de vacunación por medio de la inspección de lesiones macroscópicas al momento del sacrificio.

## 6. MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Animales de estudio

Se utilizaron un total de 24 becerras Holstein de 8-16 meses de edad, adquiridas en hatos que estuvieran bajo control sanitario, los cuales fueron evaluados por pruebas de tuberculina, IFN- $\gamma$ , ELISA y PCR de moco nasal. Para determinar su estado de animal libre de la enfermedad. Todos los animales contemplados en este experimento fueron negativos a todas las pruebas

Las 24 becerras fueron alojadas dentro de las instalaciones del CENID-Microbiología-INIFAP, donde permanecieron un periodo de adaptación de 3 semanas, en los primeros 7 días recibieron tratamiento de antibiótico por 3 días y vitamina A, D, E (Anexo 1), a una dosis de 3-5 ml de acuerdo a su peso vivo, como preventivo a la Fiebre de Embarque que se pudiera desencadenar. Los medicamentos empleados fueron los siguiente:

FARMACO	Nº IDENTIFICACIÓN DEL ANIMAL
NUFLOR	5, 8*, 9*, 12, 13*, 18*, 24.
ERICLOR T	2, 3, 4, 6*, 8, 11, 14*, 15, 17, 20, 21*.
FORMICINA	1, 7, 10, 16, 19, 22, 23, 24

Los medicamentos fueron aplicados durante 3 días.

\*En estos animales se aisló *Pasteurella haemolytica*.

Durante este periodo de adaptación a los 12 días se desparasitaron con PARZEN, Albendazol al 10% (Anexo 1). La dosis aplicada fue según su peso corporal.

Al término del periodo de adaptación todos los animales fueron vacunados contra Rhinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI<sub>3</sub>), Diarrea Viral Bovina (DVB) y Enfermedad Respiratoria Sincitial (VRSB). (Cattle Master 4; con Reg. SAGAR B-0001-007 elaborada por Pfizer S.A. de C.V.). Posteriormente fueron revacunados a los 15 días, con la misma vacuna.

### 6.2 Diseño experimental

Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos, de 6 animales cada grupo, los cuales estuvieron estabulados durante el monitoreo de la respuesta inmune. El grupo 1 fue inoculado subcutáneamente en el cuello con 2 dosis de 300 mg del CFPE's a intervalos de 3 semanas entre dosis. Los animales del grupo 2 se inocularon igual con 2 dosis del CFPE's, pero además recibieron 200 ng de IFN- $\gamma$  bovino recombinante vía subcutánea el cual se

administró dos días antes que los animales fueran inoculados con el CFPE's y se aplicó la misma dosis de IFN- $\gamma$  bovino recombinante. El grupo 3 fue vacunado con *M. bovis* BCG. Los animales del grupo cuatro representa al grupo control y se inocularon con PBS como placebo.

### 6.3 Interferón- $\gamma$ bovino recombinante como Inmunomodulador

El interferón gamma bovino recombinante utilizado es distribuido por Serotec product data sheet, venia en una presentación de 1 ml de agua destilada estéril; para reconstituirse el producto liofilizado, el cual fue obtenido de pasajes de sobrenadante de cultivo de tejidos de *E. coli* con expresión de IFN- $\gamma$  bovino recombinante – liofilizado. Su concentración aproximada fue de 300 ng/ml de IFN- $\gamma$  bovino recombinante.

Nota: la aplicación funcional de este producto no ha sido ensayada.

### 6.4 Vacuna BCG.

La vacuna viva liofilizada de BCG, que se aplico fue una cepa danesa atenuada de *M. bovis* (siembra Mérieux derivada de la cepa 1077 para uso intradérmico), registrada por el laboratorio "Aventis Pasteur S.A". Para 0.1 ml de vacuna reconstituida, su composición fue la siguiente:

- Polvo para suspensión inyectable:
  - Gémenes reviviscibles (partículas cultivables de bacilos vivos atenuados, siembra Mérieux derivada de la cepa 1077), entre 800 000 y 3 200 000 UFC.
  - Excipientes: Dextran – Glucosa – Triton WR 1339 – Albúmina humana
  - Solvente: agua para preparaciones inyectables cbp 0.1 ml.

Esta vacuna es conforme a las normas de la O.M.S.

### 6.5 Obtención de extractos proteicos de filtrado de cultivo de *M. bovis* y *M. avium*.

La cepa de micobacteria que se empleo en este estudio fue *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4. Los sobrenadantes de cultivos fueron donados por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE); el procedimiento para la obtención de los sobrenadantes, fue el siguiente; los cultivos se incubaron a 37° C durante 6 semanas, las proteínas presentes en los filtrados de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio  $[(NH_4)_2 SO_4]$  a una saturación final del 80 %, con agitación constante a 4° C por 24 horas. Al término de este tiempo, la solución se centrifugó a 4° C por 60 minutos a 10 000 r.p.m. (Beckman rotor JS-13.1),

para empaquetar el precipitado, el cual fue resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, posteriormente se dializó exhaustivamente contra PBS, en bolsas de diálisis (Spectra/Por No 3787-D40), con punto de corte de 12 a 14 kDa, a 4° C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Después del dializado se comprobó la ausencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  agregando cloruro de bario. El material así obtenido se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína de los CFPE's se determinó por el método de Bradford, para fines prácticos esta concentración se ajustó a 35.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína y se dividió en alícuotas de 1 ml, las cuales se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su empleo (75).

## 6.6 Prueba de intradormorreacción (ID)

La evaluación de la respuesta inmune celular *in vivo*, se realizó por medio la respuesta de hipersensibilidad tipo IV (respuesta tardía) doble comparativa (ID); con las tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña, inoculando en las tablas del cuello de lado derecho, el PPD aviar en la parte superior (cepa D4) y PPD bovino en la parte inferior (cepa AN5), de todos los animales experimentales, a los 6 meses después de ser inmunizados y antes de llevar a cabo el desafío de los animales. Ya desafiados los animales y antes de ser sacrificados se realizó nuevamente la prueba de ID de la misma manera, en las tablas del cuello pero del lado izquierdo.

El procedimiento de la tuberculinización fue el siguiente: el primer paso fue rasurar las dos diferentes áreas de inoculación, con 15 cm aproximadamente de distancia entre una y otra zona, se levanto el pliegue de la piel en el centro de las áreas rasuradas y se midió el grosor de esta utilizando un cutímetro (vernier) registrando estos valores en milímetros. La lectura de la prueba se realizó a las 72 +/- 6 horas, midiendo con el vernier el grosor de las reacciones, estas fueron anotadas, restando el valor de la primera lectura al de la segunda.

En cuanto a la interpretación de la prueba intradérmica comparativa, suele definirse el resultado positivo como una reacción positiva a la tuberculina bovina y un engrosamiento provocado por ésta superior en 4.0 mm al que produce la tuberculina aviar. El resultado se considera dudoso si la reacción a la tuberculina bovina es positiva pero el aumento de espesor es entre 1 y 4.0 mm superior al de la reacción aviar. La prueba se considera negativa cuando la reacción de la tuberculina bovina sea negativa o, aún siendo positiva, el engrosamiento sea igual o menor que el provocado por una reacción positiva a la tuberculina aviar. Lineamientos establecidos en la NOM-031-ZOO-1995.

## 6.7 Prueba de Interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) (Inmunidad celular).

La evaluación de la respuesta inmune de los animales, se monitoreo evaluándola a intervalos de 3-4 semanas durante el transcurso del experimento. La respuesta inmune celular se determinó cuantificando los niveles de IFN- $\gamma$ ; la prueba se le realizó a todos los animales, empleando un kit comercial (BOVIGAN™ Bovine Gamma Interferon Test), esta técnica es una medida de la inmunidad mediada por células y se basa en la estimulación *in vitro* de linfocitos de sangre heparinizada, usando como antígenos derivados proteicos purificados (PPD) de *M. bovis* y *M. avium*. Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocito T circulantes presentes en la muestra secretan IFN- $\gamma$ , que es medido mediante una prueba de ELISA de captura (76).

Se obtuvo una muestra de 7 ml de sangre de la vena caudal de los 24 bovinos en tubos con vacío y con heparina. Las muestras de sangre fueron cultivadas siguiendo el protocolo de Rothel et al (1990). Se estableció cuatro cultivos de 1.5 ml de sangre heparinizada de cada animal, en placas de cultivo de 24 pozos. Cada cultivo fue estimulado con 100  $\mu$ l de PPD bovino (20  $\mu$ g/ml), 100  $\mu$ l de PPD aviar (20  $\mu$ g/ml), 10  $\mu$ l de concanavalina A (Con A) (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y un pozo sin estimular como testigo. El cultivo se realizó durante 24 horas, en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Una vez finalizado el cultivo, se obtuvo el plasma y fue depositado en microtubos y congelados a -70°C hasta la realización de la prueba de ELISA para detectar el nivel de IFN- $\gamma$ .

Para la prueba de IFN- $\gamma$  se se adicionaron 50  $\mu$ l de diluyente a la placa (amortiguador diluyente para plasma). Después se adicionaron 50  $\mu$ l de muestras problemas y control a los diferentes pozos que contenían diluyente, las muestras control se adicionaron al final de cada placa y se mezcló el contenido de cada pozo. Se incubaron a una temperatura de 25°C +/- 5°C durante 60 minutos +/- 5 min. Se retiró el contenido y se realizaron 6 lavados, se colocó la placa sobre papel filtro y se permitió que se secase. Se adicionaron 100  $\mu$ l de conjugado (anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  bovino), preparado minutos antes con el amortiguador diluyente para conjugado y se colocó a cada pozo. Se cubrieron las placas y se incubaron a una temperatura de 25°C durante 60 minutos. Se realizó el lavado de la misma forma que el anterior lavado y se adicionaron 100  $\mu$ l del cromógeno tetrametilbencidina (TMB), preparado con amortiguador enzima-sustrato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se cubrieron las placas protegiéndolas de la luz y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Después se adicionaron 50  $\mu$ l de solución de paro

(0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a cada pozo. La lectura de la absorbancia a 450nm se realizó dentro de los 5 min de terminada la reacción. Los valores de la absorbancia fueron usados para calcular los resultados y la interpretación de los resultados fueron graficados por grupos (76,77,78).

### 6.8 Prueba de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Inmunidad humoral).

La prueba de ELISA, se basa en una reacción antígeno-anticuerpo en la que una de las fases reaccionantes está inmovilizada en una superficie sólida. La unión antígeno-anticuerpo se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima. Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA que permiten aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba (ELISA indirecto, de captura, de competición, sándwich, etc.). Esta prueba tiene muchas ventajas como el estudio de muchas muestras y en un tiempo relativamente corto, permite el estudio en diferentes fluidos y se considera de bajo costo; pero al igual que otras técnicas, cuenta con desventajas como la necesidad de esperar varios días tras la infección para detectar una respuesta de anticuerpos, puede haber reacciones cruzadas. (71)

Se evaluó la respuesta humoral de los animales determinando los niveles de anticuerpos hacia los antígenos micobacterianos, mediante la prueba serodiagnóstica de ELISA comparativa, empleando CFPE de *M. bovis* y *M. avium* como antígeno en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, a intervalos de 3-4 semanas durante el transcurso de todo el experimento. Se utilizó suero, colectando sangre de la vena caudal de los 24 bovinos en tubos de 7.5 ml con vacío. La prueba se realizó de la siguiente manera: las placas fueron sensibilizadas con 5 µg de CFPE's de *M. bovis* y *M. avium* por separado en 100 µl de solución de pegado (Buffer de Carbonatos pH 9.6) (Anexo 1) por pozo. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se descartó la solución. Se añadieron 100 µl de solución bloqueadora (3% de leche en polvo descremada en PBS y 0.1% Tween 20) (Anexo 1), incubado por 1 hr a 37°C. Se lavaron 5 veces con solución de lavado (PBS con 0.1% de Tween 20) (Anexo 1). Posteriormente se añadieron 100 µl por pozo de cada suero diluido 1:50 en solución bloqueadora y se incubaron 1 hr, en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Se descartó la solución y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Enseguida se agregó a cada pozo 100 µl de proteína G conjugada con peroxidasa diluido 1:10 000 en solución bloqueadora, se dejaron incubar 1hr, en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C, se descartó la solución y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Inmediatamente se añadió a cada pozo 100 µl de solución de revelado ( 10

ml/placa de Buffer de Citratos pH 4.5, 4 mg de orto-fenilendiamina y 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Anexo 1). Se paró la reacción a los 10 min. mediante la adición de 50  $\mu$ l por pozo de solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M). Las lecturas se realizaron a 492 nm y la interpretación de los resultados fueron graficados por grupos.

### **6.9 Preparación del Inóculo bacteriano para el desafío.**

El cultivo y la cuantificación del inóculo bacteriano se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM, partiendo de una cepa aislada de campo *M. bovis*. La cepa fue designada como la N° 9930 con una concentración de  $7.8 \times 10^5$  UFC/ml fue ajustada a  $10^4$  UFC/ml para el desafío intratraqueal. Esta inicialmente se cultivó en placas de petri con agar Middlebrook 7H11 enriquecido con 10% de OADO (medio de enriquecimiento catalasa-dextrosa). Se tomaron de 3 a 5 colonias con características morfológicas semejantes y se sembraron en 15 ml de caldo Middlebrook 7H9 con 1% de OADC y 0.5 g/l de Tween 80 (para dispersar las bacterias), el cual se incubó en un periodo de 8 días a 37°C en agitación constante a una velocidad de 100 r.p.m. Al final de la incubación el cultivo bacteriano fue transferido a un matraz con 135 ml de medio fresco para incubarlo en las mismas condiciones durante 11 días tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento.

La cosecha se realizó a partir del cultivo bacteriano, el cual se centrifugó en tubos de polipropileno de 50 ml durante 15 minutos a 3300 X g lavando 2 veces con PBS 1X (cbp 50 ml). El paquete celular se resuspendió en 11 ml de medio Complet Roswall Park Memorial Institute (RPMI-1640) con 15% de suero fetal bovino (SFB), y se paso dos veces a través de una aguja de calibre 29 G X 13 mm utilizando una jeringa con el propósito de dispersar los agregados bacterianos. La suspensión bacteriana fue fraccionada en microtubos con un volumen de 1 ml y se almacenó a -80°C hasta su empleo.

Para la cuantificación de las UFC (unidades formadoras de colonias), se tomó una alícuota del inóculo preparado, se descongeló, incubándola a una temperatura de 37°C durante 40 minutos en baño María. Se realizaron diluciones décuples seriadas (450  $\mu$ l de diluyente y 50  $\mu$ l de soluto), sembrando 100  $\mu$ l en placas de agar 7H11 a partir de la dilución  $10^{-3}$  a la  $10^{-5}$  por triplicado. Las placas se incubaron durante 3 a 4 semanas a una temperatura de 37°C. El conteo de las UFC se realizó obteniendo la cantidad de UFC por ml, aplicando la siguiente ecuación.

$(UFC)(FD)(10) = \text{bacterias/ml}$

FD= factor de dilución

#### **6.10 Desafío.**

Los animales de los diferentes grupos incluyendo el grupo control fueron desafiados intratraquealmente, a los seis meses después de haber sido inmunizados, el desafío se realizó con una dosis de  $10^4$  UFC de la cepa virulenta de *M. bovis* No. 9930, aislada de casos clínicos. Para ello los animales fueron inoculados directamente en traquea por medio de una aguja de calibre 18 con la cepa virulenta. Se tomaron muestras de sangre de los animales periódicamente para continuar con la evaluación de las respuesta inmune tanto humoral como celular, la evaluación continuó hasta el momento del sacrificio, que se efectuó a los 5-6 meses después del desafío, bajo condiciones humanitarias.

#### **6.11 Inspección post-mortem.**

Los animales fueron sacrificados humanitariamente utilizando la pistola de émbolo oculto, cada semana un grupo diferente. Se realizó la necropsia haciendo una inspección minuciosa para determinar la presencia, extensión y grado de las lesiones tuberculosas, o ausencia de las mismas. Se tomaron muestras de diferentes órganos y tejidos, principalmente pulmón donde se examinó individualmente cada lóbulo, así como de los nódulos linfáticos de cabeza, viscerales y de la canal, para evaluación de las lesiones macroscópicas; como se muestra en la tabla 7.3.

#### **6.12 Análisis estadístico**

Se analizaron los datos empleando un paquete estadístico del programa SIGMA STAT versión 4. El método seleccionado fue la prueba de Dunnett para realizar las análisis de varianza de los resultados, con la finalidad de ver si existía diferencias estadísticamente significativas, evaluando el primer muestreo de los animales antes de vacunar, contra los siguientes muestreos de animales vacunados y desafiados de cada grupo inmunizado.

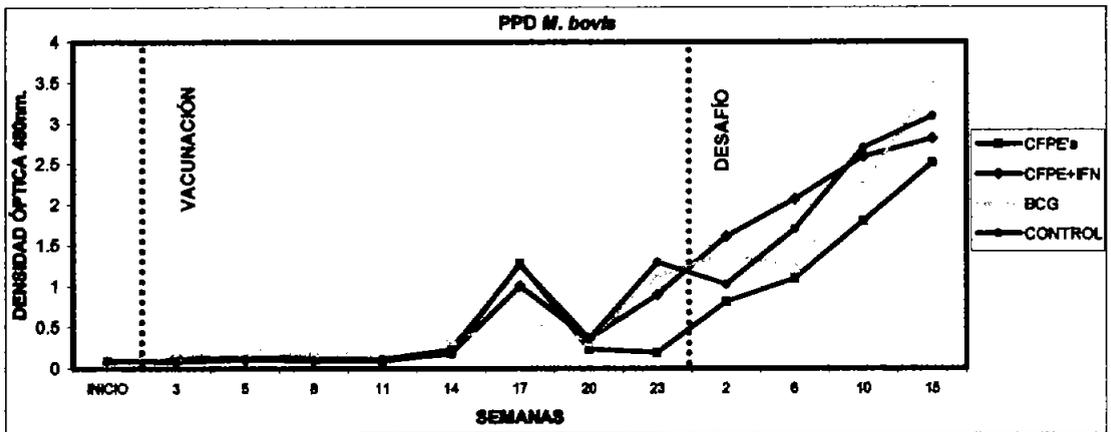
## 7. RESULTADOS

Los animales incluidos en este experimento, fueron previamente analizados con dos pruebas diagnósticas (prueba ID de tuberculina e IFN- $\gamma$ ), que valoran la inmunidad celular, y otra prueba que valora la Inmunidad humoral (ELISA), así como también se empleó una prueba de biología molécula (PCR), para determinar la presencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) del complejo *M. tuberculosis*. Todas las beceras incluidas en este experimento fueron negativas a todas las pruebas anteriormente descritas.

### 7.1 Resultados de la Prueba de IFN- $\gamma$

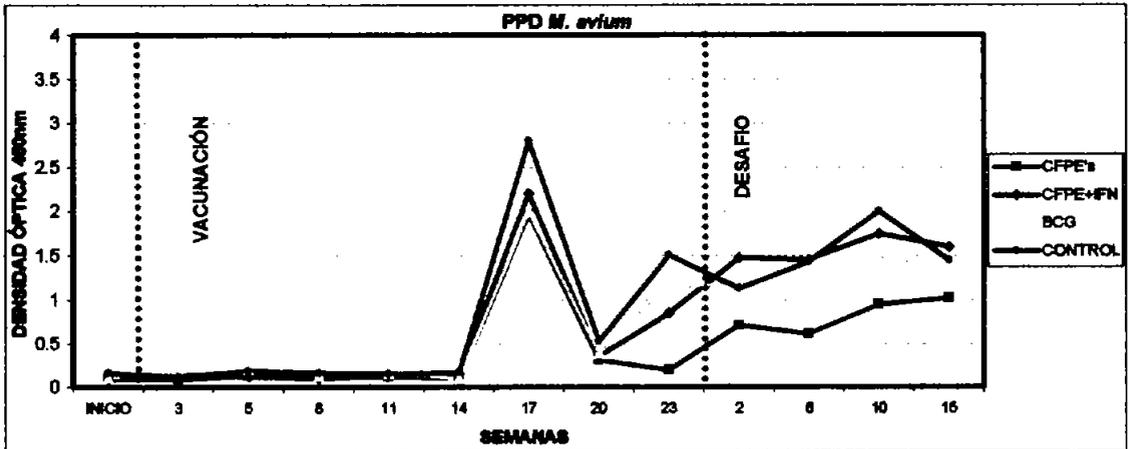
Para el seguimiento de la inmunidad celular *in vitro*, se determinó la producción de IFN- $\gamma$ , al el inicio del experimento y periódicamente cada 3-4 semanas.

En la grafica 1, se observa la producción de IFN- $\gamma$ , considerando promediós de cada grupo, a partir de los plasmas estimulados con PPD de *M. bovis* expresado en densidad óptica (DO) de 450 nm. Se muestra la respuesta celular hacia *M. bovis* desde que los animales fueron seleccionados como libres de TB, dando todos los grupos similares valores (DO < 0.1), posteriormente al ser vacunados todos los grupos dieron una similar producción de IFN- $\gamma$ , con un ligero incremento del grupo vacunado con BCG (DO <0.3); fue hasta las 14 semanas, donde se observaron diferentes niveles de producción de IFN- $\gamma$ , posteriormente a las 17 semanas, se observó un incremento significativo del grupo que recibió CFPE's de *M. bovis*, al igual que el grupo control (DO > 1.2); el grupo con CFPE's más IFN- $\gamma$ , fue muy similar a los anteriores grupos, pero en el grupo de BCG no fue tan marcado el aumento (DO < 0.6). Todos los grupos a las 20 semanas, mostraron una disminución en niveles de IFN- $\gamma$  (DO < 0.4); a la siguiente evaluación (semana 23) todos los grupos tuvieron un incremento muy similar (DO > 0.8), a excepción del grupo de CFPE's que mantuvo niveles bajos (DO < 0.2). Después del desafío, todos los grupo mostraron en promedio un incremento muy elevado en los niveles de IFN- $\gamma$ . Antes de ser sacrificados los animales del grupo con mayores valores fue el de BCG, junto con el grupo control (DO > 3.0), seguido del grupo de CPFE's más IFN- $\gamma$  (DO > 2.7), y el grupo con menor producción de IFN- $\gamma$ , fue el vacunado con CFPE's (DO > 2.4).



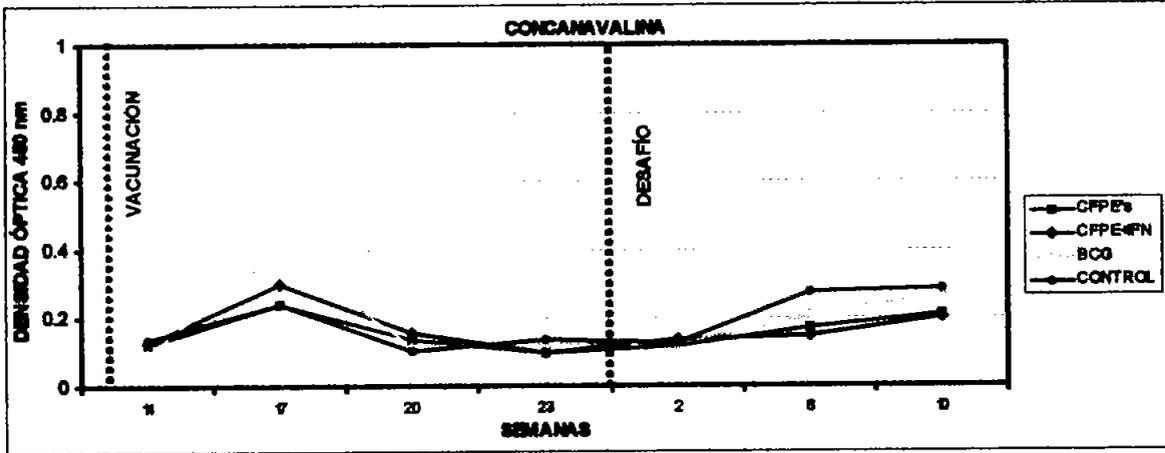
GRAFICA 1. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de IFN- $\gamma$  en DO de 450 nm., de plasmas estimulados con PPD de *M. bovis*.

La grafica 2, se presenta la producción de IFN- $\gamma$ , el promedio de cada grupo experimental, de plasmas estimulados con PPD de *M. avium*. Se muestra la respuesta celular hacia *M. avium*, desde el inicio del experimento, dando todos los grupos similares valores (DO <0.1), fue hasta la 17<sup>o</sup> semana, después de ser vacunados donde se observo un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  muy elevado de todos los grupos, siendo el grupo control con más DO (> 2.7). Pero los demás grupos tuvieron valores (DO > 1.9). Posteriormente a la siguiente evaluación todos los grupos vacunados a las 20 semanas, disminuyeron muy similar (DO <0.4), y el grupo control (DO > 0.5); a la siguiente evaluación (semana 23), todos los grupos tuvieron un incremento muy similar (DO < 0.8), a excepción del grupo de CFPE's que mantuvo niveles bajos (DO < 0.2). Después del desafío de los animales, la producción de IFN- $\gamma$  fue constante pero elevada tanto en el grupo vacunado con CFPE's más IFN- $\gamma$ , como en el grupo control (DO > 1.4), mientras que en el grupo de BCG, fue ligeramente menor la producción de IFN- $\gamma$  (DO < 1.5), pero el grupo con menor DO fue el vacunado con CFPE's durante todas las evaluaciones post-desafío (DO < 1.03).



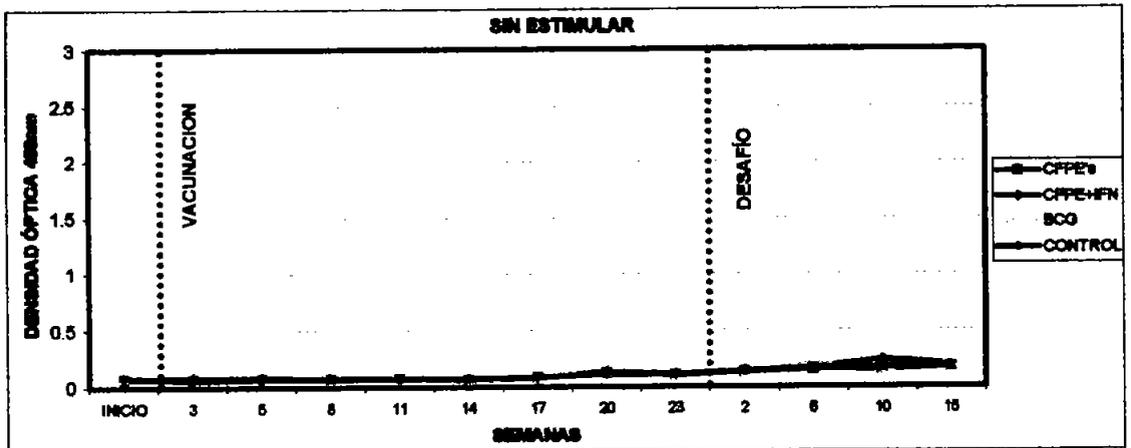
GRAFICA 2. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de IFN- $\gamma$  en DO de 450 nm de plasmas estimulados con PPD de *M. avium*

En la grafica 3, se muestran los resultados de la producción de IFN- $\gamma$  en DO de 450 nm, de plasmas estimulados con concanavalina A (Con A). La evaluación con este antígeno no se realizó desde el inicio del experimento, sino hasta las 14 semanas post-vacunación, a diferencia de los plasmas estimulados con PPD *M. bovis* y *M. avium*, tuvieron mucho menor respuesta, donde sus máximo niveles fueron a las 17 semanas, después de la vacunación, siendo el grupo de BCG con mas valores (DO > 3.9). Posteriormente a la siguiente evaluación, todos los grupos a las 20 semanas disminuyeron muy similar (DO < 1.6); en las siguientes evaluaciones y después del desafío, la producción de IFN- $\gamma$  fue baja y constante en todos los grupos (DO < 0.22), siendo el grupo control que tuvo un ligero incremento post-desafío (DO > 0.27), pero al final de las evaluaciones el grupo de BCG tuvo similares DO.



GRAFICA 3. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de IFN- $\gamma$  en DO de 450 nm de plasmas estimulados con Con A

En la grafica 4, se muestran los resultados de la prueba de IFN- $\gamma$  DO de 450 nm, donde se cuantifica la producción de IFN- $\gamma$  de plasmas sin estimular a manera de control. Siendo los valores muy homogéneos en todos los animales, nunca mostraron un incremento en los niveles de IFN- $\gamma$  conforme pasaban los días (DO < 0.15). Solo después del desafío los valores tuvieron un ligero aumento (DO > 2.0).

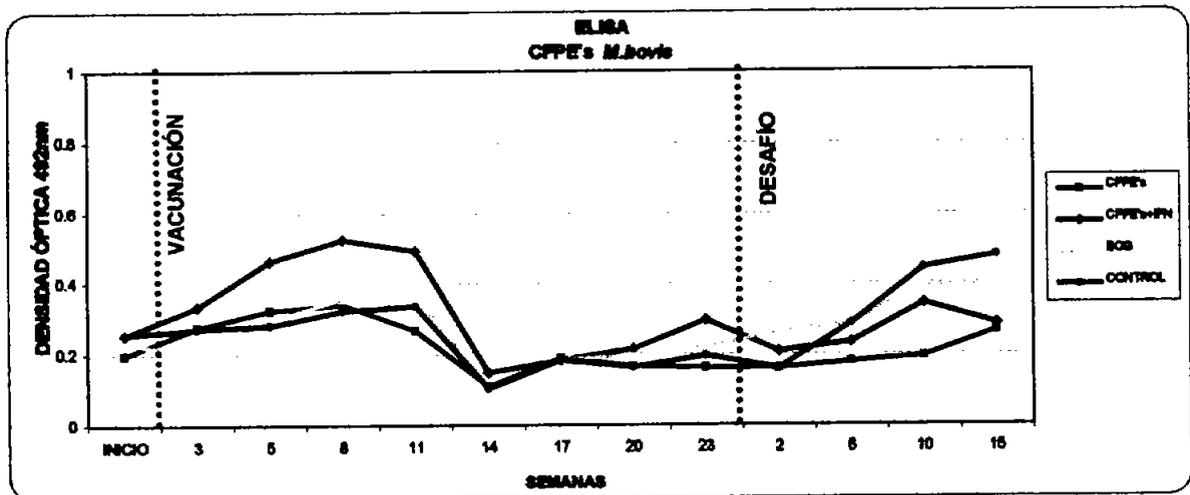


GRAFICA 4. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de IFN- $\gamma$  en DO de 450 nm de plasmas sin estimular

## 7.2 Resultados de la prueba de ELISA

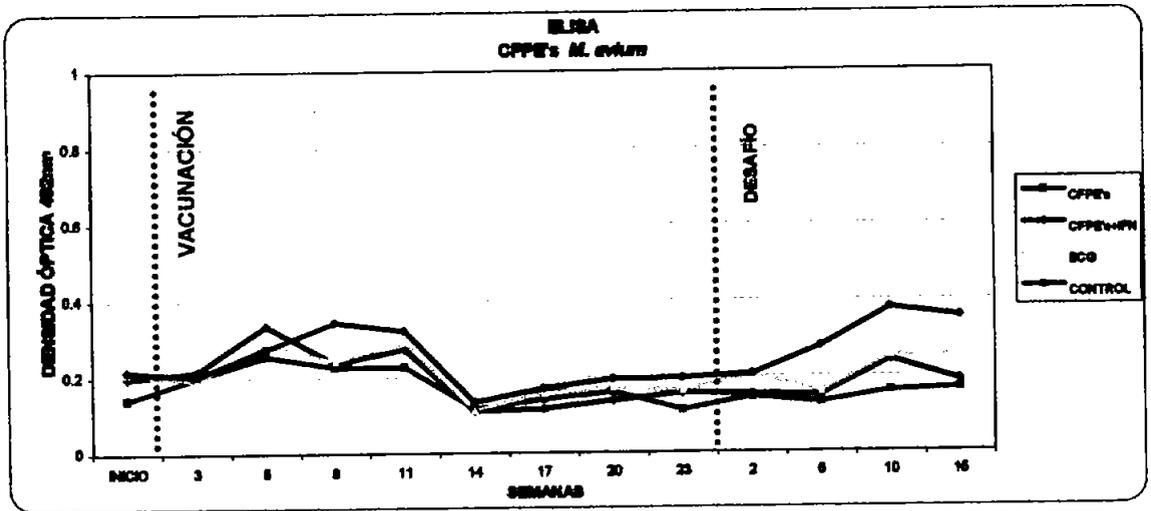
Para el seguimiento de la inmunidad humoral *in vitro*, se determinó la producción de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA comparativa, con placas sensibilizadas con CFPE's de *M. bovis* y *M. avium*, desde el inicio del experimento así como periódicamente cada 3-4 semanas.

La grafica 5, muestra los resultados en DO a 492 nm, de placas sensibilizadas con CFPE's de *M. bovis*. Se muestra la respuesta de anticuerpos hacia *M. bovis*, desde que los animales fueron seleccionados como libres de TB, dando casi todos los grupos valores bajos (DO < 0.26), después de ser vacunados, el grupo que más niveles de anticuerpos alcanzó desde los primeros días de la vacunación, fue el vacunado con CFPE's más IFN- $\gamma$  (DO > 0.5), mientras que los demás grupos mostraron similares valores constantes (DO < 0.38), fue hasta las 14 semanas, donde todos los grupos disminuyeron los niveles de anticuerpos (DO < 0.15), a las 23 semanas post-vacunación, tuvo nuevamente un ligero incremento el grupo vacunado con CFPE's más IFN- $\gamma$  (DO > 0.29). Después del desafío el grupo que mostró en promedio un incremento conforme pasaban los días en los niveles de anticuerpos fue el grupo control que no fue vacunado (DO > 0.47); seguido del grupo de BCG con valores de DO > 0.39; el grupo vacunado con CFPE's más IFN- $\gamma$  llegó a tener valores de DO > 0.34 post-desafío; mientras que el grupo vacunado con CFPE's tuvo los valores mas bajos post-desafío (DO < 0.27).



GRAFICA 5. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de ELISA a DO de 492 nm de placas sensibilizadas con CFPE's de *M. bovis*.

En la grafica 6, se muestran los resultados en DO a 492 nm de placas sensibilizadas con CFPE's de *M. avium*. Se muestra la respuesta de anticuerpos hacia *M. avium* desde que los animales fueron seleccionados como libres de TB dando casi todos los grupos valores similares (DO < 0.22), posteriormente, después de la vacunación todos los grupos se mantuvieron en un mismo nivel de anticuerpos hasta las 5 semanas, donde el grupo vacunado con CFPE's tuvo un ligero aumento en sus valores (DO > 0.33); mientras que el grupo control incremento sus valores desde la octava semana, hasta la 11ª semana (DO < 0.33); fue hasta las 14 semanas, donde todos los grupos redujeron los niveles de anticuerpos (DO < 0.14), en los días siguientes se observaron similares valores en todos los grupos. Después del desafío el grupo que mostró en promedio más niveles de anticuerpos conforme pasaban los días y hasta antes del sacrificio, fue el grupo control (DO > 0.35); seguido del grupo de BCG (DO < 0.26), mientras que los grupos vacunados con CFPE's y CFPE's más INF- $\gamma$  tuvieron similares valores (DO < 0.19).

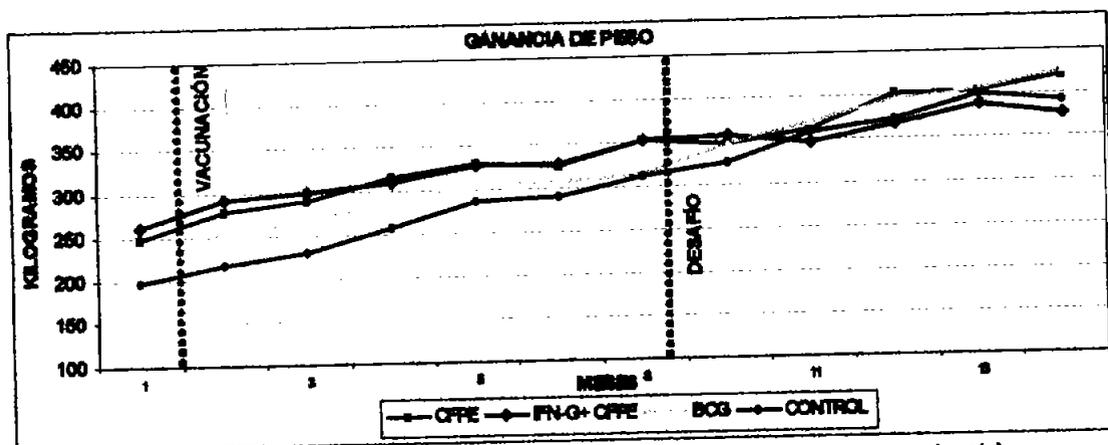


GRAFICA 6. Se muestran los resultados en promedio de los diferentes grupos, de la prueba de ELISA en DO de 492 nm de placas sensibilizadas con CFPE's de *M. avium*.

### 7.3 Ganancia de peso

Durante todo el experimento se monitoreo, generalmente cada mes la ganancia de peso de los animales desde su llegada, hasta el sacrificio de cada uno de ellos; es importante aclarar que los animales de los distintos grupos tenían cada uno de ellos diferentes pesos iniciales, en la grafica 7 se muestran los promedios de los diferentes grupos experimentales

donde el grupo con menor peso inicial fue el control con un peso < 200 kg; seguido del grupo vacunado con BCG, que tuvo un peso inicial > 215 kg; el grupo inmunizado con CFPE's más IFN- $\gamma$ , su peso inicial fue > 250 kg; y el grupo con mayor peso inicial en promedio fue el vacunado con CFPE's con un peso > 260 kg. Después de haber sido vacunados, en general todos los grupos tuvieron tendencia a ganar peso conforme pasaban los meses, siendo el grupo 1 y 2 los que mostraban en promedio mayor peso en promedio. Fue hasta después del desafío donde se observaron cambios en los promedios de cada grupo; siendo el grupo vacunado con CFPE's más IFN- $\gamma$ , el que menos ganancia de peso tuvo, y en el último pesaje, tendía a perder peso en promedio, a pesar de que al inicio del desafío era el grupo con mayor peso, mostrando una ganancia de peso del desafío al sacrificio de < 35 kg. Otro de los grupos con menor peso fue el grupo control teniendo una ganancia de peso del desafío al sacrificio < 67 kg.; siendo estos dos grupos, en los que en apariencia mostraban un deplorable estado de carnes en la mayoría de los animales. Los grupos que no se vieron tan afectados por el desafío fueron los vacunados con CFPE's y BCG con una ganancia de > 75 kg y > 100 kg respectivamente, hasta su sacrificio. Por lo tanto, el grupo que mayor peso logró desde el inicio hasta su sacrificio fue el inmunizado con BCG; los datos se muestran más claramente en la siguiente gráfica:



GRAFICA 7. Se muestran la ganancia de peso en promedio de los diferentes grupos experimentales.

#### **7.4 Resultados de la Intradermorreacción**

Se realizó la primera evaluación de la respuesta a la ID (hipersensibilidad tipo IV, respuesta tardía) doble comparativa, posterior a la vacunación a los 5 meses de la vacunación y antes de ser desafiados. Inoculando el PPD aviar en la parte superior y PPD bovino en la parte inferior de las tablas del cuello del lado derecho de todos los animales experimentales, los resultados se muestran en la tabla 7.1. En el grupo 1, inmunizado con CFPE's, solo un animal se le considero como positivo ya que tuvo una reacción positiva a las 72 hrs, hacia la tuberculina bovina, con un engrosamiento de 10 mm mayor al de la tuberculina aviar; todos los demás animales se les considero negativos, ya que, dos animales tuvieron reacción positiva hacia la tuberculina aviar y tres animales no mostraron aumento evidente, y ningún animal, de los 4 grupos, tuvo manifestaciones clínicas de dolor, exudación, necrosis circunscrita o inflamación de vasos y nódulos linfáticos regionales.

En el grupo 2, inmunizados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , se considera solo un animal sospechoso, ya que el aumento de espesor de la tuberculina bovina fue de 3.0 mm; todos los demás animales se consideran negativos, debido a que, dos animales tuvieron un engrosamiento significativo ( $> 29$  mm) a la tuberculina aviar, aunque hubo reacción también a la tuberculina bovina pero menor a la aviar. Un animal mostró mínimo aumento pero a la tuberculina aviar, y dos animales no tuvieron incremento.

El grupo 3, vacunado con BCG, dos animales tuvieron reacción positiva a la tuberculina bovina, tres animales tuvieron reacción preferente a la tuberculina aviar con un engrosamiento  $> 7.0$  mm. Un solo animal no manifestó engrosamiento.

En el grupo 4, control, un animal fue sospechoso, ya que la reacción a la tuberculina bovina fue 3.0 mm mayor a la aviar, los demás se consideran negativos, siendo tres animales los que tuvieron engrosamiento preferentemente hacia la tuberculina aviar y un animal no tuvo aumento evidente.

Tabla 7.1. Resultados de la prueba de ID doble comparativa de animales Inmunizados 5 meses post-vacunación

GRUPO	No ANIMAL	LECTURA INICIAL (milímetros)	LECTURA FINAL A LAS 72 HRS (milímetros) * a / b	DIFERENCIAL (milímetros) * a / b	INTERPRETACIÓN
CFPE's	9	5/4	15/5	10/1	-
	11	5/5	5/5	0/0	-
	14	7/6	11/20	4/14	+
	19	6/6	6/6	0/0	-
	20	6/7	21/7	15/0	-
	25	6/6	6/6	0/0	-
CFPE's + IFN-γ	4	7/6	39/37	32/31	-
	12	7/7	7/7	0/0	-
	16	7/6	7/6	0/0	-
	17	7/5	7/8	0/3	+/-
	22	5/5	7/6	2/1	-
	23	3/3	37/31	34/28	-
BGG	3	7/6	36/32	29/26	-
	6	5/5	18/9	13/4	-
	7	4/4	4/4	0/0	-
	10	6/6	12/24	6/18	+
	13	7/7	16/7	7/0	-
	24	9/8	9/33	0/25	+
CONTROL	1	4/4	30/33	26/29	+/-
	2	3/3	25/4	22/1	-
	MURIO ANTES DE UNA NEUMONÍA CRÓNICA				
	8	9/9	20/9	11/0	-
	4/4	4/4	0/0	-	
	6/6	34/14	28/8	-	

\*a/b= Resultado tuberculina aviar/resultado tuberculina bovina

(+) positivo a tuberculina bovina

(+/-) sospechoso

(-) negativo

La segunda evaluación de la ID (tabla 7.2), se efectuó con la misma metodología que en la primera ID, pero esta se realizó 5 meses después de ser desafiados, previo a su sacrificio; en esta evaluación, se aplico las tuberculinas en las tablas del cuello del lado izquierdo, para evitar interferencias entre pruebas. Se observaron los siguientes resultados: todos los animales, a excepción de dos, fueron positivos a la segunda evaluación de la prueba de tuberculina, dando engrosamientos a las 72 hrs. en la zona de aplicación, en su mayoría de los animales > 15 mm a la tuberculina aviar y al de la tuberculina bovina > 25 mm. Un gran porcentaje de los animales presentaba signos clínicos de necrosis circunscripta y dolor al tacto. Un animal del grupo 2 (CFPE's + IFN-γ), fue negativo con un diferencial de

engrosamiento de 2.0 mm menor de la tuberculina bovina, pero ambas a tuberculinas tuvieron crecimiento > 20 mm. El otro animal negativo fue del grupo control con similares resultados.

Tabla 7.2. Evaluación de la prueba de ID doble comparativa de animales desafiados 5 meses post-desafío.

GRUPO	No ANIMAL	LECTURA INICIAL (milímetros)	LECTURA FINAL A LAS 72 HRS (milímetros) * a / b	DIFERENCIAL (milímetros) * a / b	INTERPRETACIÓN
CEPEIS	9	5/5	35/40	30/35=5	+
	11	4/3	30/35	26/42=16	+
	14	7/6	25/40	18/34=16	+
	19	4/5	25/58	21/53=32	+
	20	6/6	30/55	24/49=25	+
CEPEIS + IENX	25	7/8	35/54	28/46=18	+
	4	6/6	9/60	3/54=51	+
	12	6/7	40/65	34/58=24	+
	16	8/6	26/45	18/39=21	+
	17	5/5	32/30	27/25=2	-
ECG	22	6/5	35/53	29/48=19	+
	23	7/5	35/83	28/78=50	+
	3	8/8	25/40	17/32=15	+
	6	7/7	35/55	28/48=20	+
	7	5/5	34/65	29/60=31	+
CONTROL	10	6/7	18/50	12/43=31	+
	13	9/9	25/42	16/33=17	+
	24	7/7	8/45	1/38=37	+
		6/5	40/50	34/45=11	+
		4/3	30/30	26/27=1	-
<b>MURIO ANTES DE UNA NEUMONIA CRÓNICA</b>					
		1/8	35/55	34/47=13	+
		4/5	36/65	32/60=28	+
		5/5	35/55	30/50=20	+

\*a/b= Resultado tuberculina aviar/resultado tuberculina bovina

(+) positivo a tuberculina bovina

(+/-) sospechoso

(-) negativo

## 7.5 Inspección post-mortem

Para la inspección post-mortem, se analizaron los diferentes órganos y tejidos, así como los nódulos linfáticos y la zona de inoculación (primer tercio craneal de la traquea). Se le dio la siguiente interpretación a los resultados; se le asignó (+) a las lesiones > 0.2 cm y < 0.5 cm de diámetro, (++) a las lesiones > 0.5 cm y < 1.0 cm y (+++) a las lesiones >1.0 cm.

Para examinar los diferentes nódulos linfáticos (NL), éstos fueron seccionados en cortes delgados de 2 a 3 cm de grosor, a manera de exponer el mayor número de superficies de corte. En lo que corresponde a los órganos, fueron inspeccionados cuidadosamente el riñón, hígado, bazo y pulmón, siendo este último al que se le examinó visualmente la pleura pulmonar, y con palpación firme con los dedos se revisó todo el tejido pulmonar en búsqueda de tuberculos pequeños, y posteriormente los pulmones fueron incididos al azar en los diferentes lóbulos y se examinó las superficies de corte. Se obtuvieron los siguientes resultados en órganos, NL y zona de inoculación:

El grupo 4, que permaneció como control, siendo el grupo que mostró mayor número y grado de lesión, además en todos los animales de este grupo se observaron lesiones, el tipo de lesión que presentaron todos los NL fue de linfadenitis supurativa, ampliamente diseminadas (figuras 7.1, 7.2, 7.3 y 7.4), los más afectados fueron los NL cervicales profundos, observándose lesión en cuatro animales de este grupo con un diámetro > 2.5 cm. En tres animales los NL mediastínicos tuvieron lesión > 0.8 cm de diámetro. En 2 animales los NL retrofaringeos medios, presentaron lesiones de > 0.5 cm hasta 3.0 cm. En los NL cervicales superficiales (antes pre-escapulares), solo dos animales presentaron lesión de > 0.3 a 1.0 cm. Un solo animal tuvo lesión en NL retrofaringeo lateral con una lesión > 2.5 cm y otro una lesión en NL mandibular de 1.0 cm aproximadamente. En lo que respecta a la zona de inoculación hubo lesión en tres animales de tamaño > 0.5 cm hasta 3.0 cm de aspecto purulento. En lo que corresponde a los órganos fue el único grupo que presentó lesiones; observando en el hígado de un animal múltiples lesiones de forma circulares de aspecto piogranulomatoso de un tamaño > 2.0 cm de diámetro sobre toda la superficie hepática. En el pulmón de un solo animal se observó una lesión < 0.5 cm de aspecto ligeramente purulento, en el lóbulo caudal derecho.



Fig 7.1. NL cervical profundo del animal No. 8, grupo control con severo grado de lesión.



Fig.7.2. NL cervical profundo del animal No. 2, grupo control con severo grado de lesión



Fig 7.3. NL mandibular del animal No. 1, grupo control con severo grado de lesión.



Fig.7.4. Hígado del animal No. 1, grupo control con lesiones multifocales.

En el grupo 2, inmunizados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , solo un animal se encontró libre de lesiones sugestivas a TB; los demás animales, sí mostraron lesiones pero comparado con el grupo control las lesiones no fueron tan frecuentes, y se encontraron localizadas y de menor tamaño (figuras 7.5, 7.6). El NL más afectados en este grupo fueron los cervicales profundos, encontrando lesiones  $< 0.2$  cm hasta  $> 0.1$  cm en cinco animales. Seguidos por los NL traqueobronquiales donde tres animales presentaron lesión  $< 0.6$  cm; y dos animales en NL mediastínicos con un grado similar de lesión. Un solo animal tenía lesión en NL retrofaríngeos medios y laterales, como también en el NL parotideo de tamaño  $< 0.5$  cm de aspecto ligeramente granulomatoso. En dos animales se encontró lesión de NL cervical superficial  $< 0.5$  cm. En la zona de inoculación, dos animales tuvieron lesión purulenta  $< 0.7$  cm.



Fig 7.5. NL cervical profundo del animal No.12, grupo CFPE'+IFN- $\gamma$ , con lesión.



Fig.7.6. NL cervical superficial del animal No. 22, grupo CFPE'+IFN- $\gamma$ , con lesión.

En lo que corresponde al grupo 1, inmunizado con CFPE's de *M. bovis*, las lesiones fueron menos extensas y de menor grado en los NL, la mayoría de estos fueron muy

localizadas, cercanas a la zona de inoculación y la lesión fue de linfadenitis supurativa (figuras 7.7, 7.8). Solo un animal presentó lesión > 1 cm de diámetro en un NL, otro animal tuvo lesión en 5 NL, 2 de estas < 0.7 cm y 3 lesiones < 0.3 cm. Solo un animal fue completamente libre y tres animales con mínimas lesiones. Los NL afectados fueron los siguientes: 5 animales tuvieron lesión en NL cervicales profundos con un diámetro < 0.3 cm y solo uno > 1.0 cm. En 2 animales los NL retrofaringeos medios, presentaron lesiones < 0.5 cm. En dos animales se observó lesión en NL retrofaringeo lateral con una lesión aproximada de 0.5 cm. Un animal con lesión en NL mandibular < 0.7 cm y en NL parotideo < 0.3 cm. En un animal los NL mediastínicos tuvieron lesión < 0.5 cm de diámetro y en NL traqueobronquiales mostró lesión < 0.5 cm. Solo un animal tuvo lesión en NL cervicales superficiales < 0.8 cm. Ningún animal mostró lesión en la zona de inoculación.



Fig 7.7. NL retrofaringeo medial del animal No. 9, grupo CFPE's, con lesiones de menor grado.



Fig.7.8. NL mandibular del animal No.14, grupo CFPE's, con lesiones de menor grado.

El grupo 3, vacunado con BCG, fue el que menos lesiones mostró de todos los grupos (figuras 7.9, 7.10), encontrándose dos animales totalmente libres de lesiones, un animal con lesión solo en la zona de inoculación, un animal con lesión única en NL mediastínicos < 0.7cm y otro animal con pequeñas lesiones en NL cervicales profundos y mediastínicos < 0.3 cm. Y por último, solo un animal mostró lesión en los siguientes: NL retrofaringeos medios < 1.0 cm, NL cervicales profundos > 1.0 cm y en NL traqueobronquiales y mediastínicos < 1.0 cm. Los resultados a la necropsia se muestran mas claramente en la tabla 7.3.



Fig 7.9. NL mediastínico del animal No. 10, grupo BCG con moderada lesión.



Fig.7.10. NL cervical profundo del animal No. 24, grupo BCG sin lesión como la mayoría de los NL de este grupo.



## 8. DISCUSIÓN

En la actualidad no se ha autorizado el uso de vacunas para el control de la TB, aunque se han logrado progresos importantes en la elaboración de nuevos tipos de vacunas. La principal causa de no implementar calendarios de vacunación se debe a que la mayoría de las vacunas experimentales no han podido ser completamente efectivas y algunas de éstas dan falsos positivos a la prueba de ID. En las últimas décadas se ha estudiado la eficacia de distintos compuestos inmunomoduladores, los cuales se han utilizado en el campo veterinario principalmente para incrementar la resistencia a enfermedades. Sin embargo, aunque existe una lista cada vez mayor de diversos tipos de vacunas, hasta el momento ninguna ha podido ser superior a la BCG en modelos animales (68).

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia que la inmunización con CFPE's (grupo 1) y BCG a bajas dosis (grupo 3), puede reducir el número y la severidad de lesiones tuberculosas en ganado desafiado con *M. bovis*. Contra lo esperado, los animales inmunizados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , mostraron mayor número de lesiones que los animales de los otros dos grupos vacunados. Ninguno de los esquemas de vacunación previno al 100% la infección, ya que en todos los grupos se encontraron animales con lesiones. Esto puede ser en parte debido a la dosis de desafío ( $10^4$  UFC) mayor que una dosis natural infectante, lo que provocó que el grupo control mostrara lesiones severas semejantes a las que se encuentran en tuberculosis crónica o millar. Sin embargo, dos de los animales del grupo 1 y uno del grupo 3 estuvieron libres de lesiones y la severidad de las lesiones en los demás fue mucho menor que en los animales controles. Estos resultados concuerdan con lo que ha sido reportado anteriormente para la BCG (6,63).

Los niveles de IFN- $\gamma$  y de anticuerpos fueron bajos post-vacunación. Se ha reportado en anteriores estudios de vacunación que la respuesta inmune no es necesaria para una mejor protección y se ha señalado la falta de correlación entre los niveles de citocinas post-vacunación y de protección contra TB (79). En lo que se refiere a la evaluación de los niveles de IFN- $\gamma$ , se muestra claramente como a la 17ª semana post-vacunación, hubo un incremento en plasmas estimulados con PPD de *M. bovis* y PPD de *M. avium*, aunque los resultados muestran claramente como la respuesta fue mayor hacia *M. avium* ó micobacterias atípicas, por lo que se supone que el incremento fue debido al cambio de dieta que se realizó cercana a esta fecha, la cual posiblemente estaba contaminada con gallinaza, siendo ésta muy usada para balancear dietas de bovinos en el Estado de México. Estos resultados se ven reflejados

también en la prueba ID doble comparativa de los animales antes de desafiar, donde la mayoría muestran mayor tendencia hacia el PPD aviar, desgraciadamente los experimentos en campo están expuestos a estas variantes difíciles de controlar. Pero previo a la 17ª semana la producción de IFN- $\gamma$ , fue ligeramente mayor en el grupo vacunado con BCG, a diferencia de los otros grupos, y correlacionó en lo observado al desafío ya que este fue el grupo con menor número de lesiones. Basándose en esto, se puede sugerir que a mayor producción de IFN- $\gamma$  post-vacunación, mayor será la inmunidad protectora hacia desafíos con *M. bovis*. Es importante mencionar que al realizar el análisis de varianza, en donde se evaluó el primer muestreo de los animales antes de vacunar, contra los siguientes muestreos de animales vacunados y desafiados de cada grupo Inmunizado. En la producción de IFN- $\gamma$ , el grupo 1 mostró diferencias significativas a ( $P < 0.05$ ) a partir de la 5ª semana post-vacunación, mientras que el grupo 2 y 3 mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) a partir de la 3ª semana post-vacunación hacia plasmas estimulados con *M. bovis*. Ninguno de los grupos mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los plasmas estimulados con *M. avium*, hasta la 17ª semana, en los cuales se observó la modificación de nuestros resultados. Se realizó la misma metodología para el análisis de varianza para la prueba de ELISA sensibilizada con CFPE's de *M. bovis* y *M. avium*, y no se mostró en ninguna etapa de la vacunación o del desafío, que las DO tuvieran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), entre antes de vacunar y después de vacunar.

En cuanto a los animales inmunizados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , se observó una mayor respuesta de anticuerpos en los sueros, a partir de la 5ª semana y hasta la 11ª semana, los demás grupos Inmunizados no mostraron variabilidad en las DO diferentes entre antes y después de vacunar. Esto nos muestra que la respuesta humoral no tiene influencia en la inmunidad protectora hacia desafíos con *M. bovis*, ya que el grupo 3 fue el que mostró menor grado de protección ó mayor número de lesiones, de los tres grupos inmunizados. Esto se puede atribuir al predominio de la respuesta de tipo celular en bovinos infectados o vacunados en este caso, ya que para que la respuesta humoral sea claramente reflejada es necesario que exista una gran cantidad de micobacterias y de antígenos libres presentes en las lesiones que induzcan la producción de anticuerpos<sub>(80)</sub> y se considera que en la infección inicial la carga bacteriana es baja, existiendo entonces un gran predominio de la respuesta celular en la prueba de IFN- $\gamma$ ; es por eso que en los resultados de ELISA se muestra cómo al final del desafío el grupo control es el que nos da mayor nivel de DO en promedio en comparación a los demás grupos.

El empleo de la prueba de ID, ha demostrado su gran utilidad para el control de la TB a nivel mundial, sin embargo su sensibilidad y especificidad son bajas, como se muestra en este estudio, donde se observó que animales que no presentaron lesiones a la necropsia, fueron positivos a la prueba de tuberculina doble comparativa, como los animales 3, 7, 11, 16 y 24, mientras que animales que fueron negativos a la prueba de ID como el 2 y 17, tuvieron distribución de lesiones en diferentes NL. En particular el animal 2 mostró amplia distribución de estas lesiones, por lo cual se consideraría que estos animales serían una fuente importante de infección. Es por eso que en la última década se ha sugerido implementar más tipos de técnicas diagnósticas complementarias a la ID, tales como la prueba de IFN- $\gamma$ , que es más sensible que la técnica de ID ya que IFN- $\gamma$  mide directamente la CMI, mientras que la ID mide la hipersensibilidad tardía, aunque en este experimento todos los animales tuvieron DO altas en la prueba de IFN- $\gamma$  por haber estado desafiados directamente con *M. bovis*. También se sugiere el uso de la prueba de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra CFPE's bovino, ya que en este experimento los animales libres de lesiones tuvieron DO bajas en esta técnica y el animal 17 tuvo DO > 0.45 (alta como para considerarse positivo). Esta prueba detecta animales anérgicos que no responden a la prueba de ID, en donde se establecen puntos de corte según la prevalencia de los hatos, como ya se ha reportado anteriormente (52). Esta técnica se puede complementar además con el uso de la PCR, la cual es una prueba muy sensible y específica, y que ayuda a detectar animales aparentemente sanos.

La TB es una enfermedad crónica y progresiva que merma la condición física y productiva de los animales, siendo éste uno de los signos más característicos de la TB, se evaluó la ganancia de peso para observar qué animales podrían ser más afectados tras el desafío. Los animales del grupo 2, inmunizados con CFPE's más IFN- $\gamma$ , que fue el que mostró menor protección de los 3 grupos vacunados, fue el más afectado en ganancia de peso junto con el grupo control. Se observó que los animales del grupo 1 y 3, no fueron afectados en su peso, teniendo un buen peso final y mostrando conforme pasaban los días una ganancia de peso bastante aceptable, lo que representa una ventaja adicional para el ganadero.

Se sabe que la edad de los animales al momento de la inmunización juega un papel crucial para tener una mejor inmunidad protectora en ésta y otras enfermedades, esto se ha evidenciado en anteriores estudios realizados con la BCG en ganado (68). En esta

Investigación, se observó que la mayoría de los animales inmunizados a una edad menor de 14 meses no mostraron lesiones extensivas, ni de gran tamaño.

Es importante mencionar que los animales experimentales no fueron sometidos al estrés constante característico de los bovinos productores de leche, como lo es la ordeña diaria y los partos consecutivos, lo que origina una fuerte depresión del sistema inmune. Por esto la TB, tiene mayor incidencia o mayor facilidad de desencadenarse en los bovinos productores de leche, en comparación con los bovinos productores de carne, donde es menos probable la presencia de TB y sería importante desafiar a la propia vacuna a estos factores desencadenantes.

La vacunación con BCG y CFPE's mostró eficacia en la protección contra el desarrollo de lesiones extensivas a diferentes órganos, por lo que se considera que puede ser una herramienta importante en el control de la TB, ya que permitiría minimizar el impacto económico que conlleva esta enfermedad y los riesgos de transmisión a la población humana, actuando como alternativa o complemento a otras medidas sanitarias de manejo, principalmente en zonas de alta prevalencia y en lugares donde es económicamente imposible el sacrificio de animales. Actualmente se puede diferenciar por medio de PCR, aquellos animales vacunados que a la prueba de ID den falsos positivos, ya que por medio de esta prueba se puede diferenciar fácilmente animales infectados con *M. bovis* de campo de los animales vacunados con BCG o CFPE's.

## 9. CONCLUSIONES

La vacuna de BCG a bajas dosis indujo una buena protección. La vacunación con CFPE's, produjo una protección aceptable, ya que las lesiones sugestivas a tuberculosis fueron observadas en NL cercanos a la zona de inoculación, siendo más pequeñas y más escasas en comparación al grupo control, con tendencia del NL a encapsular las micobacterias, sin mostrar lesiones extensivas en otras partes del cuerpo. No existió un adecuado sinergismo entre el CFPE's e IFN- $\gamma$ , como se mostró en el grupo 3, a pesar de ser el IFN- $\gamma$  pieza clave en la CMI, siendo éste fundamental para lograr una correcta protección contra la enfermedad. Se debe investigar los adyuvantes apropiados que estimulen una mejor respuesta inmune en bovinos; e incrementar el estudio de la inmunología hacia TB, para tener las bases claras para desarrollar mejores vacunas que confieran una protección adecuada.

Los animales después de haber sido inmunizados no mostraron alteraciones fisiológicas post-vacunación, ni mostraron reacciones indeseables en el sitio de aplicación. Después del desafío, los animales de los grupos 1 y 2 no mostraron afecciones fisiológicas, ni mucho menos pérdida de peso, que es una característica muy común en bovinos al estar infectados con TB.

Es importante tener conocimiento de las técnicas auxiliares para el diagnóstico de TB, así como de la correcta interpretación de los resultados, para evitar diagnósticos erróneos y por lo tanto inadecuadas medidas de control, como el sacrificio de animales falsos positivos, que no muestran lesión alguna a la necropsia. En este estudio la prueba de ID, mostró tener baja sensibilidad y especificidad ante los desafíos con *M. bovis*.

## 10. ANEXO 1 DE REACTIVOS Y FÁRMACOS

### Reactivos

<b>Solución de pegado. Buffer de Carbonatos 0.06M pH 9.6</b>	
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	3.80 gr./litro de agua destilada
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	1.93 gr./litro de agua destilada

<b>Solución de lavado. Buffer de fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.4 con NaCl y 0.1% de Tween 20</b>	
Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.10 gr./litro de agua destilada
Fosfato de sodio dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0.32 gr./litro de agua destilada
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	8.5 gr./litro de agua destilada
Tween 20	0.5 ml./litro de agua destilada

<b>Solución bloqueadora. 3% de leche descremada en PBS y 0.1% Tween 20</b>	
Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1:10 gr./litro de agua destilada
Fosfato de sodio dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	0.32 gr./litro de agua destilada
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	8.5 gr./litro de agua destilada
Tween 20	0.5 ml./litro de agua destilada
Leche descremada en polvo	3 gr. para 100 ml

<b>Solución de revelado. Buffer de Citratos pH 4.5</b>	
Ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ )	4.6 gr./litro de agua destilada
Citrato trisodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	7.64 gr./litro de agua destilada
Orto-fenilendiamina	4 mg / 10 ml
Agua oxigenada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	4 $\mu\text{l}$ / 10 ml

### Fármacos

<b>Ericlor T</b>	
Tianfenicol	20 gr
Ambroxol clorhidrato	3 gr
Dipirona sódica	5 gr
Vehículo cbp	100 ml

<b>Formicina 5</b>	
Penicilina G procaínica	5 000 000 U.I
Estreptomicina base	6.25 gr
Tripsina	78.125 U.I
Ampolleta con diluyente estéril	cbp 20 ml

<b>Nuflor</b>	
Florfenicol	300 mg.
Vehículo cbp	1 ml

<b>Parzen. Bovinos 10% C.S.</b>	
Albendazole	10 gr.
Sulfato de cobalto	1.5 gr.
Selenito de sodio	250 mg.
Vehículo cbp	100 ml

<b>Vadegol - Vitamina ADE</b>	
Vitamina A	500,000 U.I.
Vitamina D	75 000 U.I.
Vitamina E	100 U.I.
Excipiente cbp	1 ml

## 11. ABREVIATURAS

BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
BCG	Vacuna del bacilo Calmette-Guérin
CFPE's	Extracto proteico de filtrado de cultivo
CMI	Inmunidad mediada por células
conA	Concanavalina
DVB	Diarrea viral bovina
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
GM-CSF	Factor de activación de colonias de granulocitos y monocitos
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
IBR	Rhinotraqueitis infecciosa bovina
ID	Prueba de intradermoreacción
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
LAM	Lipoarabinomanano
mAGP	Peptidoglicano
MIF	Factor inhibición de migración
NK	Células asesinas natural
NL	Nódulo linfático
NO	Oxido nitroso
NO <sub>2</sub>	Oxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células mononucleares presentes en sangre periférica
PI <sub>3</sub>	Parainfluenza 3
PPD	Derivado proteico purificado
PRONABIVE	Productora nacional de biológicos veterinarios
RPMI	Completo Roswall park memorial institute
SFB	Suero fetal bovino
ST-CFPE's	CFPE's obtenido en tiempo corto de crecimiento
TB	Tuberculosis bovina
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocito T cooperador
TMB	Cromogeno tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
VRSB	Enfermedad respiratoria sindtial

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Smith PG, Moos AR. 1994. Tuberculosis Pathogenesis, protection and control. Epidemiology of tuberculosis. Asm Press Washington D.C: 47-62.
2. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: review Tubercle and Lung Disease 1995; (76) 1-46.
3. Cosivi O, Meslin F-X, Daborn CJ, Grange JM. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with reference to Africa Scientific and Technical. Review 1995; (14) 733-46.
4. [www.cuautitlan2.unam/21](http://www.cuautitlan2.unam/21)
5. Skinner MA, Wedlock DN & Buddle BM. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. Rev sci tech Off Int Epiz 2001; 20 (1), 112-132.
6. Brooks MA, Butel PJ. Microbiología Médica. 17° ed. México. Ed. Manual Moderno. 2002. 619-634
7. Fenton J, Vermeulen MW. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. Infec and Immun 1996.
8. Drapee P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res. Microbiol. 1991; (142) 420-422.
9. Ausina RV, Farrera VP. Tuberculosis. 13 ° ed. Madrid. Mosby/Doyma libros.1995. 2367-2371.
10. Besra GS, Barry, RB, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. Washington. American Society for Microbiology. 1994. 222-252.
11. Lee RE, Brennan PJ, Besra GS. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Tuberculosis. Shinnick. Springer. 1996; (1) 1-25.
12. Bernard P, Davis MD, Renato MD, Hema V, Eisen MD. Tratado de Microbiología. 4 ed. Barcelona España. Ed. Masgon S.A. 1996; 619-634.
13. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF. Emerging Infectious Diseases Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries.1998;4 (1) 356-364
14. Acha PN, Szyfres B. Zoonotic tuberculosis. In Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 2nd edition. Washington: Pan American Health Organization/World Health Organization; 1987: Scientific Publication No. 503

15. Ashford E, Whitney P, Raghunathan & Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals in Review Scientific et technique OIE. Editado por Board Consejo Editorial.2001; 20 (1) 325-337.
16. Cosivi O, Daborn CJ, Grange JM. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infect Dis* 1998; (4) 59-70.
17. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease* 1996; (77) 103-108.
18. Dye C, Scheele S, Dolin P. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence and mortality by country. *J Am Med Assoc* 1999; (282) 677-686.
19. SENASICA. SAGARPA. Dirección General de Salud Animal. Cuestionario FAO/OIE/OMS – 2002.México
20. Bemard, P.D., Dulbecco. R., Eisen. H.V., Tratado de microbiología. 4° ed. Barcelona, España: Ed. Masgon. 1996; 619-634.
21. Morris, R.S., et al. *Veterinary Microbiology*, 1994. (4) 153-170.
22. Otto MR, Clive CG, Douglas CB. *Medicina Veterinaria (tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino. 9° ed. Madrid, España: Ed. Mc Graw-Hill. 2001; 1075-1089.*
23. Liebana E, Aranaz A, Aldwell, FE, Nair J, Neill SD, Smyth AJ, & Pollock JM. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology* 2000b; (99) 23±9.
24. Dobos KM, Spotts E, Quinn FD, and King CH. Necrosis of lung epithelial cell during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect Immun.* 2000; 68 (11) 6300-6310.
25. Biberstein, E.L.,Chung, Y.Z., Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza, España: Ed. Acribia. 1994; 229-240.
26. McDonough KA, Kress Y, and Bloom B. Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. 1993; 61. (7): 2763-2773.
27. Cotran R, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional. 6ed. Madrid: Mc Graw-Hill-Interamericana. 2000; 370-373.*
28. Dwight CH, Chung ZY. *Veterinary Microbiology. Massachusetts U.S.A: 1999; 158-164*
29. Moran LE, Lazo AY. Tuberculosis. *Ist. Sup. de Cien. Med. de la Habana. Rev. Cubana Estomatolo. 2001;38(1):33-51*
30. Neill SD. *Veterinary Microbiology. 1994; 40-41*
31. Santana GJ. *Atlas de patología. La Habana:Científico-Técnica.1985; 131-133.*

32. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative Immunol. 2003; (3) 133-146.
33. Jiménez MM, Báez SR, Linares CM, Chávez SR, Lascurain SR, y Centeno GE. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2001; 14 (1) 39-49
34. García CE, Figueroa S. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2001; 14(2) 114-128
35. Chávez R, Reyes J, Maldonado G. Moléculas de cooperación y regulación durante la migración celular de la respuesta inflamatoria. Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 1994; (7) 67-75.
36. Kasahara K, Sato I, Ogura K, Takeuchi H. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 1998; (178) 127-137.
37. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol Today 1999; (20) 307-312.
38. Lugo MTA. Expresión de citocinas durante las diferentes etapas de infección en tuberculosis bovina [tesis maestría], Edo. de México. FES-Cuautitlan.UNAM. México, 2003.
39. Harth G, Horwitz MA. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocs the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. J Exp Med 1999; (189)1425-1435.
40. Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Curr. Opin. Microbiol. 1999; (2) 89-93.
41. Mosmann TR, & Coffman RL. Th1 and Th2 cell: diferent patterns of lymphokine secretion lead todiferent functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989; (7) 145-173.
42. Ramachandra L, Chu R, Askew D, Noss EH. Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. Inmmunol Rev 1999; (168) 217-239.
43. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russell DG, Orme IM, Disseminated tuberculosis in Interferon-gamma gene disrupted mice. J Exp Med 1993; (178) 2243-2248.
44. Blacwell JM, Structure and funtion of the natural resistance associated macrophage protein (Nramp), a candidate protein for infectious and autoimmune disease suceptibility. Mol. Med Today 1996; (2) 205-211.

45. Serbina NV, Liu CC, Scanga CA. CD8+ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol.* 2000;(165) 353-363.
46. Munk ME, Gatrill B, Schoel H, Gulle K, Pfeffer H, Wagner and Kaufmann SE. Immunity to mycobacteria: possible role of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1990; (98) 669-673
47. Michael DW, Hilary EK, Allister JS. Responses of Bovine WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T Cell to Protein and Nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*. *Infect and Immun* 2002; 70 (11) 6114-6120.
48. Kennedy HE, Welsh MD, Bryson D. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T Cell. *Infect Immun.* 2002; (70) 1488-1500.
49. Carding SR. Role of gamma delta T cells in immunity to infectious diseases and the regulation development. *Immunol. Res.* 1998 (17) 13-22.
50. Pollock JM, and Nelly SD. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle review. Veterinary Sciences Division, Department of Agriculture and Rural Development, Belfast, UK. *The Veterinary Journal* 2002; (163) 115-127.
51. Fifis T, Comer LA, Rothel J.S. and Wood P.R. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand J Immunol.* 1994; (39) 267-274.
52. Díaz F, Banda V, Jaramillo L, Arriaga C, González D y Estrada C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Méx.* 2003; 34 (1) 13-26.
53. Arriaga C, Díaz F, Banda V, Estrada C. Técnicas de diagnóstico de tuberculosis bovina que se realizan actualmente en el laboratorio de biotecnología. México. *Int Nal Inv Fores Agri Pec.* 2004.
54. Buddle BM, Pollock JM, Skinner MA, Wedlock N. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int Jour Paras.* 2003; (33) 555-566
55. Buddle BM, Skinner MA, Wedlock DM. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. *Vet Immun and Immunopat.* 2002; (87) 177-185
56. Wedlock N, Vesosky B, Skinner MA. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate Protein and Interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2000; 68 (10) 5809-5815.

57. Bosio CM, Orme IM. Effective nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infection in mice. *Infec Immun.*1998; (66) 5048-5051.
58. Haslo K, Ardersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Ardersen P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infec. Immun.* 1995; (63) 804-810.
59. Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infec. Immun.* 1997; (65) 2587-2592.
60. Woldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhay MJ, Ardersen 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.
61. Hewinson RG, Russell WP. Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 1993; (139) 1253-1259.
62. Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect. Dis.* 1997; (175) 1251-1254.
63. Pym AS, Brodin P, Majlessi L. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med.* 2003; 9 (5):533-539.
64. Calmette a & Guérin C. Tuberculosis in man and animals. In *L' infection bacillaire et la tuberculose* ( A. Boquet & L. Negre, eds) masson et Cie. Paris 1936; 1-24.
65. Haring CM, Traum J, Hayes FM, Henry BS. Vaccination of calves against tuberculosis with BCG Hilgardia. 1930; (4) 307-394.
66. Milian SF, Anaya EA, Gallegos TR. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Prev Vet Med.* 2003; (58) 1-13.
67. Govorov AM. Vaccination of cattle against TB. Part III *Nauch, Trud Ukrain, Inst Exp. Vet.* 1954; (21) 82-90.
68. Lyaashchenko K, Whelan AO, Greenwald R. Association of tuberculin-boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infec Immun.* 2004; 72 (5) 2462-2467.
69. Brandt L. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine; some species of environmental micobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis *Infec Immun.* 2002; (70) 672-678.

70. Behr MA. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genomes DNA microarrays: Science 1999; (284) 1520-1523.
71. Pappaterra MG. Efecto *in vitro* e *in vivo* de un Inmunomodulador compuesto por LPS de *E. coli* y *Propionibacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo [tesis doctoral] Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2002.
72. Quinn PJ. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine. Adv Vet Sci Com Med. 1990; (35) 43-99
73. Gonzalez G, Font P. Terapéutica en HIC. Man Farm Hosp. 2002.
74. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in Interferon gamma gene-disrupted mice. J. Exp Med. 1993; (178) 2243-2247.
75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; (72) 248-254 .
76. Domingo M, Liébana E, Carrera J, Villafraña M. Eficacia comparativa de la intradermoreacción y de la prueba de liberación de interferón gamma para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. Med Vet. 1995; 12 (5) 307-316.
77. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, And Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust Vet J. 1990; (67) 134-137.
78. Walravens K, Marche S, Rosseels V, et al. Interferon- $\gamma$  diagnosis tests in context of bovine mycobacterial infections in Belgium. Vet Immunol Immunopathol. 2002a. (87) 401-406.
79. Buddle BM, Keen D, Thompson A, Jowett G, McCarthy AR, Heslop J. et al. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination killed *Mycobacterium vaccae*. Res Vet Sci. 1995b; 59 (1) 10-16.
80. Costello E, Poherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infección. The Vet J. 1998; (155) 245-250.