



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

EFFECTO DE *Fasciola hepatica* EN LA RESPUESTA
A LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS BOVINA BAJO CONDICIONES DE
CAMPO.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

XITLI PATRICIA GARCÍA LÓPEZ

TUTOR: Fernando Díaz Otero

COMITÉ TUTORAL: Camila Arriaga Díaz
Héctor Quiroz Romero

(México)

(2010)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de existir y convivir con la naturaleza.

A mis abuelos: Romi[†] y Ramón[†] por haberme inculcado: responsabilidad, compromiso y amor por las cosas que realizo.

Mis papás por darme la vida y formación.

Naty, Yady y por su cariño incondicional.

Juan

A mi alma mater UNAM, por darme tantas satisfacciones personales y profesionales.

Todos los maestros que han contribuido a la largo de mi formación académica y personal.

Todas aquellas personas que en su momento me han aportado enseñanzas de la vida misma.

A los productores que me dieron la oportunidad y confianza de colaborar con ellos.

A la Dra. Camila Arriaga Díaz, Dra. Laura Jaramillo Mesa por su paciencia y dedicación, Dr. Héctor Quiroz Romero., Dr. Fernando Díaz Otero, Dr. José Juan. Martínez Maya., MVZ. Camilo Guzmán Dimas, Dr. Antonio Figueroa, MC. Belinda Alegria por sus consejos, dedicación y apoyo para la realización de este trabajo.

Al jurado por sus comentarios y observaciones Dra. Gabriela Bárcenas Morales., Dr. Fernando Alga Hurtado y Dr. Froylán Ibarra Velarde.

A mis amigos: Edgarin A. Casillas P., Héctor Romero y Rosario (compadresaurios), Nancy Domínguez, Familia Lara Hdez, mis nuevos amigos: Dianita Chávez C., Gus, Adria, Flavio, Ulises A. Espinosa., Xóchitl G., Miriam Hdez., Evelyn, Carlos Tixi, Alejandra Arias, Alejandra Rios, Esteban, Ernesto, Perla Acevedo.

A Napo por ser una excelente compañía y mi mejor regalo, Cas, Diamante, los felinos, mis borregos y vacas que me han dado tanto.

Somos lo que hacemos día a día.

De modo que la excelencia no es un acto, sino un hábito.

Aristóteles.

Nunca consideres el estudio como obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein.

Índice General

	Página
RESUMEN.	I
ABSTRACT.	II
ABREVIATURAS.	III
1. Introducción.	1
1.1 Generalidades de <i>Fasciola hepática</i> (<i>F. hepática</i>).	3
1.2 Ciclo evolutivo de <i>F. hepática</i> .	3
1.3 Antígenos de <i>F. hepática</i> .	6
1.4 Respuesta inmune contra <i>F. hepática</i> .	7
1.5 Pruebas diagnósticas para <i>F. hepática</i> .	9
1.5.1 Prueba basada en la observación del huevo de <i>F. hepática</i> . Técnica de sedimentación.	9
1.5.2 Interferón gamma (IFN- γ).	9
1.5.3 Prueba basada en la respuesta inmune humoral.	10
1.5.3.1 Prueba de Ensayo inmunoabsorbente ligado a Enzimas (ELISA).	11
1.5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE SDS.	12
1.5.5 Western blot.	13
1.6 Generalidades de <i>Mycobacterium bovis</i> (<i>M. bovis</i>).	15
1.7 Patogenia de <i>M. bovis</i> en ganado bovino.	17
1.8 Antígenos de secreción de <i>M. bovis</i> .	19
1.9 Respuesta inmune para <i>M. bovis</i> .	20
1.10 Diagnóstico para <i>M. bovis</i> .	23

1.10.1 Intradermoreacción (Hipersensibilidad tipo IV).	23
1.10.2 Prueba de IFN- γ .	23
1.10.3 Prueba de ELISA.	24
2. Justificación.	25
3. Hipótesis.	26
4. Objetivo general.	26
4.1 Objetivos particulares.	26
5. Material y métodos.	27
5.1 Animales.	27
5.2 Diseño experimental.	27
5.3 Prueba coproparasitoscópica, técnica de sedimentación.	28
5.4 Antígeno de Secreción/Excreción de <i>F. hepática</i> (SEFh).	28
5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.	29
5.4.2 Electroforesis mini gel SDS PAGE 11%.	29
5.5 Prueba de IFN- γ para <i>F. hepática</i> .	30
5.6 Prueba de ELISA para <i>F. hepática</i> .	31
5.7 Western blot para <i>F. hepática</i> .	32
5.8 Prueba intradérmica caudal (IDC).	33
5.9 Prueba intradérmica cervical comparativa (IDCC).	33
5.10 Prueba de IFN- γ para <i>M. bovis</i> .	33
5.11 Obtención del extracto protéico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i> .	34
5.12 Prueba de ELISA para <i>M. bovis</i> .	35
5.13 Western blot para CFPE.	36

6. Análisis estadístico.	37
7. Resultados.	37
7.1 Tuberculosis.	37
7.1.1 Prueba IDC e IDCC.	37
7.1.2 Prueba de IFN-γ.	38
7.1.3 Prueba de ELISA.	38
7.2 Fasciolosis.	38
7.2.1 Detección de huevos de <i>F. hepática</i> por sedimentación.	39
7.2.2 Prueba de IFN-γ.	39
7.2.3 Prueba de ELISA.	39
7.3 Análisis de Western blot de antígenos de SEFh y CFPE de <i>M. bovis</i> .	40
8. Discusión.	42
9. Conclusiones.	45
10. Literatura citada.	46
11. Anexos.	62
Cuadro 1 Resultados de las pruebas de diagnóstico IDC e IDCC para la determinación de <i>M. bovis</i> , en bovinos localizados en Acatlán, Hidalgo. México 2008.	62
Cuadro 2 Resultados de las pruebas diagnósticas para la detección de <i>M. bovis</i> , mediante las pruebas IDCC, IFN-γ y ELISA en bovinos localizados en Acatlán, Hidalgo. México 2008.	62
Cuadro 3 Resultados de las pruebas diagnósticas para la determinación de <i>F. hepática</i> por las pruebas:	

coproparasitoscópica (sedimentación), IFN- γ y ELISA en animales de la localidad de Acatlán, Hidalgo. México 2008.	63
Cuadro 4 Resultados de las pruebas coproparasitoscópica (sedimentación), ELISA para <i>F. hepatica</i> y <i>M. bovis</i> de los animales negativos a la prueba IDC en bovinos localizados en Acatlán, Hidalgo. México 2008.	63
Cuadro 5 Resultados de la prueba de ELISA para <i>F. hepática</i> y <i>M. bovis</i> , en los animales reactivos a la prueba IDC.	64
Cuadro 6 Reconocimiento mediante Western blot de proteínas del antígeno de CFPE de <i>M. bovis</i> .	65
Cuadro 7 Reconocimiento mediante Western blot de proteínas del antígeno de Secreción/Excreción de <i>F. hepatica</i> .	66
Figura 1 Ciclo evolutivo de <i>F. hepatica</i> .	5
Figura 2 Patrón de reconocimiento por Western blot de CFPE de <i>M. bovis</i> .	67
Figura 3 Reconocimiento por Western blot de antígenos de Secreción/Excreción de <i>F. hepática</i> por sueros de bovinos sospechosos y negativos a la prueba IDCC.	67
Figura 4 Identificación por Western blot del antígeno de CFPE de <i>M. bovis</i> de sueros de bovinos positivos y negativos a la prueba IDCC.	68
Figura 5 Frecuencia de reconocimiento por Western blot de antígenos de Secreción/Excreción de <i>F. hepática</i> y CFPE de <i>M. bovis</i> por sueros de bovinos reactivos a la prueba IDC.	69
Figura 6 Frecuencia de reconocimiento de antígenos de	

SEFh por sueros de bovinos sospechosos y negativos a la prueba IDCC. 70

Figura 7 Frecuencia de reconocimiento de antígenos de CFPE de *M. bovis* por sueros de bovinos sospechosos y negativos a la prueba IDCC. 71

Resumen

La fasciolosis y la tuberculosis son enfermedades económicamente importantes que causan grandes pérdidas, además de ser zoonóticas. En ambas infecciones se presenta al inicio una respuesta de tipo celular y en estados avanzados de tipo humoral. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la presencia de *F. hepatica* y su relación en las pruebas diagnósticas de la tuberculosis bovina. Se emplearon 124 animales, la prueba inicial fue la intradérmica caudal (IDC), de los cuales 34 (27.4%) fueron reactivos, a éstos se les realizó la prueba cervical comparativa (IDCC), el resultado fue 19/34 (55.88%) positivos (P), 12/34 (35.29%) sospechosos (S) y 3/34 (8.82%) negativos (N), además, los 34 reactivos a la prueba IDC se evaluaron con la prueba de IFN- γ para detección de tuberculosis, cuyos resultados fueron 26 animales positivos a IFN- γ ; para la evaluación de la respuesta inmune humoral contra *M. bovis* se utilizó la prueba de ELISA indirecta, con ella y con los resultados de la prueba IDCC por grupo se encontró que 31 fueron positivos a ambas pruebas. Para el diagnóstico de *F. hepatica* se obtuvo que de 34 reactivos a TB, 20 fueron positivos a sedimentación, a la prueba de IFN- γ para *F. hepatica* hubo 10 positivos, en la prueba de ELISA 33 positivos presentaron anticuerpos a *F. hepatica*. En el análisis de Western blot para *F. hepatica*, las proteínas con mayor frecuencia fueron 6, 10, 19, 22, 23, 26, 50, 55, 60, 65, 70, 72, 75, 78, 80, 200 y 216; para *M. bovis* 6, 10, 19, 22, 23, 26, 32, 35, 38, 45, 47, 50, 72, 78, 80, 85, 110, 132, 200 y 216 kDa. La presencia de *F. hepatica* no aumenta los reactivos a la prueba IDC.

Palabra claves: *F. hepatica*, *M. bovis*, pruebas diagnósticas.

Abstract

Fasciolosis and tuberculosis are economically important diseases, causing great losses to cattle industry. A cellular immune response is present in both infections at initial stages and a humoral response is observed as the disease progresses. The objective of the present work was to determine the effect of the presence of *F. hepatica* infections on the diagnostic tests for bovine tuberculosis. The intradermal test (tuberculin test) was applied to 124 bovine located in Acatlán, Hidalgo, and 34 animals (27.4%) were reactors; these animals were tested using the comparative cervical intradermal test and 19/34 (55.88%) were positive, 12/34 (35.29%) dubious, and 3/34 (8.82%) were negative. The 34 reactors were also evaluated using the IFN- γ test and 26 were positive. Humoral immune response was evaluated by indirect ELISA, using *M. bovis* culture filtrate protein extract (CFPE) and 31 animals were positive. The 34 reactors were tested also for *F. hepatica* infection and 20 were found positive by sedimentation, 10 were positive to IFN- γ and 33 were positive in ELISA using the secretion-excretion *F. hepatica* antigen (SEFh). Western blot analysis showed mainly recognition of proteins of the CFPE of 78, 132 and 216 kDa by serum samples of infected bovines with a frequency of 60, 40 and 33% while the most frequently recognized components of the SEFh were a protein of 216 kDa by 78% of serum samples and proteins of 19 and 200 kDa by 70% serum samples. Statistical analysis did not show significant increase in number of reactors in the tuberculin test due to *F. hepatica* simultaneous infection.

EFECTO DE *Fasciola hepatica* EN LA RESPUESTA A LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA BAJO CONDICIONES DE CAMPO.

1. Introducción.

La fasciolosis es una enfermedad estimada en 3 billones de dólares anuales y se calcula que 2-4 millones de gente padecen esta parasitosis (Espino, 2007), puede disminuir del 20% al 80% la producción de leche y del 8% a un 50% la producción de carne, según la gravedad del cuadro clínico (González, 2007); además predispone a la presencia de otras enfermedades como la tuberculosis bovina, ocasionada por *M. bovis*, la cual causa importantes pérdidas al disminuir la producción láctea hasta en un 17%, además representa una barrera no arancelaria para la comercialización de bovinos para engorda (Milián., et al., 2001). Ambas infecciones son zoonóticas.

Los dos agentes infecciosos presentan primordialmente una respuesta inmune de tipo celular al inicio de su establecimiento, y posteriormente cambian a una respuesta inmune de tipo humoral (Flynn., et al., 2007).

Para ambas enfermedades existen las pruebas diagnósticas basadas en la respuesta de tipo celular, humoral y observación del agente etiológico. Para el diagnóstico de *F. hepatica* la prueba más usual es el examen coproparasitoscópico, es decir la observación del huevo del parásito. En los últimos años la prueba de ELISA ha sido utilizada principalmente en medicina humana y en trabajos de investigación en medicina veterinaria (Espino., et al.

1993). En condiciones experimentales la prueba de ELISA para *F. hepatica*, representa un diagnóstico más temprano con respecto a la prueba coproparasitoscópica por la técnica de sedimentación, es decir se pueden detectar anticuerpos desde la 2ª semana postinfección (Cruz., *et al.*, 1999) o animales positivos con 4 semanas de adelanto con respecto a la sedimentación, en la cual se observa el huevo hasta la 10ª semana postinfección (Mezo., *et al.*, 1997). Sin embargo en condiciones naturales es impreciso el diagnóstico, ya que la prueba de ELISA nos da una referencia de la exposición al agente etiológico, pero no indica que se encuentre el parásito en el huésped.

Por su parte el IFN- γ es una prueba realizada principalmente en trabajos de investigación de *F. hepatica* (Hoyle., *et al.*, 2003).

Las pruebas diagnósticas para la tuberculosis bovina en México se mencionan en la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-Z00 1995) Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*M. bovis*), las pruebas oficiales son: prueba intradérmica caudal, prueba cervical comparativa, prueba cervical simple, histopatología y aislamiento bacteriológico. Sin embargo, otra prueba que puede ser empleada es el IFN- γ el cual se basa principalmente en la respuesta inmune celular (Wood., *et al.*, 2001), el IFN- γ es producido por las células CD4+, CD8+ y por las células asesinas naturales (NK). La evaluación de la respuesta de tipo humoral es mediante la prueba de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos, principalmente isotipo IgG₁ (Bossaert, *et al.*, 2000; Díaz., *et al.*, 2003; Jiménez., *et al.*, 2009). Esta prueba diagnóstica se puede emplear para detectar animales anérgicos, que presentan una pobre respuesta

inmune de tipo celular, pero gran cantidad de anticuerpos (Jiménez., *et al.*, 2009; Packett., *et al.*, 1989).

No son muchos los estudios que se han realizado en ganado coinfectado con *F. hepatica* y *M. bovis*, en los cuales se ha evaluado la respuesta inmune, diagnóstico y progresión de la enfermedad; en estos trabajos se demostró que la presencia de *F. hepatica* disminuye la respuesta celular y puede tener implicaciones en el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Flynn., *et al.*, 2009; McNair., *et al.*, 2009), por lo que debe ser considerada en el diagnóstico y erradicación de esta enfermedad.

1.1 Generalidades de *F. hepatica*.

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que se debe a la presencia y acción del trematodo *F. hepatica* en el parénquima hepático, vesícula y conductos biliares, también como parásito errático puede estar en pulmones y tejido subcutáneo de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, hombre y otros animales silvestres ([Carrada, 2003](#)).

La fasciolosis también se le conoce como distomatosis hepática, palomilla o conchuela del hígado picado, hígado podrido o mal de botella.

El parásito adulto mide de 18 a 50 por 4 a 14 mm; el cuerpo es aplanado dorsoventralmente de forma foliácea. Los huevos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras, posee un opérculo ([Quiroz, 1984](#)).

1.2 Ciclo evolutivo de *F. hepatica*.

Los huevos pasan al duodeno con la bilis y salen del huésped con las heces. Es necesario un medio hídrico para su desarrollo. El tiempo de desarrollo y

el nacimiento del miracidio depende en gran parte de la temperatura, a 26°C los miracidios eclosionan en 9 días, pero a 10°C no se desarrollan; sin embargo, permanecen viables durante un largo período y pueden continuar su desarrollo cuando las condiciones son favorables. Para su ulterior desarrollo es necesario un huésped intermediario, debido a que no puede vivir más de 24 horas en vida libre o pocos días a bajas temperaturas; siendo este huésped intermediario el caracol del género *Limnaea*. Las especies que se han identificado en México son *L. bulimoides*, *L. cubensis*, *L. humilis* (Quiroz, 1984).

El miracidio que penetra activamente en el caracol pierde su cubierta de pestañas y se transforma en esporoquiste de 500 micras (μm) de longitud; a partir de la pared de éste se forman de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en redias, éstas fuerzan la pared del esporoquiste y continúan creciendo en las glándulas intestinales del caracol, las redias forman masas germinativas, que dan lugar a las cercarias; después de 6 a 8 semanas las cercarias abandonan a las redias y al caracol. La cantidad de cercarias originadas de un solo miracidio puede llegar a ser de 600, la cercaria se adhiere a la superficie de plantas u objetos en el agua y se transforma en metacercaria.

La infección se realiza por medio de la ingestión de alimentos (forraje verde o agua) contaminado con metacercarias. En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el joven trematodo; penetra activamente a través de la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en el transcurso de 2 a 28 horas; luego penetra en el hígado, perforando la cápsula y de 4 a 6 días después llega al tejido hepático por el que vaga de 6 a 8 semanas para finalmente asentarse en un conducto biliar. El periodo prepatente es de 9 semanas a 3 meses (Quiroz, 1984).

La cronología de los estados evolutivos de fasciola se puede resumir así: eclosión de los huevos 2 a 4 semanas, emisión de cercarias por los caracoles 5 a 12 semanas, período prepatente en grandes mamíferos 10 semanas. El desarrollo del miracidio hasta cercaria a una temperatura de 15 a 20°C es de tres meses (Quiroz, 1984) (Figura 1).

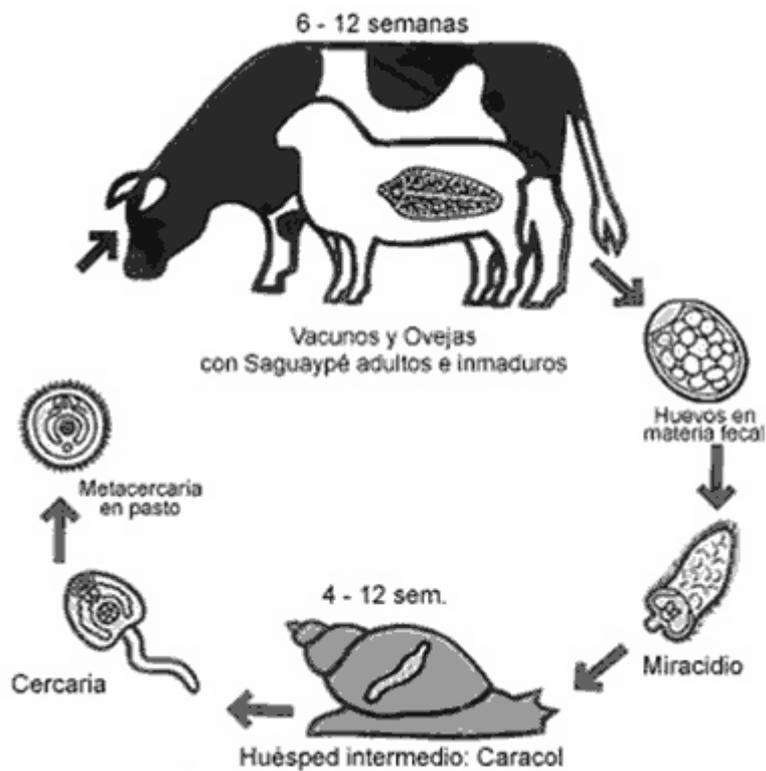


Figura 1. Ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica*.

Fuente: http://www.engormix.com/medio_ambiente_parasitismo_s_articulos_1966_GDC.htm

De acuerdo con el grado de susceptibilidad de varios huéspedes a la infección por *F. hepatica*, se han agrupado de la siguiente manera, siendo los más susceptibles: ovinos y animales de laboratorio; con menor susceptibilidad del grupo anterior caballos y burros; bovinos y el hombre están en el grupo intermedio, finalmente los cerdos en el de mayor resistencia.

1.3 Antígenos de *F. hepatica*.

Para *F. hepatica* se ha desarrollado el uso de antígenos somáticos, tegumento y productos de secreción/excreción (SEFh) en el diagnóstico de la infección activa, sin embargo, el grupo de Espino y colaboradores mencionan que los antígenos de SEFh parecen ofrecer los mejores resultados para el diagnóstico de la fasciolosis humana y animal (Espino., *et al.*, 1993). Los antígenos de SEFh son más estables que el antígeno somático (Bossaert., *et al.*, 2000), por lo que productos de SEFh son considerados potentes inductores de la respuesta inmune humoral, superando a los antígenos somáticos en el inmunodiagnóstico (Colmenares., *et al.*, 2007). Los antígenos de SEFh presentan 4 polipéptidos comunes con el antígeno somático y tegumentario de *F. hepatica* (Espino., *et al.*, 1993). Los polipéptidos identificados desde la primera semana de infección parecen ser moléculas de gran poder inmunogénico liberadas primeramente por las formas inmaduras (Díaz., *et al.*, 1998) los productos de SEFh están compuestos por algunas moléculas de naturaleza glicoproteica. Entre los componentes destacan la cisteína proteinasas, con 25 y 16 kDa (Colmenares., *et al.*, 2007). La thioredoxin-peroxidasa contenida en los productos de SEFh inducen la activación alterna de macrófagos, ello contribuye entre otras causas, la presencia de respuesta tipo Th2 y supresión de la respuesta Th1 (Bautista., *et al.*, 2008). A la catepsin-L proteasa se le atribuye la actividad supresiva en los linfocitos del huésped (Hoyle & Taylor., 2003).

Se ha observado que los antígenos de SEFh inducen inmunosupresión, está relacionada con los componentes glucosídicos, éstos tienen un peso molecular de 12 y 23 kDa. La inmunosupresión se ha encontrado en procesos crónicos de la parasitosis principalmente con *F. hepatica* (Cervi., *et al.*, 1996).

Se ha descrito que durante las primeras 3 ó 4 semanas de la infección, el parásito inmaduro se encuentra en migración por el parénquima hepático, por lo que sus productos de SEFh son vertidos a la circulación y pueden ser detectados en la sangre en forma libre. La presencia de estos productos en la circulación constituye el principal estímulo antigénico al sistema inmunológico del huésped e induce de manera inmediata la formación de anticuerpos específicos contra el parásito, a partir de la 2 ó 3 semana postinfección ([Pelayo., et al., 1998](#)).

El grupo de Espino, han demostrado diferentes epítomos de los antígenos de SEFh, uno de los que más se ha utilizado es de 11.5 kDa de la proteína FhSAP-2 que es un antígeno temprano ([Espino., et al., 2007](#)). Así mismo, en otro estudio reportan que el epítome reconocido por el anticuerpo monoclonal ES-78 es conformacional, glicoproteico y presenta al menos un puente disulfuro y β -galactosa en su estructura, posiblemente en forma del disacárido galactosa β (1-3)-N acetil galactosamina ([Marcet., et al., 2004](#)).

1.4 Respuesta inmune contra *F. hepatica*.

El establecimiento y sobrevivencia con el huésped depende de la habilidad del parásito para evitar la respuesta inmune de su hospedero, esto se logra mediante el cambio constante del glicocálix del tegumento del parásito, mediante la exposición de diferentes vesículas que contienen productos de SEFh, con el fin de evitar el reconocimiento inmunológico por los anticuerpos sintetizados contra los antígenos de la superficie del parásito. En relación con este recambio, sobre el tegumento del parásito se ha identificado la presencia de gránulos T0 característicos del parásito joven recién desenquistado, a gránulos de tipo T1 y T2

que caracterizan al parásito inmaduro y maduro, respectivamente; estas estructuras fisiológicamente diferentes, poseen componentes antigénicos de SEFh, que en cada estadio el parásito libera al medio circulante (Díaz., *et al*, 1998).

En varios estudios se ha demostrado la capacidad supresiva del parásito en el huésped, siendo los linfocitos la población afectada (Moreau., *et al*, 2002).

Se ha visto que la respuesta predominante es Th2. En animales con alta carga de infección se ha observado que existe una supresión total de las citocinas IFN- γ e IL-2 comparada con los que no tienen o tienen una carga parasitaria menor (O'Neill., *et al*, 2000).

Se establece una respuesta inmune de tipo celular por los antígenos de SEFh de las formas juveniles seguida por las formas adultas del parásito, por lo cual es muy corto el período de esta respuesta celular. La respuesta inmune contra las adolescarias ocurre a nivel peritoneal en donde son atacadas y muertas por eosinófilos. La respuesta humoral se presenta a partir de la segunda semana postinfección detectándose las inmunoglobulinas isotipo IgM, IgG₁ e IgG₂ y decrece a la 13 semana postinfección (Phiri, *et al*, 2006).

Estudios realizados por Ortega y colaboradores mostraron que ovinos infectados experimentalmente presentaron una respuesta de tipo celular, observándose una mayor proporción de CD4⁺; en animales reinfectados la población que predominó fueron los linfocitos CD8⁺(Ortega., *et al*, 2002). La susceptibilidad al parásito se atribuye al predominio de la respuesta humoral (O'Neill., *et al*, 2000).

1.5 Pruebas diagnósticas de *F. hepatica*.

1.5.1 Prueba basada en la observación del huevo de *F. hepatica*:

Técnica de Sedimentación. Se basa en la gravedad y el tiempo de caída de los huevos de *F. hepatica* en el agua que es de 100 mm/minuto, más rápido que el de la caída de detritos de la materia fecal. El tiempo de sedimentación debe ser máximo 3 a 4 minutos. La sedimentación de los huevos puede ser auxiliada con el uso de soluciones jabonosas que ayudan a desprender los huevos de las materias fecales. Los resultados cuantitativos son dados en huevos/gr de materia fecal (Aguirre., *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que la sedimentación-flotación para 4 gr tiene una sensibilidad y especificidad de 43% y 100% respectivamente, sin embargo cuando se realizan los copros de 10 gr con tres repeticiones cada uno se tienen 64% de sensibilidad y 93% de especificidad (Charlier., *et al.*, 2008).

1.5.2 Interferón gamma (IFN- γ). Técnica diagnóstica indirecta donde se cuantifica la liberación de IFN- γ por parte de los linfocitos naturalmente sensibilizados, con un antígeno específico de SEFh o diversas fracciones antigénicas, presentando una sensibilidad y especificidad de 93.6% y 96.2% respectivamente.

El pico de producción de IFN- γ ocurre entre la 1 y 4 semanas postinfección con estímulo inespecífico y específico (Flynn & Mulcahy, 2008), en otros estudios se observa el incremento de IFN- γ de 2-5 semanas postinfección (Clero., Mulcahy., 1998).

Algunas investigaciones reportan una respuesta Th0, que es una respuesta inmune indiferenciada que, de acuerdo al patrón de citocinas presentes en el

medio, da lugar a la diferenciación hacia una respuesta de tipo Th1 si se expresan citocinas como IFN- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada; o bien hacia una respuesta de tipo Th2 si las citocinas predominantes con IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL10 e IL 13 (Abbas, 2004).

Se ha observado que la producción de IFN- γ disminuye en animales co-infectados con *F. hepatica*. En animales con alto grado de infección es variable la producción de IFN- γ en respuesta al antígeno (Clery., *et al.*, 1996). *F. hepatica* induce la producción de IL-10 con la disminución de las funciones de los macrófagos e IFN- γ (Moreau., *et al.*, 2002) con su posterior disminución (Bossaert., *et al.*, 2000). Esto sugiere una temprana estimulación de producción de IFN- γ (Clery., *et al* 1998). La resistencia se asocia a la respuesta celular (O'Neill., *et al.*, 2000).

1.5.3 Prueba basada en la respuesta inmune humoral. Las pruebas serológicas es la evaluación de la respuesta inmune humoral que se asocia a un proceso crónico, la detección de anticuerpos contra el agente infeccioso. Los resultados obtenidos con ELISA usando un antígeno anti-49.5 monoespecífico para detectar en coproantígeno, mostró una sensibilidad de 91.4 % y una especificidad de 92.3% (Arafa., *et al.*, 1999). La sensibilidad y especificidad para DOT-ELISA tiene 97.3% y 93.3% (Sakru., *et al.*, 2004). En trabajos realizados se ha observado que los isotipo IgG₁ se encuentra a partir de la 2 – 6 semana postinfección, la IgG₂ inicia de la 2 – 8 semana postinfección y decrece a la 13 semana postinfección (Phiri., *et al.*, 2006).

1.5.3.1 Prueba de ELISA. El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrómetro o un colorímetro (www.cultek.com). El marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas de ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y sustrato.

El ELISA indirecta emplea el principio de la detección del complejo antígeno anticuerpo (IgG o IgM), mediante conjugados anti inmunoglobulinas especie específicas marcadas con una enzima la cual es revelada por la adición de su sustrato. Esto permite determinar la concentración de antígeno o de anticuerpos, mediante el uso de uno de ellos unido a una fase sólida y el otro en

solución, es de gran utilidad sobre todo en la etapa migratoria del parásito. Tiene una sensibilidad del 97.6% y especificidad de 93.8 % (Carrada., 2002).

Los isotipos que se han encontrado son IgM, IgG₁, IgG₂ e IgA, sin embargo en animales crónicamente infectados la IgG₁ es dominante (Clery., *et al.*, 1996), el ELISA para IgG₁ tiene una sensibilidad y especificidad de 92% y 94% respectivamente (Bossaert., *et al.*, 2000), registrándose niveles máximos a la 3 semanas postinfección con su gradual disminución hasta la semana 15 (Clery., *et al.*, 1996).

1.5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE SDS). Permite el cálculo de parámetros moleculares, pues los complejos SDS proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular, el SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína.

Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos). La movilidad es solamente función de la masa molecular, es decir, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa.

1.5.5 Western blot. Se puede obtener información acerca de las proteínas si éstas se transfieren desde el gel a una membrana. El proceso de transferencia se denomina blotting y fue originalmente descrita por E. M. Southern para el caso de DNA (Southern Blot); posteriormente y continuando con la misma terminología, se describió para el caso de RNA y proteínas (Northern y Western Blot respectivamente).

Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles (cosa que no ocurre en el gel) para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación; en la mayoría de los casos, estas moléculas son anticuerpos (el proceso se conoce como inmunoblotting), pero también pueden ser lectinas, ácidos nucleicos, receptores o cualquier otro ligando. El proceso consta de cuatro fases:

- Transferencia: puede llevarse a cabo por diferentes métodos (difusión, aplicando vacío, por capilaridad), pero para proteínas separadas en geles de poliacrilamida se suele recurrir a un campo eléctrico que se aplica perpendicularmente al plano del gel.
- Bloqueo de la membrana: una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo, para prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado 'background' o falsos positivos. Se han descrito numerosas soluciones bloqueantes, y todas ellas son efectivas. El factor esencial a tener en cuenta es elegir un sistema de bloqueo compatible con el sistema de detección empleado. Por ejemplo, las soluciones de bloqueo que contienen leche desnatada contienen una gran cantidad de carbohidratos complejos, y por ello deben descartarse cuando se van a emplear

anticuerpos que reconocen determinantes en carbohidratos, o por ejemplo se ha de evitar el uso de suero completo si en la detección se emplea proteína A o proteína G.

Las dos soluciones de bloqueo que son compatibles con casi cualquier sistema de detección son las soluciones de leche desnatada y las soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). También se recomienda el bloqueo en Tween-20 si hay demasiados falsos positivos. Sin embargo es conveniente usar con cuidado los detergentes no iónicos como Tween-20 pues pueden solubilizar las proteínas transferidas al filtro.

- Unión del ligando: existen anticuerpos policlonales con alta especificidad y sensibilidad como [monoclonales](#). Sin embargo los monoclonales se pueden obtener en mayor cantidad y mantienen siempre sus propiedades de reconocimiento independientemente del lote.

Como anticuerpos secundarios se suelen emplear anticuerpos obtenidos inoculando en la especie productoras inmunoglobulinas de la especie a detectar (anticuerpos anti-especie). También se emplean los fragmentos Fab2, producidos mediante digestión con pepsina de los anticuerpos puros, y que, al carecer de región Fc no interfieren con algunos componentes de los tejidos que pueden estar presentes en las muestras biológicas complejas, reduciendo los falsos positivos.

Tanto la [proteína A](#) como la [proteína G](#) son proteínas que se aíslan de la pared celular de bacterias y que tienen la capacidad de unirse a la región Fc de los anticuerpos. Ambas pueden ser marcadas con facilidad con enzimas y otros marcadores. La proteína G tiene una capacidad de reconocimiento más amplia que la proteína A.

- Detección: existen tres grandes grupos de marcadores o sistemas de revelado empleados en 'Western blotting':
 - ❖ Enzimas, que catalizan una reacción en la que se forma un precipitado coloreado, o en la que se emite luz.
 - ❖ Radioquímicos, que emiten radiaciones ionizantes.
 - ❖ Oro coloidal, que acumulado localmente produce un color rojizo y que puede actuar como catalizador para la deposición de plata, con lo que se incrementa la señal.

Enzimas. Las dos enzimas más empleadas para marcar proteína A o G o anticuerpos son la peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina.

Sustratos colorimétricos: el 4-cloro-1-naftol en presencia de HRP y de peróxido de hidrógeno el cloronaftol produce un precipitado azul-negro. La reacción es fácilmente controlable, aunque es relativamente insensible cuando se compara con 3,3' diaminobenzidina y 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm).

1.6 Generalidades de *M. bovis*.

La TB es una enfermedad infecciosa, causada por especies del género *Mycobacterium*, que afecta al hombre y los animales y se caracteriza por la presencia de bacilo tuberculoso y necrosis caseosa de los tejidos (OIE., 2004).

La *M. bovis* pertenece al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, es un microorganismo de morfología bacilar, encuadrado dentro de las bacterias gram positivas (aunque su tinción por esta técnica es difícil), con un elevado porcentaje

de guanina+citosina en su ADN, aeróbico, no esporulado, inmóvil y de crecimiento muy lento.

Su pared celular contiene más de un 60% de lípidos que son los responsables de su característica ácido alcohol resistencia. Esta propiedad se demuestra mediante las tinciones de Ziehl–Neelsen y auramina fenolada.

La epidemiología de esta infección es muy compleja y engloba interacciones entre el hombre y animales domésticos. Existe un amplio número de hospederos incluyendo animales salvajes como tejón (*Meles meles*), pósoms (*Trichosurus vulpecula*), venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) entre otros, por lo tanto mantienen la tuberculosis (Waters., et al., 2006).

La sobrevivencia de *M. bovis* puede ser por largos períodos de tiempo si las condiciones ambientales son favorables. Si se contaminan heces o suelo estéril con *M. bovis* y se almacenan protegidos de la luz, los microorganismos pueden sobrevivir varios meses. En el caso de los cadáveres de animales infectados, la supervivencia de *M. bovis* depende del grado de putrefacción de los mismos. Estos cadáveres son, pues, fuente de infección para los carroñeros y para el ganado que pasta en sus proximidades. Este mecanismo primordialmente se ha demostrado en zonas de baja prevalencia de TB, como en algunos estados de Estados Unidos de América y algunos países de Europa como Reino Unido y Nueva Zelanda, la persistencia de la tuberculosis se atribuye frecuentemente a reservorios de *M. bovis* de animales silvestre y ferales (Nelly., et al., 2001).

1.7 Patogenia de *M. bovis* en ganado bovino.

La primera fase de la patogénesis inicia con la inhalación de bacilo tuberculoso. Los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo y otros lo destruyen. En esta fase, la destrucción de la micobacteria depende de la capacidad intrínseca microbicida del huésped. La segunda fase los monocitos y otras células inflamatorias son atraídas por los pulmones. Estos monocitos pueden diferenciarse en macrófagos con una facilidad de ingesta, pero no de destrucción de la micobacteria. En esta fase la micobacteria crece logarítmicamente. La tercera fase es cuando se detiene el crecimiento del bacilo. Después de 2–3 semana postinfección, se desarrolla una respuesta de tipo celular (Crevel van., et al., 2002).

En el ganado bovino, los resultados de infecciones experimentales por las vías respiratoria y digestiva, junto con la distribución de las lesiones encontradas en el ganado naturalmente infectado, muestran que aproximadamente un 80-90% del ganado se infecta por inhalación, siendo la infección tuberculosa primaria pulmonar en el 90% de los casos. Bastan unos pocos bacilos para producir la infección por vía respiratoria, mientras que se necesitan varios miles de millones para hacerlo por vía oral (Aranaz., et al., 1996; Nelly., et al., 2001).

Existe una relación inversamente proporcional entre la dosis infectante y el tiempo que transcurre hasta la excreción respiratoria de *M. bovis*. En las infecciones naturales, la excreción comienza a los 87 días de la infección, ocurriendo en algunos casos en ganado todavía negativo a la tuberculina (Aranaz., et al., 1996).

Debido a su escaso tamaño (1 a 5 μm) y sus especiales características físicas, pueden alcanzar las zonas más profundas del aparato respiratorio

(regiones inferiores y medias de ambos pulmones). Estas zonas están mejor ventiladas y, por lo tanto, están más expuestas a la llegada de partículas infecciosas.

Cuando un animal no sensibilizado previamente, inhala bacilos tuberculosos, las barreras mecánicas de las vías respiratorias altas y el sistema mucociliar de la mucosa bronquial eliminan las partículas grandes y sólo las que tienen un diámetro menor o igual a 5 μm alcanzan el alveolo, donde los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares. La posibilidad de desarrollar enfermedad pulmonar a partir de esta infección inicial dependerá principalmente de la virulencia de la bacteria y de la capacidad bactericida inherente al macrófago alveolar que lo fagocita. La tuberculosis pulmonar suele iniciarse en la unión bronquiolo alveolar y se extiende hacia el alvéolo constituyendo en sus comienzos una pequeña lesión sublobulillar, lobulillar o, incluso, puede involucrar a más de un lobulillo. Estas lesiones primarias únicas ó múltiples, aparecen especialmente en zonas subpleurales de las porciones dorsocaudales de los lóbulos principales diafragmáticos.

La formación del foco primario, son los macrófagos que frecuentemente asumen una apariencia distinta, se pueden observar como células gigantes (tipo Langhans). Una mezcla de células epiteloideas y gigantes forman el centro de un tubérculo, rodeado por una zona de linfocitos células plasmáticas y monocitos y, a medida que la lesión progresa, el tubérculo desarrolla difroplasia periférica y necrosis caseosa central; la mineralización puede ser observada en esta pared de necrosis caseosa (Nelly., *et al.*, 2001).

Las lesiones producidas en el curso de la tuberculosis respiratoria bovina son de tipo productivo (o proliferativo) y de tipo exudativo. Estas diferencias

morfológicas en cuanto a su presentación, dependen de distintos factores ligados tanto al hospedador como al agente causal: especie animal, resistencia individual, tipo de micobacteria tuberculosa en el animal afectado, órgano afectado, carga antigénica y grado de hipersensibilidad del animal y factores inherentes al bacilo. La formación y mantenimiento de granulomas es esencial para el control de la infección con micobacteria (Hasan., *et al.*, 2009).

1.8 Antígenos de secreción de *M. bovis*.

La superficie de la micobacteria contiene antígenos que pertenecen a un complejo no proteico que son altamente inmunorreactivos. Estos complejos son químicamente heterogéneos y estructuralmente complejos (Sharma., *et al.*, 2006).

Diversos estudios se han realizado para clasificar y determinar los antígenos de secreción de la micobacteria; sin embargo, hay más información de *M. tuberculosis* y en menor cantidad de *M. bovis*. La clasificación de proteínas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* son: MPT32 41kDa, MPT45 31.5 kDa, MPT44 31 kDa, MPT59 30kDa, MPT 51 27 kDa, MPT64 26 kDa, MPB70 23 kDa, MPT63 18 kDa, MPT53 15 kDa (Wiker & Harboe., 1992). Se menciona que los antígenos fuertemente reactivos son: complejo Ag85, ESAT-6, CFP-10, MPB70, MPB83, P38 (Meickle., *et al.*, 2009).

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados a la fecha son proteínas solubles. La proteína de secreción mayormente producida por *M. bovis* es la MPB70, esta glicoproteína cuyo peso molecular puede oscilar entre 22 a 25 kDa dependiendo del grado de glicosilación (Fifis., *et al.*, 1989), otra es la MPB83 lipoproteína de 23 kDa que en su forma nativa se localiza asociada a la superficie

bacteriana, es comúnmente reconocido por las especies de estudio común en animales silvestres (Lyashchenko., 2008).

Se ha observado que los antígenos de secreción de las micobacterias inducen una fuerte respuesta inmune celular como humoral (Díaz., *et al.*, 2002). Las proteínas más observadas fueron las que tuvieron pesos de 23 a 33 kDa del sobrenadante, siendo más amplio el rango de los pesos de las proteínas en el Western blot y estos pesos van de 17 a 80 kDa en extracto celular (Cataldi., *et al.*, 1994).

1.9 Respuesta inmune para *M. bovis*.

Se sabe que los mecanismos inmunológicos más importantes que ocurren en el pulmón se pueden clasificar en innatos y adaptativos (Peters, *et al.*, 2003). En el primer caso tienen participación los macrófagos, los neutrófilos y el sistema del complemento. A través de los mecanismos de respuesta inmune innata el organismo trata de combatir a la micobacteria, con la remoción mucociliar en vías respiratorias altas, y la acción del sistema del complemento donde las micobacterias pueden entrar a los macrófagos vía receptores para los componentes del complemento. Otro de los mecanismos de destrucción presentes en los macrófagos, son los receptores de manosa, esta es una proteína transmembranal, con un dominio extracelular que contiene ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos dependientes de calcio característica de lectinas (Taylor, 1993).

En el segundo caso participan células T y B que son capaces de reconocer antígenos. Las respuestas inmunes adaptativas dependen de las células T

cooperadoras (Th CD4⁺) y células T citotóxicas (Tc CD8⁺), siendo las dos muy importantes en procesos infecciosos donde están involucradas las micobacterias (Prince, *et al.*, 2003). La inmunidad adaptativa se da en principio por tres procesos: presentación del antígeno, coestimulación y producción de citocinas. Primero el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) presenta moléculas proteicas micobacterianas, inmunidad celular para antígenos específicos células T CD4⁺, tienen un efecto protector por la producción de citocinas, Th1 fue caracterizada por la producción de IFN- γ . Segundo el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I) presenta antígeno específico CD8⁺ que contribuye a la secreción de citocinas que realizan lisis de células infectadas. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de la IL-4 (Crevel van., *et al.*, 2002).

Las citocinas son moléculas que resultan de la activación de la respuesta celular y existen las proinflamatorias y antiinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) que se produce por la estimulación de monocitos, macrófagos y células dendríticas, TNF- α juega un papel clave en la formación del granuloma y tiene propiedades inmunoreguladoras, IL-1 β que es producida por las mismas células que producen el TNF- α , IL-6 tiene propiedades pro y antiinflamatoria, IL-12 crucial en la producción de IFN- γ , IL-18 estimula producción de otras citocinas proinflamatorias, quimiocinas factores de transcripción, IFN- γ , juegan un papel importante en el control de la infección contra *Mycobacterium* (Rhodes, 2000). Las citocinas antiinflamatorias son: IL-10 que es producida por los macrófagos después de la fagocitosis, Factor de Crecimiento Tumoral beta (TGF- β) producido por monocitos y células dendríticas, IL-4 esta citocina suprime la producción de IFN- α y activación de macrófagos (Crevel van., *et al.*, 2002).

En la fase temprana de la infección de *M. bovis* se caracteriza por una fuerte producción de IFN- γ que responde a moléculas < de 10 kDa, el progreso de la enfermedad puede cambiar de Th1 a Th2, con una asociación de anergia (respuesta celular disminuida) y el desarrollo de una respuesta humoral (Plackett., *et al.*, 1989).

Además, el desarrollo y mantenimiento de una respuesta Th1 IFN- γ esta asociada con un mayor control de la infección para *M. tuberculosis*, el progreso de la respuesta inmune de un Th1 contra Th0 desarrolla una patología extensa y menor desempeño en las pruebas diagnósticas basadas en inmunidad mediada por células (CMI), pero desarrollan una fuerte respuesta humoral IgG₁ (Welsh., *et al.*, 2005).

En términos generales existe una relación recíproca entre la etapa temprana con una respuesta celular en la que se han basado las pruebas diagnósticas como hipersensibilidad retardada, proliferación de linfocitos, producción de IL-2, e IFN- γ , y etapa tardía con una respuesta humoral, con la detección de IgG₁ que se detectan de la 6 - 8 semanas postinfección con un incremento de la 8 - 20 semana postinfección (Welsh., *et al.*, 2005), se han detectado altos niveles de anticuerpos en suero de animales infectados en estados avanzados de la infección o en animales con lesiones diseminadas (Ritacco, *et al.*, 1991). La presencia de anticuerpos está generalmente asociada a estadio tardío de la enfermedad, por lo que el empleo del ELISA en la detección de anticuerpos contra *M. bovis* se propone como una prueba adicional a las pruebas de hipersensibilidad retardada, para poder determinar estadios avanzados de la enfermedad y animales anérgicos (Jiménez, *et al.*, 2009; Silva, 2001; Plackett., *et al.*, 1989).

1.10 Diagnóstico para *M. bovis*.

1.10.1 Intradermoreacción (Hipersensibilidad tipo IV). La intradermoreacción es la clásica prueba en el diagnóstico de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en medicina humana y medicina veterinaria. La hipersensibilidad retardada es un indicador de la respuesta inmune celular, esta es consecuencia de la infección y enfermedad (Thom., *et al.*, 2004). La prueba caudal tiene una sensibilidad de 72% y especificidad del 98.8%, la prueba cervical comparativa tiene una sensibilidad de 68.6%-95% y una especificidad de 88.8%-99.9% (Adams., 2001).

El desafío intradérmico con tuberculina, activa linfocitos, que secretan TNF- α y TNF- β (Cascante., *et al.*, 2007); los que actúan sobre células endoteliales induciendo secuencialmente, moléculas de adhesión como: CD 54 (ICAM-1), CD106 (VCAM-1), CD62 selectina-E en el endotelio y en leucocitos, de esta forma los leucocitos circulantes pueden migrar al sitio de lesión mediante un proceso inflamatorio firmemente regulado al sitio de reacción (Sánchez., *et al.*, 2008). Intervienen inicialmente neutrófilos a las 4 horas, monocitos a las 12 horas que constituyen 80-90% del infiltrado celular total y células T.

1.10.2 Prueba de IFN- γ . Esta técnica diagnóstica indirecta, donde se cuantifica la liberación de citocina IFN- γ por parte de los linfocitos naturalmente sensibilizados, tras ser estimulados con un antígeno específico PPD bovina, PPD aviar o diversas fracciones antigénicas presentando una sensibilidad que varía de 81.8%-100% y una especificidad de 94%-100% (Wood., 2001). Sin embargo en otros estudios el IFN- γ ha mostrado una sensibilidad de 85% y una especificidad de 93% en ganado dado como rector positivo a la prueba intradérmica caudal

(Buddle., *et al* 2001). En algunos estudios realizados con la prueba intradérmica que son dados como negativos, en los resultados de IFN- γ son positivos, por lo que representaría un diagnóstico más temprano (Plackett., *et al.*, 1989).

1.10.3 Prueba de ELISA. En la detección de IgG anti *M. bovis* se han obtenidos 73.6% y 94.1% de sensibilidad y especificidad respectivamente (Ritacco., *et al* 1990). La producción de anticuerpos en las diferentes etapas de la enfermedad es muy variable, pudiéndose presentar de forma más acentuada en etapas avanzadas de la enfermedad, asociada a una respuesta inmune celular insuficiente o negativa debido al estado de anergia del animal. Motivos como el mencionado impulsaron el desarrollado del test serológico ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent Assay), para el diagnóstico de esta enfermedad. Esta técnica ha sido llevada a cabo y evaluada en diferentes trabajos presentando resultados variables (sensibilidad y especificidad). Por tal motivo, esta alternativa diagnóstica es considerada insuficiente para ser incorporada aún como herramienta válida en un programa de saneamiento (Gaborick, *et al.*, 1996).

4. Objetivo General.

Determinar el efecto de la presencia de *F. hepatica* en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina.

4.1 Objetivos Particulares.

4.1.1 Determinar mediante las pruebas de ELISA y Western blot, la reactividad cruzada entre antígenos de *M. bovis* y antígenos de *F. hepatica*.

4.1.2 Determinar mediante las pruebas de tuberculina e IFN- γ , la respuesta inmune celular a *M. bovis* en bovinos infectados con *F. hepatica*, así como en animales libres de esta parasitosis.

3. Hipótesis.

La infección de *F. hepatica* en bovinos aumenta los reactores a la prueba de tuberculina, utilizada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina bajo condiciones de campo.

2. Justificación.

Se sabe que en muchas de las zonas con altas prevalencias de tuberculosis también la fasciolosis es endémica. Sin embargo, no existen estudios en el país que muestren si la presencia de *F. hepatica* puede estar afectando el diagnóstico de la tuberculosis. El estudio de la interacción de estas dos enfermedades permitirá un mejor diagnóstico de la tuberculosis lo que resultará en un mejor control de esta enfermedad y disminuirá las pérdidas económicas asociadas a ella.

5. Material y métodos.

El presente trabajo se realizó en el Distrito Federal, en el Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Laboratorio de Parasitología de Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Así como en el laboratorio del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud (SS).

El trabajo de campo se realizó en el Municipio de Acatlán, estado de Hidalgo, México.

5.1 Animales. Se utilizaron 124 bovinos de la raza Holstein-Frisian, hembras mayores de 12 meses de edad. Pertenecientes a un hato ubicado en el Municipio de Acatlán, que se localiza 20°09' latitud norte y 98°26' longitud este y tiene una altura sobre el nivel del mar de 2120 mts, perteneciente al estado de Hidalgo, México.

5.2 Diseño Experimental. Las pruebas iniciales que se hicieron fueron la prueba intradérmica caudal a todos los animales del hato, ese mismo día se tomaron muestras de heces de cada uno de los animales, para la técnica de sedimentación. A las 72 horas se realizó la lectura de la prueba intradérmica caudal, dando como resultado 34 animales reactivos; a los reactivos se realizó la prueba intradérmica cervical comparativa; dando como resultado tres grupos:

positivos (P) 19/34, sospechosos (S) 12/34 y negativos (N) 3/34. A cada grupo se les efectuó la prueba de IFN- γ , ELISA para *F. hepatica* y *M. bovis*.

No se realizó la prueba de IFN- γ a los animales no reactivos a PPD bovino, sin embargo, a todos los animales se les realizó la prueba de ELISA para *F. hepatica* y *M. bovis*.

5.3 Prueba coproparasitológica, técnica de sedimentación: Se obtuvieron heces de cada uno de los animales para el diagnóstico coproparasitológico. Se pesaron 5 gr de heces, se diluyó con agua, se decantó el sobrenadante 4 veces hasta que el sobrenadante fuera claro, se filtró con una malla el sedimento, posteriormente se le agregó 2 gotas de azul de metileno, se observó en el microscopio estereoscópico, y se realizó el conteo de huevos de *F. hepatica* de todo el sedimento (FMVZ, 1980).

5.4 Antígeno de SEFh. Se recolectaron fasciolas adultas obtenidas de hígados de bovinos sacrificados en el rastro Municipal de Toluca, Estado de México. Las fasciolas adultas vivas, se colocaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril pH 7.4, a temperatura ambiente para su traslado al laboratorio. En condiciones de esterilidad se lavaron 5 veces con PBS adicionado con antibiótico (penicilina 10,000 U/estreptomicina 10,000 μ cg) y antimicótico (anfoteracina B 25 μ g/ml) en solución de NaCl al 0.85% (1X), el último lavado se hizo con solución salina de Hanks (1X) adicionado con antibiótico-antimicótico in vitro S.A., posteriormente se colocaron en medio RPMI 1640 adicionado con antibiótico-antimicótico, se dejaron a una temperatura de 37° C, con agitación constante 45 revoluciones por minuto (rpm) durante 12 horas. Posteriormente se

colectó el sobrenadante y se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos a 14 °C, una vez centrifugado, se hizo pasar por filtros de 0.20 µm, se le agregó inhibidor de proteasas 52 µl (Protease Inhibitor Mix, Amersham Biosciences) y 79.1 mg ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), finalmente se fraccionó el volumen en alícuotas, para guardar a -80 °C. (Espino., *et al.*, 1988). Se cuantificó la proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.4.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford. Para realizar la cuantificación de la proteína del antígeno de SEFh que se obtuvo, se hizo de la siguiente manera:

Se utilizó una microplaca de 96 pozos (NUNC), se colocó de 0 a 10 µl de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1mg/1ml, después se colocó de 10 a 0 µl de agua destilada a cada pozo, posteriormente se colocó 190 µl de reactivo de Bradford, finalmente se coloca 10 µl de la dilución del antígeno que fueron 1:5, 1:10 y 1:20 y 190 µl de reactivo de Bradford, con un filtro de 595 nm, los resultados obtenidos se promediaron y graficaron para poder determinar la cantidad de proteína en la muestra, siendo (10mg/ml) (Bradford, 1976) y posteriormente se realizó la técnica de electroforesis para la evaluación de integridad de las proteínas.

5.4.2 Electroforesis mini gel SDS PAGE 11%. Espaciador: Para preparar los geles se requirió las siguientes soluciones: agua destilada 3.7 ml, acrilamida 3.7 ml, Tris HCl (pH 8.8) 2.5 ml, SDS 10% 100 µl, temed 12 µl, APS 10% 50 µl, al final se agregó el temed y el APS al 10%.

Introducción: Se requieren las siguientes soluciones: agua destilada 2.125 ml, acrilamida 0.625 ml, tris HCl (pH 6.8) 0.937 ml, SDS 10% 38 µl, temed 5 µl y APS 10% 30 µl. La muestra se preparó de la siguiente manera: 60 µl de amortiguador de muestra y 30 µl de muestra con una concentración de 10 mg/ml para tener un total de 90 µl, para colocar 30 µl aproximadamente por pozo.

El marcador que se utilizó es el kaleidoscope que marca un rango de ~7 - 216 kDa, colocando 2 µl de éste y 20 µl de amortiguador para tener un volumen final de 30 µl.

Se colocó en la cámara de electroforesis y se corrió por 1 hora a 150 V. Se les puso solución fijadora, posteriormente se puso la tinción de Coomassie aproximadamente por dos horas, después se puso el decolorante aproximadamente por 12 horas. Se tiñeron con la tinción de Coomassie y plata (Towbin, *et al.*, 1979). Para la tinción de plata se empleó kit Silver Stain Plus (BIORAD), posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada durante 10 minutos cada lavado (Gottlieb & Chavko., 1987).

5.5 Prueba de IFN- γ para *F. hepatica*. Se obtuvo sangre heparinizada de los 34 animales que fueron reactivos a la prueba cervical comparativa. La sangre se distribuyó en condiciones de esterilidad en placas de 48 pozos 750 µl de sangre por pozo, estimulados con 1.6 µl, 4.16 µl de antígeno de SEFh (1,200 µg/ml), 5 µl (6.67 µg/ml) de Pokeweed y un pozo sin antígeno como testigo. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% CO₂. Posteriormente se cosechó el sobrenadante y se conservó a -70°C hasta su evaluación. Los sobrenadantes obtenidos fueron ensayados por duplicado para determinar el nivel de IFN- γ , mediante una prueba comercial (Bovigam TM Bovine

Gamma Interferon Test, Veterinary Australia). Se agregaron 100 µl/pozo de los sobrenadantes diluidos 1:2 en las placas sensibilizadas con el anticuerpo anti-IFN-γ bovino y se incubó por una hora, posteriormente se lavaron 5 veces con PBS-Tween-20 al 1%, se agregó 100 µl de diluyente y conjugado, nuevamente se incubaron por una hora, se volvió a lavar cinco veces (solución de lavado), se agregó 100 µl/pozo de sustrato y cromógeno. La reacción se interrumpió a los 15 minutos adicionando solución de paro. Posteriormente se realizó la lectura a 450 nm (Díaz., *et al.*, 2003).

5.6 Prueba de ELISA para *F. hepatica*. Se obtuvieron sueros de cada uno de los animales. Para la realización de la técnica de ELISA, se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano 12X8 (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp), las microplacas se incubaron con 100 µl/pozo del antígeno de SEFh (2.5 µg/100µl). Este antígeno se diluyó en solución de pegado (buffer de carbonato pH 9.6). Las placas con el antígeno fueron incubadas toda la noche a 37°C, en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Posteriormente se lavaron con PBS-Tween-20 al 0.1%, cinco veces con 200 µl. Se bloquearon con PBS-gelatina al 3%. Se incubaron por una hora a 37 °C, en una atmósfera húmeda al 5% CO₂, se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.1 % cinco veces, después se secaron. Los sueros se trabajaron por duplicado a una dilución de 1:50 en solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.4), se incubaron por una hora. Posteriormente se lavaron cinco veces con solución de lavado (PBS-Tween-20 al 0.1%), se agregó 100 µl/pozo de proteína G 1:10000 (Protein G, recombinant–peroxidase, SIGMA), incubando una hora, nuevamente se lavaron con solución de lavado cinco veces, después se agregaron 100 µl por pozo de solución de revelado (10 ml solución amortiguadora

de citratos-fosfatos pH 4.5, 4 µg de orto-fenilendiamina y 4 µl de H₂O₂). La reacción se interrumpió a los 5 minutos adicionando 50 µl/pozo de solución de paro (H₂SO₄ 2M). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm (Díaz, et al., 2003). El punto de corte se estableció por la prueba de sensibilidad y especificidad de 62 animales negativos a *F. hepatica* y *M. bovis*.

5.7 Western blot para *F. hepatica*. Para el análisis de inmunotransferencia, se realizó corrimiento electroforético de antígeno SEFh en un sistema de geles de poliacrilamida discontinuo, utilizando un gel espaciador e introductor al 11% bajo no condiciones reductoras; después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (BA85R597 Schleicher and Schuell), de acuerdo a la metodología descrita por (Towbin, 1979). Se utilizó un buffer de transferencia y se aplicó un voltaje de 100 V durante 1 hora. Después de la transferencia, se bloquearon los sitios libres de la membrana incubándola con una solución de gelatina al 3% a 37 °C con 5 % CO₂ por 1 hora; posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos, con PBS-Tween-20 al 0.3 % pH 7.2. Se cortaron tiras de 5 mm de ancho de la membrana, para incubarlas con los sueros de los diferentes grupos de animales: los sueros se diluyeron 1:50 en PBS-Tween 20 al 0.3%. Se incubaron tiras individuales con cada uno de los diferentes sueros diluidos a temperatura ambiente por espacio de 1 hora, y después de este tiempo las tiras se lavaron 5 veces con PBS-Tween 20 al 0.3%, se adicionó una anti IgG conjugada con peroxidasa, diluida 1:5000 y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados con PBS-Tween-20 al 0.3 % y se reveló añadiendo el sustrato de la enzima 4-cloro 1 naftol-H₂O₂ (Figura 2).

5.8 Prueba intradérmica caudal. Se inoculó 0.1ml de PPD bovino de *M. bovis* cepa AN5 (BiVE Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) intradérmico en el pliegue caudal, con jeringa tuberculina con aguja 1 cc/ml 27Gx13mm esterilizada. La lectura se realizó a las 72 horas (\pm 6 horas), postinoculación en el sitio de aplicación. Se dió como animal reactor cuando presentara visible y/o a la palpación cualquier aumento, engrosamiento, rubor, calor, dolor ó necrosis en el sitio de aplicación ([NOM-031-ZOO-1995](#)).

5.9 Prueba intradérmica cervical comparativa. Los sitios de inoculación para esta prueba son: para la inoculación superior es el tercio medio del cuello a 10 cm debajo de la cresta cervical, el sitio inferior fue aproximadamente 13 cm debajo de la anterior, antes de inocular se rasuró, midió con un vernier el grosor de la piel de dichos sitios. La inoculación fue intradérmica. En la parte superior se inoculó 0.1 ml de PPD aviar de *M. avium* cepa D4 y en la inferior 0.1 ml de PPD bovino de *M. bovis* cepa AN5, la lectura de esta prueba se realizó a las 72 horas (\pm 6 horas), midiendo con el vernier el grosor de las reacciones, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda. Una vez realizada esta operación se procedió a graficar los valores obtenidos tanto del derivado proteico purificado aviar como del bovino y el punto de intersección dió el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial se interpretaron los resultados ([NOM-031-ZOO-1995](#)).

5.10 Prueba de IFN- γ para *M. bovis*. Se obtuvo sangre heparinizada de los 34 animales que fueron reactores a la prueba cervical comparativa. La sangre se distribuyó en condiciones de esterilidad en placas de 48 pozos de 750 μ l de sangre por pozo, estimulados con 50 μ l de PPD de *M. bovis*, 50 μ l de PPD de *M.*

avium (ambos de 300 µg/ml de proteína), 5 µl (6.67 µg/ml) de Pokeweed y un pozo sin antígeno como testigo. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% CO₂. Posteriormente se cosecho el sobrenadante y se conservó a -70°C hasta su evaluación. Los sobrenadantes obtenidos fueron ensayados por duplicado para determinar el nivel de IFN-γ, mediante un paquete comercial (Bovigam TM Bovine Gamma Interferon Test, Veterinary Australia). La prueba se realizó e interpretó conforme a las instrucciones del fabricante. Consistió en lo siguiente: se agregaron 100 µl/pozo de los sobrenadantes diluidos 1:2 en las placas sensibilizadas con el anticuerpo anti IFN-γ bovino y se incubó a 37 °C por una hora, posteriormente se lavaron 5 veces (buffer de lavado 1X) se agregó 100 µl del conjugado, se volvió a incubaron por una hora, nuevamente se lavaron cinco veces (buffer de lavado 1X), se agregó 100 µl/pozo de sustrato y cromógeno. La reacción se interrumpió a los 15 minutos adicionando solución de paro. Posteriormente se realizó la lectura a 450 nm. Los resultados del diagnóstico se calcularon según el paquete comercial (Díaz., *et al.*, 2003).

5.11 Obtención del extracto proteicos de filtrado de cultivo de *M. bovis* y *M. avium*. Los sobrenadantes de las cepas utilizadas para el experimento fueron *M. bovis* cepa AN5 y *M. avium* cepa D4. Para poder obtener los sobrenadantes, 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 [(NH₄)₂SO₄] 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 rpm², para empaquetar el precipitado, el cual fue resuspendido en 10 ml de PBS pH 7.2, posteriormente se dializó

totalmente contra solución amortiguadora de fosfatos, en bolsas de diálisis, con punto de corte de 12 a 14 kDa, a 4 °C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Para comprobar la ausencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se agregó cloruro de bario, el producto final se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), posteriormente fue dividido en alícuotas de 1 ml con una concentración de 400 µg/ml para *M. bovis* y 300 µg/ml de *M. avium* de proteína, que fueron almacenadas a – 70°C hasta su uso (Díaz., et al 2003).

5.12 Prueba de ELISA para *M. bovis*. Se sensibilizaron las microplacas de 96 pozos de fondo plano 12X8 (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp) con *M. bovis* y *M. avium*, el antígeno se diluyó en solución de pegado (buffer de carbonatos con pH de 9.6), se agregó 100 µl/pozo, se dejó incubar a 37 °C, en una atmósfera húmeda al 5 % CO_2 toda la noche.

Se lavaron cinco veces con PBS+Tween-20 al 0.1%. Para bloquear las placas se puso 100 µl/pozo de solución bloqueadora (leche descremada al 1.5% en PBS-Tween-20 al 0.1%), se incubaron por una hora. Se lavó con solución de lavado cinco veces (buffer fosfatos pH 7.4) con PBS+Tween-20 al 0.1%.

Los sueros de cada uno de los animales, se trabajaron por duplicado a una dilución de 1:50 en solución bloqueadora por una hora a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% CO_2 . Posteriormente se lavaron cinco veces con solución de lavado, se agregó 100 µl de proteína G 1:10,000 (Protein G, recombinant–peroxidase, SIGMA) en solución bloqueadora, incubando una hora, nuevamente se lavaron con solución de lavado cinco veces, después se agregaron 100 µl por pozo (10ml solución amortiguadora de citratos-fosfatos pH 4.5, 4 µg de orto-

fenilendiamina y 4 μ l de H_2O_2). La reacción se interrumpió a los 5 minutos adicionando 50 μ l/pozo de solución de paro (H_2SO_4 2M). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm.

La respuesta de anticuerpos de *M. bovis*, se analizó estableciendo como valor de corte la densidad óptica (DO)₄₉₂ promedio más dos desviaciones estándar (DS) ($P < 0.0005$) de un grupo de 300 animales sanos, provenientes de una zona de baja incidencia de tuberculosis bovina.

Como testigo positivo se utilizó suero de un bovino infectado naturalmente con resultados positivos a la prueba intradérmica e IFN- γ .

5.13 Western blot para CFPE. Para el análisis de inmunotransferencia, se realizaron del CFPE en un sistema de geles de poliacrilamida discontinuo, utilizando un gel separador al 11% y un gel concentrador al 3 % bajo condiciones reductoras; después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, de acuerdo a la metodología descrita por (Towbin., *et al*, 1979). Se utilizó un buffer de transferencia y se aplicó un voltaje constante de 150 V durante 1.5 hrs. Después de la transferencia se bloquearon los sitios libres de la membrana incubándola con una solución gelatina al 3% a 37° C por espacio de una hora; posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos, con PBS+Tween-20 al 0.05 % pH 7.2. Se cortaron tiras de 5 mm de ancho de la membrana, para incubarlas con los sueros de animales positivos, sospechosos y negativos a la prueba IDCC; los sueros se diluyeron 1:50 en PBS+Tween-20 al 0.05 %. Se incubaron tiras individuales con cada uno de los diferentes sueros diluidos a temperatura ambiente por espacio de 1 hora, y después de este tiempo las tiras se lavaron 5 veces con PBS+Tween-20 al 0.05%, se adicionó una anti

IgG-bovino conjugada con peroxidasa, diluida 1:1,000 y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS+Tween-20 al 0.1% y se reveló añadiendo el sustrato de la enzima, 4-cloro 1 naftol-H₂O₂.

6. Análisis Estadístico.

Se llevó a cabo una prueba de ji cuadrada, para determinar la relación entre los resultados de IFN- γ para *M. bovis* y sedimentación para *F. hepatica*. Se llevó a cabo la prueba de Pearson para la correlación de sedimentación (huevos/gr heces) y ELISA para *F. hepatica* (Daniel, 2002).

7. Resultados.

De los 124 animales evaluados 34 (27.4%) resultaron reactores a la prueba intradérmica caudal, de ellos 19 se diagnosticaron como positivos a la prueba intradérmica cervical comparativa, es decir la prevalencia fue de 15.32% de tuberculosis en el hato, 12 animales (9.6%) quedaron como sospechosos, y resto resultaron negativos (Cuadro 1).

7.1 Tuberculosis

7.1.1 Prueba intradérmica caudal y cervical comparativa. De todos los animales evaluados, 34 bovinos fueron reactores a la prueba IDC, al ser examinados con la prueba IDCC, se encontró que 19/34 (55.88%) fueron positivos (P), 12/34 (35.29%) sospechosos (S) y 3/34 (8.82%) negativos (N) (Cuadro 2).

7.1.2 Prueba de IFN- γ . Una vez hecha la prueba IDCC se determinó la producción de IFN- γ a los 34 animales reactivos, de ellos 26 resultaron positivos (20.96 %) del hato, quedando de la siguiente manera: de los 19 animales positivos (P) para la IDCC 17 fueron IFN- γ positivos (89.47%), de 12 animales sospechosos (S) 7 se confirmaron (58.33%), y de 3 negativos (N) 2 fueron positivo a IFN- γ (66.66%) (Cuadro 2).

7.1.3 Prueba de ELISA. A 113 animales se les realizó la prueba de ELISA, para la integración de los tres grupos, se consideraron las DO bajas, intermedias y altas. El punto de corte de *M. bovis*, se analizó estableciendo como valor de corte la densidad óptica (DO)₄₉₂ promedio más dos desviaciones estándar (DS) ($P < 0.0005$) de un grupo de 300 animales sanos, provenientes de una zona de baja incidencia de tuberculosis bovina.

De los 88 animales diagnosticados como negativos a la prueba IDC, al ser evaluados por la prueba de ELISA indirecta 86 animales fueron positivos a *F. hepatica*, mientras que 82 resultaron positivos a *M. bovis*. Sin embargo en 53 animales se observó la presencia del huevo de *F. hepatica* (Cuadro 4).

De los 34 evaluados por IDCC, 31 (91.17%) resultaron positivos a la prueba de ELISA a ambos agentes, para cada grupo se encontraron los siguientes resultados 17/18 P (94.44%), 11/11 S (100%) y 3/3 N (100%) respectivamente (Cuadro 5).

7.2 Fasciolosis.

7.2.1 Detección de huevos de *F. hepatica* por sedimentación. Se llevó a cabo la prueba en 122 bovinos, de ellos 79 fueron positivos (64.65%) a

sedimentación. De los 34 animales positivos a la IDC, en 20 (58.82%) se observó la presencia de huevo de *F. hepatica*. Estos se distribuyeron de la siguiente forma, basados en los resultados de la prueba IDCC: 9/19 P (47.36%), 10/11 S (90.90%) y 1/3 N (33.33%) respectivamente (Cuadro 3).

7.2.2 Prueba de IFN- γ . Los 34 animales evaluados por IDCC se les realizó la prueba de IFN- γ en presencia del antígeno de SEFh. Se obtuvieron 10 positivos totales a IFN- γ , correspondiendo 5 al grupo de positivos y 5 al de sospechosos (Cuadro 3).

7.2.3 Prueba de ELISA. Para establecer el punto de corte de *F. hepatica*, se muestrearon 60 bovinos de un hato localizado en el CEPIPSA de la FMVZ-UNAM en Topilejo, México D.F., bajo los antecedentes que son negativos a *M. bovis* por la prueba intradérmica y a *F. hepatica* por la prueba coproparasitoscópica. El valor del punto de corte fue de 0.45 DO₄₉₂.

La evaluación de los 33 animales reactivos, mediante la prueba de ELISA indirecta mostró que 100% fue positivo a dicha prueba (Cuadro 3).

En el grupo de los positivos a la IDCC, el 89.47% presentaban anticuerpos IgG hacia *F. hepatica* y también hacia *M. bovis*, mientras que para los grupos de sospechosos y negativos el 100% presentaron anticuerpos hacia ambos agentes etiológicos (Cuadro 5).

Para analizar la correlación entre número de huevos y niveles de anticuerpos se formaron tres grupos con valores de baja (0.013-0.0505), mediana (0.645-0.799) y alta (0.803-1.150) densidad óptica. Se aplicó la prueba de

Pearson y se obtuvo el valor de $r=0.50$, lo que indica una correlación baja entre la cantidad de huevos y niveles de anticuerpos.

7.3 Análisis de Western blot de antígenos de SEFh y CFPE de *M. bovis*. Las proteínas del CFPE y las proteínas de SEFh fueron separadas mediante SDS-PAGE utilizando geles al 11%, bajo condiciones reductoras. El CFPE de la sexta semana presenta una gran diversidad de proteínas comprendidas entre el rango de 100 y 12 kDa. Se observaron 12 proteínas principalmente con pesos moleculares de 70, 50, 46,45, 38, 34, 24, 23, 20, 18, 14 y 12 kDa como se muestra en la (Figura 2).

Para el análisis de Western blot se realizó una selección de sueros, basados en los valores obtenidos en las pruebas de ELISA. Se seleccionaron tres grupos: grupo 1 con DO de 0.107 – 0.449, grupo 2 las DO fueron 0.450 – 0.689 y grupo 3 con DO 0.706 – 1.894. El análisis de los sueros de los animales tuberculosos positivos a la prueba de tuberculina mostraron reconocimiento a proteínas de 216, 132, 110, 85, 78, 72, 70, 50, 45, 32, 19 y 6 kDa, mientras que para los sueros de animales negativos se observaron proteínas de 200, 132, 85, 78, 50, 47 y 22 kDa. Las proteínas del CFPE de *M. bovis* reconocidas con mayor frecuencia fueron la de 216, 132 y 78 kDa correspondientes 33, 40 y 60% respectivamente (Cuadro 6).

El antígeno de SEFh mostró también un patrón complejo, observándose componentes de 216, 200, 80, 78, 75, 72, 70, 65, 60, 55, 50, 26, 23, 22, 19, 10 y 6 kDa (Figura 3). Las proteínas de *F. hepatica* principalmente reconocidas por los sueros positivos y sospechosos de bovinos fueron las de 216, 200 y 19 kDa con un 78, 70 y 70% respectivamente (Cuadro 7).

En el reconocimiento del antígeno de secreción/excreción de *F. hepatica* por sueros de reactivos a la prueba IDC, se observaron con mayor frecuencia los pesos de 216, 132, 78, 72, 50, 32 y 6 kDa (Figura 3).

El reconocimiento del antígeno de CFPE de *M. bovis*, se observaron las proteínas de pesos moleculares de 216, 132 y 78 kDa (Figura 4).

En sueros de animales sospechosos la frecuencia en el reconocimiento de antígeno de secreción/excreción de *F. hepatica*, fueron de 213, 200 y 19 kDa, por otra parte los pesos de las proteínas reconocidas en mayor porcentaje fueron de 216, 26, 23, 22 y 19 kDa como se muestra en la (Figura 5).

Los sueros de animales diagnosticados como sospechosos se observaron 216, 200 y 19 kDa y para los negativos 216, 26, 23, 22 y 19 kDa (Figura 6).

La identificación de las proteínas de antígenos de CFPE de *M. bovis* en sueros de animales positivos: 216, 132 y 78, sospechosos: 50 y negativos: 132, 78, 72, 50, 32 y 26 kDa (Figura 7).

8. Discusión.

Por los resultados obtenidos se encontró que no existe dependencia entre la presencia de *F. hepatica* y *M. bovis* semejante a lo descritos por [Flynn et al., \(2007\)](#). El reconocimiento de las proteínas de los antígenos de CFPE y SEFh se observó reconocimiento muy tenue de una proteína de 216 kD del antígeno de SEFh, con PM semejante a una proteína del CFPE de *M. bovis* de sueros de animales positivos y negativos, mientras que las proteínas más frecuentemente reconocidas en el SEFh de animales positivos, sospechos y negativos a la prueba IDCC, fueron las de peso molecular de 19 y 200 kDa las cuales son consideradas relevantes en el diagnóstico de *F. hepatica* ([Sarimehmetoglu, 2002](#); [Colmenares., et al 2007](#)).

Los animales negativos a la prueba intradérmica, pero positivos a la prueba de ELISA a *M. bovis*, presentaron una pobre respuesta celular, lo cual nos indicaría que pueden ser animales anérgicos según [Plackett, \(1991\)](#). El grupo de Rhodes compararon la respuesta de IFN- γ e IL-4 hacia *M bovis* con la respuesta a helminto específico, siendo los helmintos potentes inductores de IL-4, por lo que se explicaría la poca respuesta de IFN- γ hacia *F. hepática*, a diferencia de lo que se observa en la tuberculosis bovina [Rhodes., et al \(2000\)](#).

En la prueba de Western blot la proteína con peso molecular de 26 kDa fue reconocida por 61% de los animales estudiados, Bossaer y colaboradores observaron que la fracción de 26 -30 kDa fue reconocida por animales infectados a la 6 - 8 semana, mencionando que estaban en una etapa temprana de la infección [Bossaert et al., \(2000\)](#). El presente trabajo el mayor porcentaje de reconocimiento de proteínas del CFPE fue hacia componentes de 19, 200 y 216 kDa, sin embargo el equipo de Sarimehmentoglu menciona que el rango del peso

molecular de las proteínas reconocidas fueron 17, 29 y 36 kDa ([Sarimehmentoglu \(2002\)](#)). También Fredes y colaboradores comentan que proteínas de bajo peso molecular (29 kDa) muestran 94.5 y 93.5% de sensibilidad y especificidad respectivamente [Fredes., et al., \(1997\)](#).

Aunque los polipéptidos con pesos de 25-30 kDa constituyen excelentes candidatos para el diagnóstico de fasciolosis aguda, el equipo de Rivera concluyeron que moléculas de 150 - 160 kDa son reconocidos en la fasciolosis temprana [Rivera et al., \(1988\)](#). En nuestro estudio las proteínas de 6, 10, 19, 22, 23, 26, 200, y 216 fueron las que se reconocieron con mayor frecuencia difiriendo un poco de lo encontrado por Colmenares y colaboradores quienes indican que proteínas de pesos de 9, 14, 27, 65 y 75 kDa, fueron reconocidas con un alta sensibilidad y especificidad de 90 al 100% [Colmenares et al \(2007\)](#).

Para *M. bovis* las proteínas reconocidas con mayor frecuencia fueron las de 6, 72, 78, 132 y 216, kDa, lo que concuerda en su mayoría con lo encontrado por [Cataldi et al., \(1994\)](#).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que existe una correlación baja ($r=0.50$) con $P<0.01$ entre la cantidad de huevos con respecto a las densidades ópticas de los sueros de los animales positivos a la prueba de ELISA indirecta a *F. hepatica*, estas observaciones concuerdan con lo señalado por [Cruz et al., \(1999\)](#).

La presencia de huevo en las heces es considerado el diagnóstico definitivo, sin embargo la desventaja de este diagnóstico es que solo después de 3 meses se hace evidente el huevo, además de tener que realizar una serie de exámenes en las heces por la dinámica de excreción de los huevos. El

inmunodiagnóstico es también exitoso con la ayuda de estudios epidemiológicos de la presencia del parásito en animales y humanos.

Se encontraron proteínas desde 6 a 216 kDa en los sueros como lo encontrado por (Arafa., *et al.*, 1999) con bandas de pesos molecular de 14 - 200 kDa, pero no con las bandas que se presentaron con mayor frecuencia, siendo tres bandas muy evidentes de 27.5, 32.5 y 55 kDa.

Es probable que los animales que fueron dados como negativos a la prueba intradérmica cervical comparativa pero positivos a la ELISA hayan tenido disminución de la respuesta de hipersensibilidad retardada, como lo mencionan el grupo de O'Neill y colaboradores que los antígenos de SEFh suprimen la reacción de hipersensibilidad retardada O'Neill., *et al.*, (2000).

9. Conclusiones.

- La presencia de *F. hepatica* no incrementa los reactores en la prueba diagnóstica de la tuberculina.
- La prueba de ELISA indirecta para ambas enfermedades, no es indicativo que se encuentre el agente etiológico en el huésped.

10. Literatura citada.

- Abbas A, Lichtman A. Propiedades generales de las respuestas inmunitarias, Células y tejidos del Sistema Inmunitario, Apéndice I (Glosario). 5ed. Madrid: Elsevier; 2004. p. 4, 31-2, 478-82, 492.
- Adams, L.G. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Rev Sci Tech.2001;20(1):304-324.
- Aguirre, DH., Viñabal, AE., Gaibo, AB. Comparación de tres técnicas coprológicas para el diagnóstico de *Fasciola hepatica* en rumiantes. Vet Arg. 1998; XV(146):421-427.
- Alemayehu, Regassa., Girmay, Medhin., Gobena, Ameni. Bovine tuberculosis is more prevalent in cattle owned by farmers with active tuberculosis in central Etiopía. Vet J.2008; 178(1):119-125.
- Álvarez, Julio., de Juan, Lucía., Bezos, Javier., Romero, Beatriz., Sáez, José Luis., Marqués, Sergio. *et al.* Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. Vet Microbiol. 2009; 135(3-4):389-393.
- Ameni, Gobena., Aseffa, Abraham, Engers, Howard., Young, Douglas., Hewinson, Glyn., Vorfermeier, Martin. Cattle husbandry in Ethiopia is a predominant factor affecting the pathology of bovine tuberculosis and gamma interferon responses to mycobacterial antigens. Clin Vaccine Immunol.2006; 13(9):1030-1036.
- Arafa, MS., Abaza, SM., EL-Shewy, KA., Mohareb, EW., EL-Moamly, AA. Decton of Fasciola-specific excretory/secretory (E/S) protein fraction band (49.5 kDa) and its utilization in diagnosis of erly fascioliasis using different diagnostic techniques. J Egypt Soc Parasitol. 1999; 29(3):911-926.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Novoa, C., Pickering, X. *et al.* Tuberculosis respiratoria en bóvidos. Formación Continuada en Veterinaria. 1996; 1(4):3-13.
- Archna, S., Abhik, Saha., Surajit, B., Subraya, M., Sujoy, K. Specific and Randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. Clin Vaccine Immunol.2006; 13(10):1143-1154.

- Ateri, Christopher J., Xicohténcatl-Cortés, Juan., Hess, Sonja., Caballero-Olín, Guillermo., Girón, Jorge A., Friedman, Richard I. *Mycobacterium tuberculosis* produces Pili during human infection. *Microbiology*. 2007; 104(12):5145-5150.
- Barrera, L., De Kantor, IN. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop Geogr Med*.1987; 39(3):222-227.
- Bautista Garfias, Carlos R., Lebrija Rodríguez, Adriana. Los productos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica* disminuyen la producción de células productoras de anticuerpos contra antígenos timodependientes en ratones. *Vet Mex*.2008; 39(4):429-433.
- Beck, ST., Leite, OM., Arruda, RS., Ferreira, AW. Combined use of western blot/ELISA to improve the serological diagnosis of human tuberculosis. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(1):35-43.
- Berrington, William R., Hawn, Thomas R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev*.2007; 219:167-186.
- Beste, DJV., Laing, E., Bonde, B., Avignone-Rossa, C., Bushell, ME., McFadden, JJ. Transcriptomic analysis identifies growth rate modulation as a component of the adaptation of mycobacteria to survival inside the macrophage. *J Bacteriol*.2007; 189(11):3969-3976.
- Biddle, Bryce M., Ryan, Ferry J., Pollock, Jonh M., Andersen, Peter., Lisle de, Geoffrey W. Use of ESAT-6 in the interferon- γ test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Mircobiol*.2001; 80(1):37-46.
- Bossaert, K., Farnir, F., Leclipteux, T., Protz, M., Lonneux, JF., Losson, B. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*.2000; 87:103-123.
- Bossaert, K., Jacquinet, E., Saunders, J., Farnir, F., Losson, B.. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol*. 2000, (88):17-34.
- Bottai, D., Brosch, R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. *Mol Microbiol*. 2009; 73(3):325-328.

- Bradford, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.1976; 72: 248-254.
- Brown, WC., Rice-Ficht, AC., Mark Estes, D. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998; 63(1-2):45-55.
- Brown, Wendy C., Davis, C William., Dobbelaere, Dirk AE., Rice-Ficht, Allison C. CD4⁺ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infec Immun*. 1994, 62 (3) 818-827.
- Buddle, BM., Livingstone, PG., de Lisle, GW. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N Z Vet J*.2009; 57(4):173-180.
- Buddle, BM., McCarthy, AR., Ryan, TJ., Pollock, JM., Vordermeier, HM., - Hewinson, RG., *et al*. Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec*.2003; 153(20):615-620.
- Buddle, BM., Ryan, TJ., Pollock, JM., Andersen, P., de Lisle, GW. Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Vet Microbiol*.2001; 80(1):37-46.
- Carrada-Bravo, Teodoro. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamiento. *Rev Gastroenterol Mex*.2003; 68(2):135-142.
- Cascante, JA., Pascal, I., Eguía, VM., Hueto, J. Diagnóstico de la infección tuberculosa. *An Sist Navar*.2007; 30(2):49-65.
- Cataldi, A., Romano, MI., Bigi, F. A western blot characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res Microbiol*.1994; 145(9):689-698.
- Cervi, Laura., Rubinstein, Héctor., Masih, DT. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing supresión of the cellular immune responses. *Vet. Parasitol*. 1996, (61):97-111.
- Charlier, Johannes., Meulemeester, Luc De., Claerebout, Edwin., Williams, Diana., Vecrussse, Jozef. Qualitative and quantitative evaluation of corpological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol*. 2008; 153(1-2):44-51.

- Chauvin A., Bouvet G., Boulard C. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. Int J Parasitol.1995. 25(10):1227-1241.
- Chauvin, Aain., Moreau, E., Boulard, C. Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. Vet. Res. 2001, (32):87-92.
- Chen, Edward S., Moller, David R. Expression profiling in granulomatous lung disease. Proc Am Thorac Soc. 2007; 4(1):101-107.
- Cheong, KH., Ho, PY., Ahn, Jongsam., Waters, WR., Palmer, MV., Hamilton, MJ. *et al.* Use of rMPB70 protein and ESAT-6 peptide as antigens for comparison of the enzyme linked immunosorbent, immunochromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 4498-4506.
- Clery, DG., Mulcahy, G. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica*. Res Vet Sci.1998; 65(2):169-171.
- Clery, D., Torgerson, P., Mulcahy, G. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol. 1996; 62(1-2):71-82.
- Colmenares, Cecilia., Méndez, Liber., Díaz-Bello, Zoraida., Alarcón de Naya, Belkisolé. Antígeno excreción-secreción de *Fasciola hepatica*: ultrafiltración y aplicación en inmunodiagnóstico. Acta Bioquím. Clín Latinoam.2007; 41(2):259-266.
- Colona, Erasmo., Alzadora, L., Castro, J. Evaluación de antígenos de *Fasciola hepatica* por tres métodos inmunológicos. Rev. Per. Biol. 2001, 8, (2):
- Corner, LA. The duration of the response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria. Aust Vet J.1981; 57(5):216-219.
- Crevel, Reinout van., Ottenhoff, Tom HM., van der Meer, Jos WM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2):294-309.
- Cruz Castellanos, Humberto., Quiroz Romero, Héctor., Guerrero Molina, Cristina., Ibarra Velarde, Froylán., Ochoa Galván, Pedro. Cinética de excreción de huevos y títulos de anticuerpos a *Fasciola hepatica*, en ganado bovino tratado con triclabendazol en clima cálido húmedo en México. Vet Mex. 1999.30(4): 273-279.

- Daniel, Wayne W. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud, Limusa, México, 2002., 342-397.
- Dambuza I, Allie N, Fick L, Johnston N, Fremond C, Mitchell J, *et al.* Efficacy of membrane TNF mediated host resistance is dependent on mycobacterial virulence. *Tuberculosis*.2008; 88(3):221-234.
- Denis M, Buddle BM. Bovine dendritic cells are more permissive for *Mycobacterium bovis* replication than macrophages, but release more IL-12 and induce better immune T-cell proliferation. *Immunol Cell Biol.* 2008; 86(2):185-91.
- Deretic V, Fratti RA. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Molecular Microbiology*.1999; 31(6):1603-1609.
- Díaz O, Fernando., García C, Leticia., Estrada-Chávez, Ciro., Vega López, Marco A., Banda Ruíz, Victor., Arriaga Díaz, Camila. Respuesta inmune humoral de cobayos hacia componentes proteicos de micobacterias. *Téc Pec Méx.*2002; 40(2):157-164.
- Díaz Otero, Fernando., Banda Ruíz, Victor., Jaramillo Meza, Laura., Arriaga Díaz, Camila., González Salazar, Dante., Estrada-Chávez, Ciro. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Mex.*2003; 34(1):13-26.
- Díaz, Ailén., Li-Elías, Olga., Otero, Oscar., García, Gabriel., Espino, Ana M. Identificación mediante Western blot, inmunógenos de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ratas infectadas experimentalmente. *Rev Cubana Med Trop.*1998; 50(1):12-17.
- Dimov, I., Gonzalez, E. Sources of cattle infection with atypical mycobacteria and the frequency of their isolation from healthy slaughter animals in Cienfuegos Province, Cuba. *Vet Med Nauki.*1986; 23(5):47-52.
- Dimov, I., Gonzalez, EF., Feriol, Fr. Role of typical mycobacterium in the occurrence of nonspecific tuberculin reactions in cattle. *Vet Med Nauki.* 1985; 22(5):53-59.
- Donnelly, Sheila., O'Neill, Sandra M., Sekiya, Mary., Mulcahy, Grace., Dalton John P. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun.*2005; 73(1):166-173.

- Donova, MV., Nikolayeva, VM., Dovbnya, DV., Gulevskaya, SA., Sizina, NE. Methyl- β -cyclodextrin alters growth, activity and cell envelope features of sterol-transforming mycobacteria. *Microbiology*.2007; 153(6):1981-1992.
- Duménigo Ripoll, B E., Finlay Villalvilla, Carlos M. Detección y cuantificación de coproantígeno de *Fasciola hepatica* en ganado ovino. *Rev Cubana Med Trop*. 1998; 50 (1):82-84.
- Efendieva, IV., Nuratinov, RA., Umarova, PG. Specific features of mycobacterial isolated from patients and animals with tuberculosis and from environmental objects. *Probl Tuberk*. 2001; 5:45-47.
- Elias D., Wolday, D., Akuffo, H., Petros, B., Bronner, U., Britton, S. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterium antigens in helminth-exposed individuals before and after bacilli Calmette-Guérin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol*.2001; 123:219-225.
- Ernst, Joel D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immunity*. 1998; 66(4):1277-1281.
- Espino Ana E., Torres, Daricel, Morales, Adelaida, Delgado Nonnibel., Quetel, Julia., Osuna Antonio. Identification of CD4+ T-helper epitopes the 11.5 kDa Saposin-protein SAP-2 using synthetic peptides. *Exp Parasitol*.2007; 117(1):65-73.
- Espino, AM., Seuret, N., Escobar, L., Duménigo, BE. Identification and isolation of common antigens of *Fasciola hepatica*. *Rev Cubana Med Trop*.1993; 45(1):20-26.
- Espino, Ana M., Duménigo Blanca E., Huesca Nury., Finlay, CM. Mantenimiento *in Vitro* de adultos de *Fasciola hepatica*: Obtención de antígenos de excreción-secreción. *Rev Salud Anim*.1988; 10:287-293.
- Estrada-Chávez, Ciro., Díaz Otero, Fernando., Arriaga Díaz, Camila., Villegas-Sepúlveda, Nicolás., Pérez-González, Rafael., González Salazar, Dante. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet. Mex*. 2004; 35(3):225-236.
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Departamento de Parasitología, 1980.

- Fetene, T., Kebede, N., Alem, G. Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of Western Gojam, Etiopía. *Zoonosis Public Health*.2009.
- Fifis, T., Plackett, P., Corner, LA., Wood, PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 1989; 29:91-101.
- Fitis, T., Rothel, JS., Wood, PR. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 1994; 40:65-81.
- Flynn R. J., Mulcahy, Grace. The roles of IL-10 and TGF- β in controlling IL-4 and IFN- γ production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int J Parasitol.* 2008, 38(14):1673-1680.
- Flynn, F. J., Irwin, JA., Oliver, M., Sekiya, M., Dalton, JP., Mulcahy, G. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet. Immunol Immunopathol.* 2007, 120(1-2):31-40.
- Flynn, JL., Chan, J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun.* 2001; 69(7):4195-4201.
- Flynn, R. J., Mulcahy, G., Welsh, M., Cassidy, JP., Corbett, D., Milligan, C., *et al.* Co-Infection of Cattle with *Fasciola hepatica* and *Mycobacterium bovis*-Immunological consequences. *Transbound Emerg Dis.* 2009, 56, (6-7):256-274.
- Flynn, RJ., Mulcahy, G. The roles of IL-10 and RGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental *Fasciola hepatica* infection. *Int J Parasitol.*2008; 38(14):1673-1680.
- Flynn, Robin J., Mannion, Celine., Golden, Olwen., Hecariz, Orcun., Mulcahy, Grace. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to test used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect Immunol.*2007; 75(3):1373-1381.
- Fredes, F., Gorman, T., Silva, M., Alcaino, H. Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western blot y ELISA en animales infectados. *Arch. Med. Vet.* 1997, 29 (2):283-294.
- Fredes, Fernando., Alarcón, Juan., Ilabaca, Paula., Alcaíno, Héctor. Evaluación diagnóstica de dos proteínas purificadas de *Fasciola hepatica* mediante ELISA en la fasciolosis ovina. *Parasitol Latinoam.*2003; 58:148-151.

- Gaborick CM, *et al.* Evaluation of a five antigens ELISA for diagnosis of tuberculosis in cattle and cervidae. JAVMA. 1996; 209(5): 962-966.
- Gannon, BW., Hayes, CM., Roe, JM. Survival rate airborne *Mycobacterium bovis*. Res Vet Sci.2007; 82(2):169-172.
- Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P. Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. Zentralbl Veterinarmed B. 1991; 38(3):203-8.
- González R., Pérez Ruano M., Brito S., Fasciolosis bovina, evaluación de las principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. Rev. Salud Anim. 2007; 29(3):167-175.
- Gottlieb, M., Chavko, M., Analytical Biochemistry. 1987; 165:33-37.
- Gutiérrez-Pabello, José A., Adams, Garry L. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. Vet Mex.2003; 34(3):277-281.
- Hasan, Cahra., Jamil, Bushra., Ashraf, Mussarat., Islam, Muniba., Dojki, Maqboola, Irfan, Muhammad., Hussain Rabia. Defferential live *Mycobacterium tuberculosis*-, *M. bovis* BCG-, recombinant ESAT-6, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. Clin and Vaccine Immunol.2009; 16(7):991-998.
- Hoyle, DV., Taylor, DW. The immune response of regional lumph nodes during the early stages of *Fasciola hepatica* infection in cattle. Parasite Immunol.2003; 25(4):221-229.
- <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm>
- Ibarra Velarde, Froylán., Montenegro Cristino, Natividad., Vera Montenegro, Yolanda., Boulard, Chantal., Quiroz Romero, Héctor., Bautista Garfias, Carlos Ramón., Vázquez Peláes, Carlos. DIG-ELISA: Estandarización y evaluación serodiagnóstica en fasciolosis bovina experimental y natural. Vet Mex.1997; 28(1):7-12.
- Ïeters, Jean. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. Microbes Infect.2001; 3(3):249-255.
- Ingale, S.L., Singh, P., Raina, OK., Mehra, UR., Verma, AK., Gupta, SC, *et al.* Interferon-gamma and interleikin-4 expression during *Fasciola gigantica*

primary infection in crossbred bovine calves as determined by real-time PCR.

Vet. Parasitol. 2008, 152 (1-2):158-161.

Jedlina-Panasiuk, L. The immune response of various species to *Fasciola hepatica* infection. *Wiad Parazytol.* 2002; 48(1):11-21.

Jefferies, James R., Brophy, Peter M., Barret, John. Investigation of *Fasciola hepatica* simple preparation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000, 21(17):3724-3729.

Jefferies, James R., Campbell, Alison M., Rossum, Arjan J., Barret, J., Brophy, PM. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics.* 2001, (1), 1128-1132.

Jefferies, JR., Brophy, PM., Barrett, J. Investigation of *Fasciola hepatica* sample preparation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 2000; 21(17):3724-3729.

Jha, VC., Morita, Y., Dhakal, M., Besnet, B., Sato, T., Nagai, A. *et al.* Isolation of *Mycobacterium spp.* From milking buffaloes and cattle in Nepal. *J Vet Med Sci.* 2007; 69(8):819-825.

Jiménez, Ángel., Díaz O., Fernando., Jaramillo, Laura., González, Xóchitl., Pérez, Rafael. Evaluation of IgG1 and IgG2 antibodies specific to *Mycobacterium bovis* in anergic tuberculosis bovines. *M. bovis V Conference* 2009.

Kassich, Lula., Kochmarski, VA., Zavgorodnii, Al., Borziak, AT., Korotchenko, NV, Manchenko, VM., *et al.* The interrelation of bovine and human tuberculosis. *Probl Tuberk.* 1990; (6):23-26.

Lella, Ravi K., Sharma, Charu. Eis (Enhanced Intracellular Survival) Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Disturbs the cross regulation of T-cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(26):18671-18675.

Lisl, K. M., Rice-Ficht, C., Zhu, D., Mckown, RD., Brown, WC. Bovine T cell responses to recombinant thioredoxin of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1999, (82):35-47.

Lyashchenko, KP., Greenwald, R., Esfandiari, J., Chambers, MA., Vicente, J., Gortazar, C, *et al.* Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Vet. Microbiol.* 2008; 132(3-4):283-292.

Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004.

- Marcet Sánchez, R., Figueredo Pino, M., Sarracent Pérez, Jorge. Mecanismo de acción del anticuerpo monoclonal ES-78 contra la fasciolosis. *Rev Cubana Med Trop.*2004; 56(3):203-207.
- McCole, DF., Doherty, ML., Baird, AW., Davies, WC., McGill, K., Torgerson, PR. T cell subset involvement in immune responses to *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Parasite Immunol.*1999; 21(1):1-8.
- McNair, J., Flynn, R., Welsh, M., Cassidy, J., Corbett, D., Milligan, C., *et al.* Immuno-regulatory effects of *Fasciola hepatica* on *Mycobacterium bovis* infection in cattle: implications for diagnosis. *M. bovis V Conference.*2009.
- Meikle, V., Alito, A., Lera, AS., Gioffré, A., Peralta, A., Buddle, BM., Cataldi, A. Identification of navel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vaccine Immunol.*2009;16(9):1352-1359.
- Mezo, Mercedes., González –Warleta, M., Ubeira, Florencia M. The use of MM3 monoclonal antibodies for the early immunodiagnosis of ovine fascioliasis. *J. Parasitol.* 2007; 93(1):65-72.
- Mezo-Menéndez, Mercedes., Sánchez-Andrade, Rita., Martínez Santiago, José Luis., Díez-Baños, Natividad., Díez Baños, Pablo., Morrondo Pelayo, Patrocinio. Fasciolosis bovina: Valoración de parámetros parasitarios y de respuestas inmunitarias en infecciones experimentales y naturales. *Vet Mex.*1998.29 (1):75-81.
- Michel, AL. *Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection. *J. Vet Diagn Invest.* 2008; 20(4):5001-503.
- Milián, Feliciano., Sánchez, LM., Toledo, P., Ramírez, Carolina., Santillán, MA. Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. *Rev Latinoam de Microbiol.* 2000; 42:13-19.
- Milián, S.F., Gallegos, T.R.M. La vacunación con *M. bovis* BCG, posible alternativa para el control de la tuberculosis Bovina en México. 2º Congreso Internacional de Epidemiología. Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria A.C. 2001:63-69.
- Moreau, Emmanuelle., Hervé, Sebbag., Wei Yu, Zhang., Chauvin, A. Modulation of sheep lymphocyte responses by *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Vet Parasitol.*2002; 108:207-215.

- Morris, JA., Ivanyi, J. Immunoassays of field isolates of *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria by use monoclonal antibodies. J. Med Microbiol. 1985; 19(3):367-373.
- Morris, RS, Pfeiffer, DU., Jackson, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol.1994; 40(1-2):153-177.
- Neill, SD., Bryson, DG, Pollock, JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis.2001; 81(1/2):79-86.
- Neill, SD., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, DP., Pollock McA, J., Clements, A. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet Rec.1994; 135(6):134-135.
- Neill, SD., Hanna, J., Mackie, DP., Bryson, TGD. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. Vet Rec. 1992; 131(3):45-47.
- O'Neill, Sandra M., Brady, MT., Callanan, JL., Mulcahy, G., Joyce, P., Mills, KHG., et al. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. Parasite Immunol. 2000, 22(3):147-155.
- Ortega, J., Peris, B., Copra, JM., Martínez-Moreno, A., Sánchez-Andrada, R., Pérez, J. Fasciolosis experimental ovina: efecto de reinfecciones y tratamiento en la respuesta inmune humoral y celular local. Facultad de Veterinaria de Córdoba. España.2002:733-739.
- Ovdienko, NP., Kosenko, VI., Naimanov, Akh., Kadochkin, AM., Antonov, BI., Gertman, MI. Species category of *Mycobacterium* isolated from cattle and environmental objects. Probl Tuberk. 1990;(2):46-48.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. Tuberculosis., Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004: 489.
- Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Pedreira, J., Suárez, JL., Díez-Baños, P., Morrondo, P. Aplicación de la detección de antígenos circulantes en la evaluación de antihelmínticos en ovejas con fasciolosis natural. Med Vet.1999; 16(6):429-434.
- Pelayo, Liliana., Espino, Ana M., Duménigo R, Blanca E., Finlay V, Carlos M. Detección de anticuerpos, antígenos y complejos inmunes circulantes en las fascioliasis aguda y crónica. Resultados preliminares. Rev Cubana Med Trop. 1998; 50(3);209-214.

- Peters W., Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.*2003; 5(2):151-158.
- Phiri, IK., Phiri, AM., Harrison, LJS. Serum antibody isotype responses of Fasciola-infected sheep and cattle to excretory and secretory products of Fasciola species. *Vet Parasitol.*2006; 141(3-4):234-242.
- Piercy, J., Werling, D., Coffey, TJ. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non-bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis.* 2007; 87:415-420.
- Plackett, P., Ripper, J., Corner, LA., Small, K., Witte, K., Melville, L. *et al.* An ELISA for the detection of anergic tuberculosis cattle. *Aust Vet J.* 1989; 66 (1): 15-19.
- Pollock, JM., Andersen, P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun.* 1997; 65 (7):2587-2592.
- Pollock, JM., McNair, J., Basset, H., Cassidy, JP., Costello, E., Aggerbeck, H. *et al.* Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):1856-1860.
- Pollock, JM., Rodgers, JD., Welsh, MD, McNair, J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet Microbiol.*2006; 112(2-4):141-150.
- Price, J S., Hope, CJ. Enhanced secretion of interferon- γ by bovine $\gamma\delta$ T cells induced by co culture with *Mycobacterium bovis*-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology.* 2008; 126:201-208.
- Quiroz Romero, Héctor. *Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos.* Limusa, México, 1984: 232-234.
- Raja, A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; 120:213-232.
- Rhodes, SG., Palmer, N., Graham,, SP., Bianco, AE., Hewinson, RG., Vordermeier, HM. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin-4 in bovine tuberculosis. *Infect Immun.*2000; 68(9):5393-5400.
- Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E, de Kantor IN. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. 1990. 37(1):19-27.

- Rivera Marrero, Carlos A., Santiago, Noemí., Hillyer, George V. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. J Parasitol.1988; 74(4):646-652.
- Rivera, Carlos A., Santiago, Noemi., Hillyer, VG. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. J. Parasit. 1998, 74, (4):646-652.
- Rodgers, JD., Connery, NL., McNair, J., Welsh, MD., Skuce, RA., Bryson, DG, *et al.* Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: a novel model to study bovine tuberculosis. Tuberculosis. 2007; 87:405-414.
- Romero Tejeda, Aurora., Arriaga Díaz, Camila., Guevara Vivero, Jesús., García Salazar, José Alfredo., Torres León, Rubén Arturo, Estrada-Chávez, Ciro. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. Vet. Mex.2006; 37(1):137-143.
- Sakru, N., Korkmaz, M., Kuman, HA. Comparison of two different enzyme immunoassays in the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections. Mikrobiyol Bul. 2004; 38(1-2):129-135.
- Sánchez Olivas, M.A., Valencia Zavala, Martha P., Montes Montes, José., Sánchez Olivas, Jesús A., Flores Méndez, Iveth. Inmunología y terapéutica de la vacuna BCG. Rev Alerg Mex.2008; 55(4):153-63.
- Sarimehmetoglu, H. O., Application of Western Blotting for the immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle using excretory/secretory antigens. Turk J Vet Anim Sci. 2002, (26): 1061-1065.
- Serradell, MC., Guasconi L., Cervi L., Chiapello LS., Maíz DT. Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. Vet. Immunol Immunopathol. 2007, 117(3-4):197-208.
- Sharma, Archana., Saha, Abhik., Bhattacharjee, Surajit., Majumdar, Subrata., Das Gupta, Sujoy K. Specific and randomly derived immunoactive peptide mimotopes of mycobacterial antigens. Clin Vaccine Immunol.2006; 13(10):1143-1154.

- Shoda, LK., Rice-Ficht, AC., Zhu, D., Mckown, RD., Brow, WC. Bovine T cell responses to recombinant thiredoxin of *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.*1999; 82(1):35-47.
- Silva E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.*2001; 78(2):111-7.
- Sinha, Aprajita., Singh, Anjana., Satchidanandam, Vijaya., Natarajan, Krishnamurthy. Impaired generation of reactive oxygen species during differentiation of dendritic cells (DCs) by *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen (MTSA) and subsequent activation of MTSA-DCs by mycobacteria results in increased intracellular survival. *J Immunol.*2006; 177(1):468-478.
- Sterwart, GR., Boussinesq, M., Coulson, T., Elson, T., Nutman, T., Bradley, JE. Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117(3):517-523.
- Thacker, Tyler C., Palmer, Mitchell V., Waters W. Ray. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.*2007; 119(3-4):204-213.
- Thom, M., Morgan, JH., Hope, JC., Villarreal-Ramos, B., Martin, M., Howard, CJ. The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 102(4):399-412.
- Thom, ML., Hope, JC., McAulay, M., Villerreal-Ramos, B., Coffey, TJ., Stephens, S. *et al.* The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Immunol Immunopathol.*2006; 114(1-2):25-36.
- Thorns, CJ., Morris, JA. Shared epitopes between mycobacteria and other microorganisms. *Res Vet Sci.* 1986; 41(2):275-276.
- Tliba, Omar., Moire, Nathalie., Le Vern, Yves., Boulard, Chantal., Chauvin, Alain., Sibille, Pierre. Early hepatic immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Res.*2002; 33(3):261-270.
- Towbin, Harry., Staehelin, Theophil., Gordon, Julian. Electrophoretic transfer of proteins from polycrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry.* 1979; 76(9):4350-4354.

- Tristao-Sa, R., Ribeiro RR., Jonson, LT., Pereira, Fel., Dítese, R. Intestinal nematodos and pulmonary tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002. 35(5):533-535.
- Tyler C. Thacker., Mitchell V. Palmer, W. Ray Waters. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet Immunol and Immunopathol.* 2007; 119:204-213.
- Une, Yumi., Mori, Tooru. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Mirobiol Infect Dis.*2007; 30(5-6):415-425.
- Van, Rhijin, I., Nguyen, TK., Michel, A., Cooper, D., Govaerts, M., Cheng, TY. *et al.* Low cross-reactivity of T-cell responses against lipids from *Mycobacterium bovis* and *M. avium* paratuberculosis during natural infection. *Eur J Immunol.*2009; 39(11):3031-3041.
- Waldvogel, As., Lepage, MF., Zakher, A., REichel, MP., Eicher, R., Heussler, VT. Expression of interleukin 4, interleukin 4 splice variants and interferon gamma mRNA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 97(1-2):53-63.
- Ward, JH. Tuberculosis bovina. Manual de ganadería doble propósito. Laboratorio de tuberculosis, Instituto de Biomedicina; 2005: 364-369.
- Waters, WR., Palmer, MV., Thacker, TC., Bannantine, JP., Vordermeier, HM., Hewinson, RG. *et al.* Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13(6):648-654.
- Waters, WR., Whelan, AO., Lyashchenko, KP., Greenwald, R., Palmer, MV., Harris, BN. *et al.* Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. *Clin Vaccine Immunol.*2010; 17(2):247-252.
- Welsh, Michael D., Cunningham, Rodat T., Corbett, David M., Girvin, Martyn R., McNair, James., Skuce, Robin A. *et al.* Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology.* 2005; 114(1):101-111.
- Wiker, Harald G., Harboe, Morte. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Rev.*1992; 56(4):648-661.

Wiker, HG. MPB70 and MPB83-major antigens of *Mycobacterium bovis*. Scand J Immunol. 2009; 69(6):492-499.

Wood PR., Jones, SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis.2001; 81(1-2):147.155.

www.cultek.com

www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm

Yadav, Mahsesh., Clark, Lindsay., Schorey, Jeffrey S. Macrophage's proinflammatory response to a mycobacterial infection is dependent on sphingosine kinase-mediated activation of phosphatidylinositol phospholipase C, protein kinase C, ERK1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase. J Immunol.2006; 176(9):5494-5503.

Zhang, WY., Moreau, e., Hope, Jc., Howard, CJ., Huand, WY., Chauvin, A. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. Exp Parasitol.2005; 111(3):154-159.

Anexos

	Pba IDC <i>M. bovis</i>	Pba IDCC <i>M. bovis</i>
	124	34
Reactores	34(27.41 %)	
Positivos		19(15.32 %)
Sospechosos		12(9.67 %)
Negativos	88(70.96 %)	3(2.41 %)

Cuadro 1. Resultados de la prueba intradérmica caudal: reactores, así como la prueba intradérmica cervical comparativa: positivos, sospechosos y negativos en bovinos de Acatlán, Hidalgo, México.

Grupo	Pba IDC	Pba IDCC	IFN- γ <i>M. bovis</i> +	ELISA <i>M. bovis</i> +
Reactores	34/124			
Positivos		19/34(55.88%)	17/19(89.47%)	17/18(94.44%)
Sospechosos		12/34(35.29%)	7/12(58.33%)	11/11(100%)
Negativos		3/34(8.82%)	2/ 3(66.66%)	3/3(100%)

Cuadro 2. Resultados de los bovinos reactores a la prueba IDC mediante las pruebas diagnósticas: intradérmica cervical comparativa (IDCC), IFN- γ y ELISA, en 34 bovinos de Acatlán, Hidalgo, México. Los bovinos se clasificaron en positivos, sospechosos o negativos basados en los resultados de la IDCC.

Grupo	Sedimentación h/g	IFN-γ <i>F. hepatica</i> +	ELISA <i>F. hepatica</i> +
Positivos	9/19(47.36%)	5/19(26.31%)	19/19(100%)
Sospechosos	10/11(90.90%)	5/11(45.45%)	11/11(100%)
Negativos	1/3(33.33%)	0/3	3/3(100%)

Cuadro 3. Resultados de las pruebas diagnósticas para la determinación de *Fasciola hepatica*: por la prueba coproparasitoscópica empleando la técnica de sedimentación, IFN-γ y ELISA, en bovinos reactivos a la prueba IDC de Acatlán, Hidalgo, México. Los bovinos se clasificaron en positivos, sospechosos o negativos basados en los resultados de la IDCC.

Prueba ID Negativos	Sedimentación		ELISA <i>F. hepatica</i>		ELISA <i>M. bovis</i>	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
46	+		+		+	
32		✓	+		+	
6	+		4 (2*)		(2*)	
3		✓	+			✓
1	+		+			✓

Cuadro 4. Resultados de las pruebas coproparasitoscópica mediante la técnica de sedimentación, ELISA *F. hepática* y ELISA *M. bovis* en 88 bovinos negativos a la prueba IDC.

Grupo	ELISA + <i>M. bovis</i> y <i>F. hepatica</i> .
Positivos	17/19 (89.47%)
Sospechosos	11/11 (100%)
Negativos	3/3 (100%)

Cuadro 5. Porcentaje de positivos a *M. bovis* y *F. hepática* por la prueba de ELISA. Basados en los resultados de la IDCC los bovinos se clasificaron en positivos, sospechosos o negativos.

DO	TB	6	10	19	22	23	26	32	35	38	45	47	50	55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
0.107	P	++																+++								++
0.107	P							++										+++		++	+			+	+	+
0.290	P						+	+				+						++	++	++			+	+		+
0.302	N											+			+					+						
0.310	N				+++							++	++									+		++	++	
0.311	N																									
0.382	P																			++				+		
0.422	N							+										+++		++						
0.429	N																			+++				+		
0.436	P	+															++			++		+	+		+	++
0.446	S												+													
0.450	S			+								+++	+++							+++	+	+				
0.486	P	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++															
0.487	N																							+		
0.492	P	++											++							+++						
0.516	P																	+++		+		+		+		
0.540	P	++																+++				++		+		++
0.580	S	+																		+++						
0.646	P																			+			+			+
0.663	S																			+						+
0.680	P									++										+						+
0.686	P			++							+									++						
0.706	P																			++						
0.754	N	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++											++		+			+
0.931	N																	+++						+++		
0.979	N											++	++											++		+
1.055	N	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++															
1.055	N						+	+				+	+		+			++	++	++	++					+
1.062	N						+						+		+					+	++					
1.894	P	+																			+			+		

n=30 sueros

Cuadro 6. Reconocimiento mediante Western blot de proteínas del CFPE de *M. bovis* por sueros con baja, mediana y alta Densidad Óptica (DO) en la prueba de ELISA, diagnosticados como P=positivos, S=sospechosos y N=negativos a la prueba de tuberculina. +Débil reconocimiento, ++ Moderado reconocimiento y +++ Fuerte reconocimiento.

DO	TB	6	10	19	22	23	26	32	35	38	45	47	50	55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216		
0.318	N	+	+	+																						+	+	
0.318	N	+																										
0.395	N	+	+																									+
0.397	N																											
0.399	S																											
0.399	S																											
0.497	N		+	+	+	+	+																				+	+
0.645	S			+			+																				+	+
0.645	S	++	++	++	++	++	++						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				++	++	
0.705	N	+	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				++	++	
0.758	N	+	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				++	++	
0.776	N			+	+	+					+	+	+	+											++	+++	+++	
0.776	N	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
0.781	N			+	+	+	+	+																		++	+++	
0.799	N	+	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				++	++	
0.803	N	+	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			++	++	++	
0.820	N																										+	
0.827	N	+	+	+	+	+	+						+	+	++	++	++				+	+	+	+	+	++	++	
0.917	P		+	+	+	+	+																					+
0.943	N																			++						+++	+++	
0.947	N	+	+	+	+	+	+	+								+	+	++	++						++	+++	+++	+++
1.116	S			+	+	+	+																					+
1.150	N			+	+	+	+																				+	+

n=23

Cuadro 7. Reconocimiento mediante Western blot de proteínas del antígeno de secreción/excreción de *Fasciola hepática* por sueros con baja, mediana y alta Densidad Óptica (DO) en la prueba de ELISA, diagnosticados como P=positivos. S=Sospechosos y N=negativos
+Débil reconocimiento, ++ Moderado reconocimiento y +++ Fuerte reconocimiento

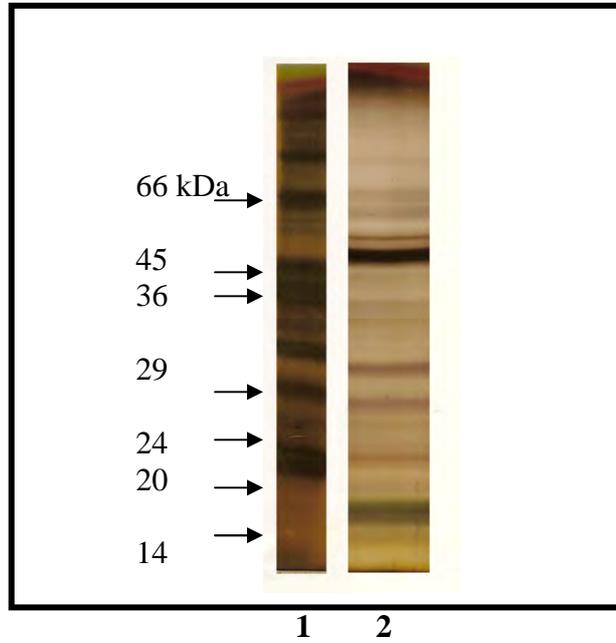


Figura 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida PAGE SDS al 11%, con tinción de Coomassie **Carril 1** marcador de peso molecular, **carril 2** CFPE de la 6ª semana de cultivo. Las proteínas que se evidenciaron fueron las de 70, 50, 46, 45, 38, 34, 24, 23, 20, 18, 14, y 12 kDa.

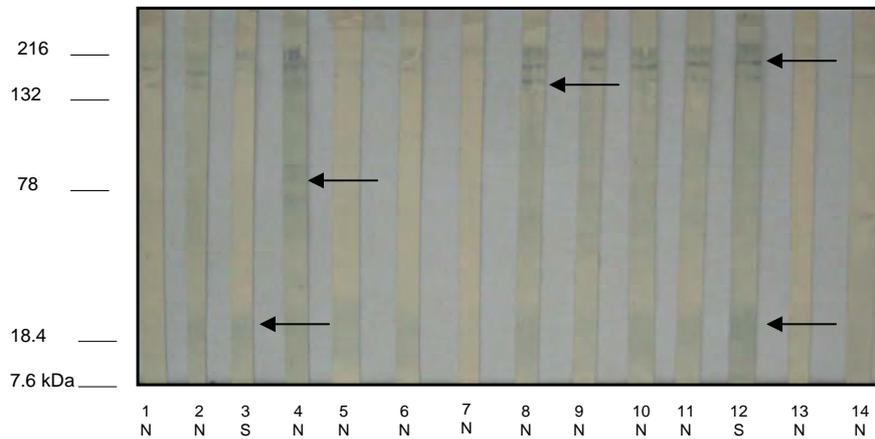


Figura 3. Western blot con tinción de plata. Reconocimiento de antígenos de *F. hepatica* por sueros de bovinos sospechosos y negativos a la prueba intradérmica cervical comparativa. Carril: 1=DO 0.449, 2=0.441, 3=0.347, 4=0.754, 5=0.497, 6=0.280, 7=0.473, 8=0.351, 9=0.471, 10=0.413, 11=0.480, 12=0.580, 13=0.395 y 14=0.302. S=sospechoso y N= negativo.

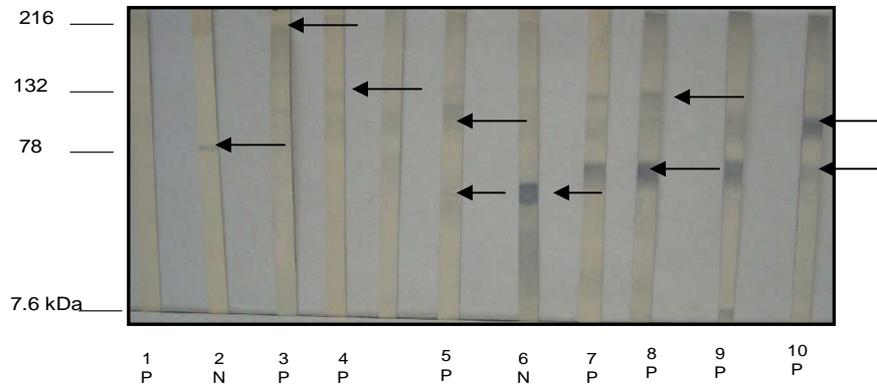


Figura 4. Western blot con tinción de plata. Reconocimiento de antígeno CFPE de *M.bovis* por sueros de bovinos positivos y negativos a la prueba intradérmica cervical comparativa. Carril: 1=DO 0.290, 2=0.311, 3=0.382, 4=0.646, 5=0.686, 6=0.486, 7=0.516, 8=0.540, 9=0.407, 10=0.436. P=positivo y N= negativo.

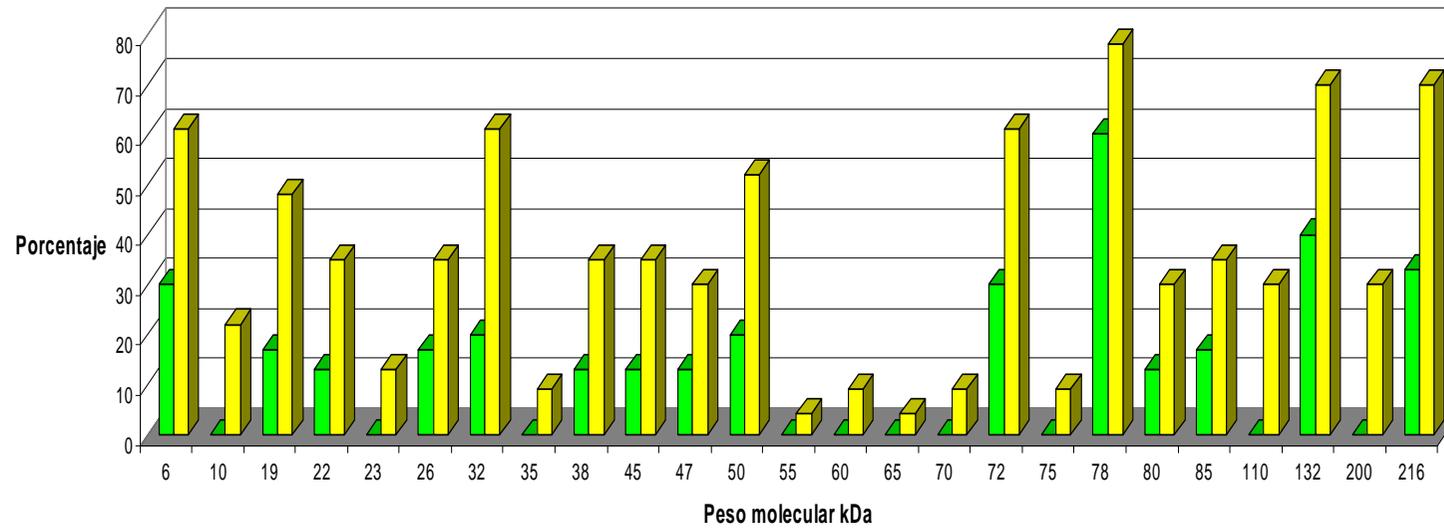


Figura 5. Western blot. Frecuencia de reconocimiento de antígeno de secreción/excreción de ■ *F. hepatica* y ■ CFPE de *M. bovis* por sueros de bovinos reactivos a la prueba intradérmica caudal. Las proteínas con mayor frecuencia fueron 216, 132, 78, 72, 50, 32 y 6 para *F. hepatica*, mientras que para *M. bovis* fueron de 216, 132 y 78 kDa.

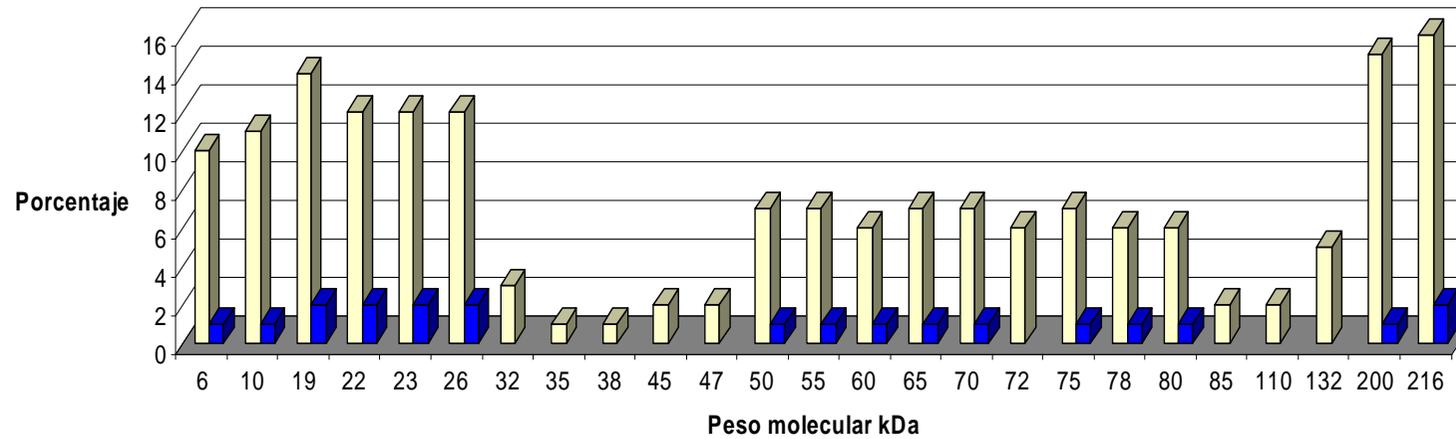


Figura 6. Western blot. Frecuencia de reconocimiento de antígenos secreción/excreción de *F. hepatica* por sueros de bovinos ■ sospechosos y ■ negativos a la prueba intradérmica cervical comparativa. Para los animales sospechosos los pesos de las proteínas con mayor frecuencia fueron 216, 200 y 19 kDa, mientras que en los negativos las proteínas que se observaron con mayor frecuencia: 216, 26, 23, 22 y 19 kDa.

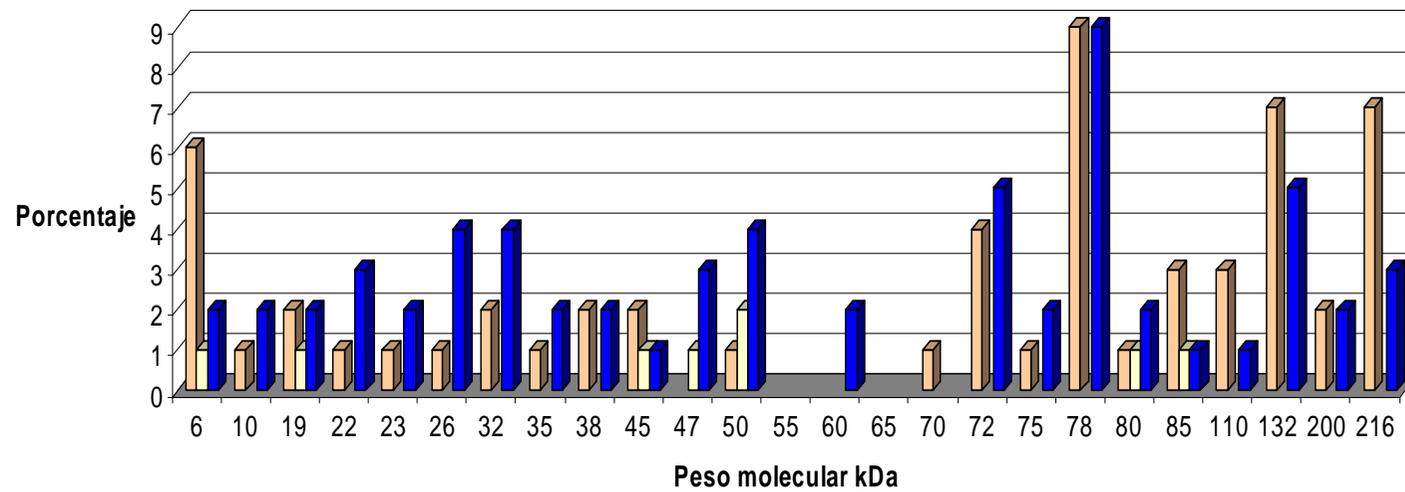


Figura 7. Western blot. Frecuencia de reconocimiento de antígenos de CFPE de *M. bovis* por sueros de bovinos positivos, sospechosos y negativos a la prueba intradérmica cervical comparativa. En los animales positivos los pesos moleculares con mayor frecuencia: 216, 132 y 78, para los sospechosos: 50, finalmente en los negativos 132, 78, 72, 50, 32 y 26 kDa.

Abreviaturas

<i>Fasciola hepatica.</i>	<i>F. hepatica.</i>
<i>Mycobacterium bovis.</i>	<i>M. bovis.</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis.</i>
Antígenos de Secreción/Excreción de <i>F. hepatica.</i>	SEFh
Inmunoglobulina	Ig
Tuberculosis	TB
Intradérmica caudal	IDC
Intradérmica cervical compartiva	IDCC
Interferón gamma	IFN- γ
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	ELISA
Microlitro	μ l
Células asesinas	NK
Volts	V
Positivo	P
Sospechoso	S
Negativo	N
Extracto protéico de filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> y <i>M. avium.</i>	CFPE
Complejo Mayor de Histocompatibilidad I	MHC I
Complejo Mayor de Histocompatibilidad II	MHC II
Albúmina Sérica Bovina	BSA
Peroxidasa de Rábano	HRP

