



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN BECERRAS INMUNIZADAS CON LA  
VACUNA BCG**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**ANA GABRIELA VEGA MUNGUÍA**

**ASESORES: DR. FERNANDO DÍAZ OTERO**

**CO ASESORES: LIC. EVE-LYNE QUEVILLON CARDINAL**

**MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ**

**DR. FERNANDO OSNAYA GALLARDO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuaautitlán



Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

Determinación de la respuesta inmune en becerras inmunizadas con la vacuna BCG

Que presenta la pasante: Ana Gabriela Vega Munguia  
 Con número de cuenta: 40403874-8 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
 Cuautitlán Izcallí, Méx. a 1 de Septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. José Margarito Rojo López	
VOCAL	MVZ. Humberto Gustavo Arellano Sánchez	
SECRETARIO	MVZ. Rafael Pérez González	
1er SUPLENTE	Dra. Marisela Leal Hernández	
2do SUPLENTE	MVZ. Gustavo Díaz Manríquez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
 HHA/pm

**DEDICATORIA**

***A SANTIAGO***

**A MIS PADRES**

**HERMANOS**

**LA INVESTIGACIÓN SE EFECTUÓ EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL CENTRO  
NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIA (CENID) EN MICROBIOLOGÍA  
ANIMAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y  
AGROPECUARIAS**

**“DESARROLLO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE  
ANIMALES VACUNADOS DE INFECTADOS NATURALMENTE EN LA TUBERCULOSIS  
BOVINA “**



**TRABAJO PARCIALMENTE FINANCIADO CON FONDOS FISCALES 2009.**

**PROYECTO N° 3216943P**

**LAS ACTIVIDADES DE CAMPO SE REALIZARON EN LA CUENCA LECHERA DE TIZAYUCA,  
HIDALGO.**

## INDICE

### RESUMEN

1.- Introducción.....	1
1.1.- Definición de la enfermedad .....	1
1.2.- Salud pública e impacto económico.....	1
1.3.- Generalidades de las micobacterias patógenas.....	2
1.4.- Agente causal de la tuberculosis bovina .....	3
1.5.- Patogenia de la tuberculosis bovina.....	3
1.6.- Inmunidad de la tuberculosis bovina .....	4
1.7.- La vacuna BCG .....	7
1.8.- Antígenos relevantes para el diagnóstico de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	8
1.9.- Diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	9
1.9.1.- Intradermorreacción (Prueba de la tuberculina) .....	9
1.9.2.- Prueba de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	10
1.9.3.- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	11
1.9.4.- Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	11
1.9.5.- Aislamiento e identificación bacteriológica de <i>M. bovis</i> .....	12
1.10.- Principios teóricos de la citometría de flujo.....	13
2.- Hipótesis .....	15
3.- Objetivo general .....	15
4.- Objetivos particulares.....	15
5.- Materiales y métodos.....	16
5.1.- Animales de estudio .....	16
5.2.- Diseño experimental .....	16
5.3.- Obtención de la vacuna BCG cepa Phipps.....	16
5.4.- Prueba intradérmica cervical doble comparativa .....	17
5.5.- Prueba de detección de IFN- $\gamma$ .....	18
5.6.- Prueba de ELISA.....	19
5.6.1.- Obtención del extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE) de <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i> .....	19
5.6.2.- Prueba de ELISA.....	19
5.7.- Extracción de ADN.....	20
5.8.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	20
5.8.1.- PCR simple .....	20
5.8.2.- PCR anidada.....	21
5.9.- Aislamiento bacteriológico.....	21
5.10.- Citometría de flujo .....	22
5.11.- Análisis estadístico .....	23
6.- Resultados. ....	24
6.1.- Prueba de la intradermorreacción .....	24

6.2.- Detección de la producción de IFN- $\gamma$ .....	25
6.3.- Detección de anticuerpos.....	28
6.4.- Detección de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	29
6.4.1.- Aislamiento de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	29
6.4.2.- PCR simple .....	29
6.4.3.- PCR anidada.....	30
6.5.- Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .....	33
7.- Discusión.....	34
8.- Conclusiones.....	42
9.- Anexo.....	43
10.- Bibliografía.....	47

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que representa un problema mundial tanto en humanos como en animales. La tuberculosis bovina (TBB) es causada por *Mycobacterium bovis* y provoca grandes pérdidas económicas al sector pecuario, además de representar un problema de salud pública, ya que se considera como una enfermedad zoonótica. Por ello, es necesario encontrar estrategias efectivas para el control de la TBB, como la implementación adecuada de medidas sanitarias contra la infección, aunado a ello la vacunación en animales recién nacidos. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) representa una excelente vacuna para la inmunización de animales de campo, ya que posee las cualidades requeridas para una vacuna veterinaria, como bajo precio y patrón de seguridad excelente. Sin embargo, un inconveniente de la vacunación con BCG es que puede sensibilizar los animales a la prueba de la tuberculina e invalidar el diagnóstico.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta inmune de becerras vacunadas con BCG, mediante un grupo de 5 animales vacunados con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC (unidades formadoras de colonias) de BCG cepa Phipps. Las becerras fueron monitoreadas por un periodo de 9 meses, para evaluar las respuestas inmunes celular, humoral, así como las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Además, se intentó detectar el patógeno por aislamiento bacteriológico y PCR.

Después de la vacunación, se observó un incremento de los niveles de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) hacia el derivado proteico purificado (PPD) bovino entre los días 21 y 150 y ante el PPD aviar, al día 60. En cuanto a la producción de IFN- $\gamma$  hacia los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10, se percibieron ligeros incrementos principalmente en el grupo no vacunado. Además, al día 180, los niveles de IFN- $\gamma$  hacia ambos antígenos se incrementaron fuertemente en un animal del grupo no vacunado, el cual fue reactor a la prueba de la tuberculina, positivo en las pruebas de ELISA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. No se observaron cambios significativos tanto en los niveles de anticuerpos como en las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Finalmente, se logró amplificar el gen MPB70 en varias becerras durante el estudio y en las últimas dos tomas de muestras, todas fueron positivas a la PCR anidada.



Los resultados demostraron que la vacunación con BCG cepa Phipps, empleado a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC, ocasionó una respuesta inmune moderada, de tipo Th1, en becerras menores a tres meses de edad, representada por el incremento de la producción de IFN- $\gamma$  hacia el PPD bovino. Sin embargo, la inmunización no sensibilizó los animales a la prueba de la tuberculina, por lo cual, se podría considerar como una estrategia en el control de la TBB en hatos de altas prevalencia.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- Definición de la enfermedad**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa crónica, causada por bacterias que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas, principalmente en linfonódulos y pulmones y puede llegar a afectar los órganos digestivos, genitourinarios, huesos, articulaciones y difundirse por todo el organismo. La TB se transmite principalmente por la inhalación de bacilos, eliminados en la tos y el estornudo de individuos infectados. Además, existe el contagio por vía digestiva, donde la infección se adquiere al ingerir quesos frescos o leche contaminada no pasteurizada (Morales y cols. 2008; Díaz y cols. 2010; Periodismo de Ciencia y Tecnología 2000).

### **1.2.- Salud pública e impacto económico**

En América Latina, la erradicación de la tuberculosis humana (TBH) y bovina (TBB) constituye un problema difícil de solucionar. En los bovinos, la TB es causada por *Mycobacterium bovis* y se considera como una enfermedad zoonótica, ya que se ha reportado que origina de 5 a 10 % de los casos de TBH. La transmisión de la enfermedad, en la población humana, se hace por contacto físico con animales infectados, en especial la población rural, personal de frigoríficos y de la industria de la carne, veterinarios y laboratoristas, entre otros. Además, se relaciona con el consumo de leche y sus derivados no pasteurizados. Por ejemplo en México, la población de bovinos lecheros estaba constituida de 2 374 623 cabezas en 2010. El problema es que se estima que 30 % de los 7 mil millones de litros de leche producida anualmente se vende cruda, sin medidas sanitarias para el control de la TBB (Campo mexicano 2010; Periodismo de Ciencia y Tecnología 2000; López y cols. 2006; Hope y cols. 2008; Zendejas y cols. 2007; Toledo y cols. 1999; Latini y cols. 1997).

Conjuntamente con los problemas de salud pública, la TBB provoca serias implicaciones económicas, además de las pérdidas directas por la muerte de los animales, es responsable de bajas en la producción. Se estima que la TBB disminuye la producción de leche en un 17 %, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión

alimenticia en un 15 %, la fertilidad en un 6 % y causa el decomiso de canales en rastros. Por otra parte, en el comercio, se ha convertido en una de las principales barreras para la exportación de animales y productos derivados. Esto trae como consecuencias descontrol en el mercado interno y disminución de los precios. En el país, se lleva a cabo una campaña para el control y la erradicación de esta enfermedad. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana, los animales positivos a la prueba de la tuberculina deben ser sacrificados y en ganado lechero donde las prevalencias son elevadas, esto es incosteable (Periodismo de Ciencia y Tecnología 2000; Zendejas y cols. 2007; NOM-031-ZOO-1995).

### **1.3.- Generalidades de las micobacterias patógenas**

Las micobacterias pertenecen al orden *Actinomycetales*, a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. El género está dividido en dos grandes grupos: el CMTB y las micobacterias no-tuberculosas. El CMTB está compuesto de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. microti*. Todas estas micobacterias son patógenas y agentes etiológicos de la TB en mamíferos (Ward y cols. 2005).

La morfología característica de las micobacterias suele ser bacilar, ligeramente curvada, con una longitud de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Los bacilos intracelulares facultativos son aerobios estrictos, no forman esporas y son de crecimiento lento. El crecimiento es favorecido con una atmosfera de 5-10 % de  $\text{CO}_2$  y un rango de temperatura entre 30-42  $^{\circ}\text{C}$ . Una característica de las micobacterias es que son ácido alcohol resistente en la tinción de Ziehl Neelsen, es decir que una vez teñida con fucsina básica, tienen la capacidad de resistir a la decoloración de una combinación de alcohol-ácido, debido a la alta concentración de ácido micólico en su pared celular (Ward y cols. 2005; De Hoyos V. 2009; CONETB 1998).

La envoltura micobacteriana es una estructura compleja, constituida por la cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula representa la capa externa de la envoltura y sirve de protección contra múltiples factores externos. Entre los principales componentes, se encuentran los ácidos micólicos, los glicolípidos y algunas proteínas,

responsables de la inmunogenicidad de la bacteria. Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para las micobacterias y bacterias de géneros relacionados como *Nocardia* y *Corynebacterium*. En las micobacterias, los ácidos micólicos tienen de 70-80 carbonos y se les atribuyen el carácter hidrofóbico de la cápsula. La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula y posee un elevado contenido en lípidos (50-60%), que participa, de igual forma, en el carácter hidrofóbico de la envoltura y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. La pared celular está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano. Finalmente, la membrana plasmática tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias, los derivados de fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como el lipoarabinomanana (LAM), que tiene un papel en la patogénesis de la TB (Gorocica y cols. 2005).

#### **1.4.- Agente causal de la tuberculosis bovina**

El bacilo *M. bovis* es un organismo microaerófilo, de crecimiento lento, con un tiempo de multiplicación de 15 a 18 horas en condiciones favorables. Por ello, son necesarias de 1 a 3 o más semanas de incubación para tener un crecimiento apreciable en los medios de cultivo convencionales, como Lowenstein Jensen o Middlebrook, con una temperatura de 37°C y una atmósfera humidificada de 5-10% de CO<sub>2</sub>. La morfología de las colonias de *M. bovis* suele ser disgónica, pequeña, de aspecto escamoso y no cromógeno. La bacteria es moderadamente resistente al calor, desecación y muchos desinfectantes, debido a las características hidrofóbicas de su superficie (Kubica y cols. 2006; Payeur y cols. 1993).

#### **1.5.- Patogenia de la tuberculosis bovina**

La TBB es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente los nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio de los bovinos. El ganado es más propenso a ser infectado con *M. bovis* a través de la inhalación de gotas de aerosol que contienen estos bacilos. Las gotas pueden permanecer en el aire hasta una hora con bacilos vivos, actuando como reservorios del microorganismo y creando un riesgo elevado para la

infección. Una lesión primaria se implementa después de la interacción del huésped con el patógeno. La enfermedad depende del establecimiento y proliferación de los bacilos virulentos y de la propia reacción del huésped. En bovinos, las lesiones tuberculosas macroscópicas y microscópicas han sido descritas. En general, las lesiones aparecen como un nódulo firme, de color blanco-amarillo y de tamaño muy pequeño. El centro del granuloma en formación está constituido de células epitelioides y gigantes, tipo Langhans, ambas derivadas de macrófagos, seguido de una zona de linfocitos, células plasmáticas y monocitos. Con la progresión de la lesión, se desarrolla una zona formada por fibroblastos, que rodean a la lesión mediante la síntesis de colágeno y una región de necrosis caseosa central con mineralización. Este proceso es generalmente un medio eficaz para contener la propagación de las bacterias. Se postula que el bacilo es incapaz de multiplicarse dentro de la región caseosa debido al pH ácido, la baja disponibilidad de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos. Sin embargo, algunos organismos pueden permanecer en un estado de latencia (Neill y cols. 2001; Pollock y cols. 2006; Neill y cols. 1994; Jiménez y cols. 2001; Smith y cols. 2003).

La fuerza de la respuesta inmune celular del huésped determina si la infección para o progresa a la siguiente etapa. Una TB latente o persistente puede permanecer durante toda la vida del individuo en un estado asintomático y no transmisible. Si el sistema inmune del sujeto se debilita, el centro del granuloma se puede licuar permitiendo la replicación incontrolada de las bacterias. En esta etapa, las micobacterias se pueden escapar del granuloma y propagarse en el órgano (TB activa) y a otros tejidos vía el sistema linfático y la sangre (TB miliar o extrapulmonar), volviendo el individuo contagioso (Smyth y cols. 2001).

#### **1.6.- Inmunidad de la tuberculosis bovina**

Las primeras células en tener contacto con la micobacteria, después de su llegada al tracto respiratorio, son los macrófagos. El reconocimiento por el macrófago de patrones moleculares específicos de la superficie del patógeno, como el LAM o lipoproteínas, constituye la primera línea de defensa del sistema inmune innato del hospedero contra la TB. Esta interacción inicial se produce por receptores del

macrófago, tales como receptores del complemento, receptores de manosa, receptores de surfactantes y receptores basureros, provocando la fagocitosis de la micobacteria. Recientemente, la atención se ha concentrado hacia los receptores toll-like (TLR), específicamente TLR2 y TLR4, los cuales capturan las micobacterias y promueven las respuestas antimicobacterianas. Después de la unión a los receptores, vías de señalización comunes son activadas, que llevan a la activación celular, la producción de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-1 (IL-1), la IL-6 y quimiocinas, con la finalidad de reclutar leucocitos. Asimismo, algunas quimiocinas como IL-8 atraen a los neutrófilos, los cuales fagocitan rápidamente la micobacteria y la destruyen mediante la fusión del fagosoma con el lisosoma y gránulos especializados. Además, secretan quimiocinas como la proteína inducida por IFN- $\gamma$  (IP-10), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\alpha/\beta$ ), para atraer otras células inmunes como los macrófagos. Los macrófagos reclutados y activados originan la aparición de IL-12 y IL-18, las cuales activan a las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1) y estimulan la actividad citotóxica de las células T CD8<sup>+</sup> y NK (Natural Killer), promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  y la actividad microbicida de los macrófagos (Smyth y cols. 2001; García y cols. 2009).

Como parte de la inmunidad antimicobacteriana, el desarrollo de una respuesta mediada por células (IMC) de tipo Th1, a través de la producción de citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ , es considerado esencial para activar las rutas microbicidas de los macrófagos. Se ha reportado que todas las subpoblaciones de linfocitos T, incluyendo los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ , son implicadas en la respuesta inmune hacia micobacterias. El receptor  $\alpha\beta$  de los linfocitos T reconoce péptidos antigénicos específicos de *M. bovis* presentados por macrófagos, mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, a través del CMH-II, tienen un papel primario en la producción de IFN- $\gamma$ , activando al macrófago y promoviendo sus mecanismos de destrucción del bacilo, mediante el óxido nítrico y el peróxido de hidrogeno. Por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, restringido al CMH-I, tienen una actividad citotóxica crucial, destruyendo las células infectadas, además de participar directamente en la muerte de la micobacteria a través de una proteína asociada a

gránulos denominada granulosisina. De la misma manera, los linfocitos T  $\gamma\delta$  tienen su parte en las infecciones micobacterianas. En ganado, los linfocitos T  $\gamma\delta$  circulantes representan 10-15 % de las células mononucleares de la sangre periférica en animales adultos y más de 40 % en animales jóvenes. Se ha demostrado varias funciones de los linfocitos T  $\gamma\delta$ , incluyendo la producción de citocinas, como el IFN- $\gamma$ , actividad citotóxica, inmunomodulación, organización del granuloma y regulación de la inflamación. Cuando se infectan bovinos experimentalmente con *M. bovis*, los linfocitos T  $\gamma\delta$  son los primeros en sufrir un cambio en la circulación periférica. Es probable que estos linfocitos sean capaces de migrar rápidamente en las áreas infectadas con *M. bovis* y participarían en la fase temprana de la contención bacteriana (Jiménez y cols. 2001; Smith y cols. 2003; Smyth y cols. 2001; García y cols. 2009; Welsh y cols. 2005; Pollock y cols. 2002).

La progresión de la enfermedad puede ocasionar un cambio en la inmunodominancia, de Th1 a Th2, asociado al desarrollo de una respuesta humoral. Las células Th2, inducidas por IL-4, producen grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, importantes para la respuesta inmune mediada por anticuerpos. La IL-4 es secretada principalmente por las células T CD4<sup>+</sup> de tipo Th2 y causa la activación, proliferación y diferenciación de las células B. Esta citocina tiene la capacidad de modular negativamente la respuesta Th1, suprimiendo la producción de IFN- $\gamma$  y evitando la activación de los macrófagos. En infecciones experimentales de TB, IL-4 se relaciona con la progresión de la enfermedad, la reactivación de infecciones latentes y la intensificación del daño tisular. De manera similar, IL-10 antagoniza la respuesta proinflamatoria mediante la disminución de la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12. Esta citocina es producida por las células Th2, así como monocitos y macrófagos. La IL-10 incrementa la proliferación y diferenciación de las células B activadas. En ganado infectado experimentalmente con *M. bovis*, el incremento de IL-10 así como del nivel de anticuerpos IgG1 está asociado a una infección diseminada y correlaciona positivamente con el grado de patología. La ausencia de IL-10 produce respuestas inmunes Th1 más poderosas, mientras que una expresión elevada incrementa la susceptibilidad hacia infecciones micobacterianas (Jiménez y cols. 2001; Smith y cols. 2003; García y cols. 2009; Welsh y cols. 2005; Hamblin, 1993; Raja, 2004).

### 1.7.- La vacuna BCG

En 1921, la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guérin), una cepa atenuada de *M. bovis* obtenida de una vaca con lesiones de mastitis tuberculosas, fue probada por Calmette y Guérin en ganado y humanos. La cepa, a través de una serie de pases en medio de papa glicerinada, perdió su capacidad a producir la enfermedad. La BCG original, proveniente del Instituto Pasteur, fue enviada a diversos países, diversificándose en cepas hijas a través de pérdidas de diferentes regiones genéticas llamadas regiones de diferencia (RD), provocando variaciones en la eficacia protectora (Hope y cols. 2008; Pollock y cols. 2006; Castillo-Rodal y cols. 2006).

Durante los últimos 10 años, se han considerado diferentes tipos de vacunas contra la TB en ganado: basadas en microorganismos vivos atenuados o muertos, vacunas subunitarias compuestas por proteínas o glicoproteínas purificadas y vacunas de ADN. Sin embargo, la BCG posee las cualidades requeridas para una vacuna veterinaria, como bajo precio y patrón de seguridad excelente y todas las vacunas nuevas tendrán que ser comparadas con la BCG antes de su uso oficial (Vordermeier y cols. 2006).

En bovinos, la protección de la vacuna se manifiesta principalmente por una reducción en el grado de patología de la infección (Vordermeier y cols. 2006). Los ensayos experimentales y de campo en ganado han demostrado un alto grado de variabilidad en la habilidad de la BCG a proteger en contra de las infecciones de *M. bovis* (Hope y cols. 2008). Su eficacia en el ganado reportada desde los últimos 70 años va del 0 % al 70 %, similar a lo que podemos observar en humanos (Vordermeier y cols. 2002). Muchos factores pueden explicar la eficiencia variable de la BCG. Por ejemplo, las dosis bajas-medias ( $10^3$ - $10^6$  UFC) han inducido una protección en el ganado en contra de la TB, mientras que las dosis más altas ( $10^8$ - $10^{10}$  UFC), han sido menos efectivas (Buddle y cols. 2006). Asimismo, la utilización de diferentes cepas de BCG, las rutas de vacunación usadas, las discrepancias en la preparación de la vacuna, la interpretación de la protección inmunitaria y la genética del ganado son factores que pueden influenciar la variabilidad de la BCG. Además, hay evidencias que la presensibilización de los animales con micobacterias ambientales interfiere con la protección de la BCG, provocando una estimulación inapropiada de la respuesta inmune (Hope y cols. 2008).



Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la vacunación con BCG en becerros neonatos induce niveles altos de protección en contra de la TB, probablemente debido a la falta de presensibilización con las micobacterias ambientales, lo que permite el desarrollo de una respuesta inmune adecuada (Hope y cols. 2005 y 2008). No se sabe mucho sobre la duración de la protección de la vacunación con la BCG en ganado. En humanos, la protección parece disminuir después de 10 años y una revacunación tiene efecto mínimo (Buddle y cols. 2006).

Finalmente, se ha reportado que la vacunación con BCG, utilizando las cepas Pasteur o Danesa, sensibiliza los animales a la prueba intradérmica de la tuberculina, los cuales responden positivamente a la prueba e invalida el diagnóstico (Hope y cols. 2011). Sin embargo, en otros estudios, se ha demostrado que el empleo de la BCG cepa Phipps, no induce una respuesta en la prueba de la tuberculina (Padillas 2004).

### **1.8.- Antígenos relevantes para el diagnóstico de *Mycobacterium bovis***

La prueba de la tuberculina se basa en el uso del derivado proteico purificado (PPD), un antígeno de naturaleza compleja. El PPD está constituido de varias proteínas que presentan reacciones cruzadas con una gran variedad de micobacterias. Por eso, el estudio de las proteínas de *M. bovis* se ha orientado principalmente en el aislamiento e identificación de antígenos específicos, para el desarrollo de pruebas diagnósticas confiables. La purificación y caracterización de proteínas específicas es esencial para esclarecer tanto los mecanismos de patogenicidad de la micobacteria como los mecanismos inmunes que se desarrollan durante la infección y permite identificar tanto aquellos antígenos capaces de inducir una inmunidad protectora, como aquellos que pueden servir con fines de diagnóstico (Díaz y cols. 2010).

Dentro del grupo de antígenos importantes para el diagnóstico de la TBB, se encuentra la proteína MPB70, específica de las micobacterias del CMTB y componente activo del PPD bovino. Esta proteína, de 22-25 kDa dependiendo de su grado de glicosilación, es secretada en gran cantidad por *M. bovis*, mientras que su síntesis es variable en las cepas de BCG y otras especies del CMTB. Se ha comprobado que MPB70 representa un antígeno inmunodominante, capaz de inducir una respuesta celular y humoral durante

la infección con *M. bovis*, tanto en humano como en bovino (Wiker y cols. 1998; Cheong y cols. 2005; Díaz y cols. 2002).

Sin embargo, los reactivos de diagnóstico deberían desarrollarse utilizando antígenos específicos y definidos, presentes en *M. bovis* virulenta pero ausentes de la cepa de la vacuna, para poder distinguir el ganado vacunado con BCG del ganado infectado con *M. bovis*. La comparación genética de cepas patógenas de *M. bovis* con cepas de BCG ha revelado que muchas regiones de la BCG se han perdido durante el proceso de atenuación. Las proteínas codificadas por esas regiones RD, han recibido mucha atención como antígenos de diagnóstico, especialmente las de la región RD1. La región RD1 codifica dos antígenos importantes, ESAT-6 (*early secretory antigen target-6*) y CFP-10 (*culture filtrate protein-10*), que representan proteínas de filtrados de cultivo secretadas durante la fase inicial del crecimiento de las bacterias del CMTB. Ambos antígenos representan blancos importantes de las células T en animales y humanos infectados e inducen la producción de IFN- $\gamma$  en ganado tuberculoso. Por lo anterior, ESAT-6 y CFP-10 se pueden utilizar para distinguir el ganado vacunado con BCG del ganado infectado con *M. bovis* (Vordermeier y cols. 2002; Aagaard y cols. 2006; Calderón y cols. 2006).

## **1.9.- Diagnóstico de la tuberculosis bovina**

Los programas que existen para el control de la TBB son costosos y el diagnóstico de la enfermedad es clave en la erradicación de la enfermedad. Por ello, el diagnóstico debería ser formado por un método eficiente y costo efectivo, para evitar que permanezcan en el rebaño, animales infectados o que se eliminen animales sanos. Actualmente, se están estudiando diferentes pruebas de diagnóstico, así como la sensibilidad y especificidad de las mismas (Ward 2005).

### **1.9.1.- Intradermorreacción (Prueba de la tuberculina)**

La prueba de tuberculina ha constituido el instrumento básico para detectar la presencia de infección tuberculosa y desempeña un papel fundamental en el programa de control y erradicación de la TBB. La prueba se emplea para detectar animales que estuvieron en contacto con *M. bovis*. Para la realización de la prueba simple, se inoculara

intradérmicamente una mezcla compleja de antígenos, llamada PPD bovino, obtenido de la cepa AN5 de *M. bovis*, o bien simultáneamente con el PPD aviar, obtenido de la cepa D4 de *M. avium*, para la prueba cervical doble comparativa. Esta última prueba se utiliza para diferenciar los animales sensibilizados con micobacterias ambientales, como *M. paratuberculosis* o *M. avium*, de los animales que estuvieron en contacto con *M. bovis* (SENASA 2010).

La prueba pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad tardía de tipo IV en el sitio de inyección, en caso de haber tenido exposición previa con los antígenos. En bovinos, esta respuesta inflamatoria tarda varias horas en desarrollarse y alcanza su máxima expresión a las 72 horas, con un engrosamiento de la piel. Se prevé que la sensibilidad de la prueba de tuberculina varía de 68-95 %, mientras que la especificidad varía entre 96-99 % (Monaghan y cols. 1994).

Entre las desventajas del uso de la prueba de la intradermorreacción, pueden mencionarse una respuesta hacia los antígenos del PPD bovino en animales previamente vacunados con BCG o sensibilizados por micobacterias ambientales, dando lugar a falsos-positivos. Además, se ha corroborado que hasta 19 % del ganado tuberculoso no reacciona a la prueba de la tuberculina, ya que no detecta los animales anérgicos, en los cuales la inducción de una respuesta de tipo celular es nula (Estrada y cols. 2001).

### **1.9.2.- Prueba de detección de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ )**

Esta prueba se utiliza para la detección de la TBB y mide la respuesta IMC *in vitro* a partir de sangre completa. El principio se basa en la cantidad de IFN- $\gamma$  secretado por los linfocitos T de animales previamente expuestos a *M. bovis*. La sangre del animal se estimula con PPD bovino, PPD aviar y un pozo permanece sin estímulo como control. El plasma conteniendo el IFN- $\gamma$  producido se recupera y se ensaya por una prueba de ELISA. Un contacto previo con *M. bovis* se manifiesta por una producción predominante de IFN- $\gamma$  hacia el PPD bovino. La sensibilidad de la prueba puede variar de 82-100 % y la especificidad se encuentra entre 94-100 %. La especificidad de la prueba puede mejorarse mediante el uso de proteínas de secreción específicas como

ESAT-6 y CFP-10, que son presentes en cepas patógenas del CMTB, pero ausentes tanto de la cepa vacunal BCG como de las micobacterias ambientales. Esta prueba puede detectar infecciones con *M. bovis* en fase temprana, contrariamente a la prueba de la tuberculina (Wood y cols. 2001; Espinoza 2008).

### **1.9.3.- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Esta técnica se emplea para la detección de anticuerpos hacia el antígeno de interés. Se ensaya el suero problema en una placa donde el antígeno está fijado. La reacción se revela empleando proteínas conjugadas a una enzima, que reconocen la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos unidos y la agregación del sustrato conjuntamente con un cromógeno. La aparición de color permite medir, mediante espectrofotometría, la cantidad de anticuerpos presente en la muestra. Para la realización de esta prueba, se han utilizado diferentes antígenos como el PPD, extractos proteicos de filtrados de cultivo (CFPE) o antígenos purificados. Se ha reportado que la prueba tiene una sensibilidad de 60 % y una especificidad entre 92-99 % para la detección de la TBB. La principal ventaja de utilizar la prueba de ELISA es que nos permite identificar animales anérgicos, no reactivos a la tuberculina y a la prueba de detección de IFN- $\gamma$  (Torres 2005; Díaz y cols. 2003; Silva 2001; Rivera y cols. 2010).

### **1.9.4.- Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR es un método de síntesis de ADN *in vitro* mediante el cual un segmento específico de éste, es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de la enzima ADN polimerasa termostable. Así, se obtiene en cuestiones de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN. Mediante la PCR, es posible monitorear infecciones bacterianas y virales. Los procedimientos convencionales de detección se basan en la posibilidad de crecer los microorganismos en cultivo o en detectar su presencia en individuo mediante diferentes muestras biológicas. La PCR detecta directamente patógenos tradicionalmente difíciles de cultivar, así como aquellos que requieren largos períodos para su cultivo y que se encuentran en muy

bajas concentraciones en los líquidos biológicos, como en el caso de los miembros del CMTB (Rodríguez y cols. 2004).

Diferentes protocolos de PCR para la identificación de *M. bovis* en muestras clínicas de bovinos han sido evaluados. Generalmente, al utilizar la técnica de PCR para el diagnóstico de la TB, se utiliza la secuencia de inserción IS6110 como iniciador, que pertenece al CMTB. Esta secuencia permite distinguir en forma confiable el CMTB de las demás especies de micobacterias. Otros iniciadores, que detectan el gen que codifica la proteína de secreción MPB70, se consideran específicos para *M. bovis* y han demostrado una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 93 % para el diagnóstico de la TBB. La PCR es un método que ofrece grandes ventajas en cuanto a la sensibilidad, flexibilidad y rapidez. Las limitaciones de los protocolos convencionales para micobacterias surgen por el bajo número y eliminación intermitente de los bacilos en animales infectados, la extracción ineficiente del ADN micobacteriano y la presencia de inhibidores de la reacción propios de la muestra (Laborín y cols. 2001; Salian y cols. 1998; Rúa-Domenech y cols. 2005).

#### **1.9.5.- Aislamiento e identificación bacteriológica de *M. bovis***

El aislamiento está considerado como la prueba de oro para la confirmación de una infección micobacteriana y se puede obtener a partir de diferentes muestras biológicas de bovino como las secreciones nasales cuando el animal está vivo o a partir de lesiones de cualquier órgano cuando está muerto. El crecimiento de *M. bovis* en medio Löwenstein-Jensen es mejor en presencia de piruvato que de glicerol y es inhibido por la hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), a diferencia de *M. tuberculosis*. Una vez que se logró un crecimiento de la micobacteria, el primer paso para su identificación es confirmar que el aislado pertenece al género *Mycobacterium*, mediante la tinción de Ziehl Neelsen. Después de esa confirmación, se utilizan diversas pruebas bioquímicas para distinguir las diferentes micobacterias. Por ejemplo, las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativas en *M. bovis* y positivas en *M. tuberculosis*. El resto de las características bioquímicas son indistinguibles; pruebas de la ureasa y catalasa positivas, tolerancia al cloruro de sodio negativa etc. Además, *M. bovis* presenta una resistencia natural a la pirazinamida y

una actividad pirazinamidásica defectiva. Asimismo, se puede diferenciar de *M. africanum* por la resistencia a la pirazinamida. La cepa BCG de *M. bovis* presenta, además, resistencia a la cicloserina, así como una fuerte actividad ureásica. Sin embargo, los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante (González y cols. 2007; Prat y cols. 2001).

### **1.10.- Principios teóricos de la citometría de flujo**

La citometría de flujo permite evaluar características físicas y químicas de células en suspensión como el tamaño celular, la granularidad y complejidad interna, así como la intensidad de fluorescencia relativa que poseen esas células (Castillo 2005).

Básicamente, la citometría de flujo consiste en la medición de un gran número de células, en forma individual, en un período muy corto de tiempo, mientras se desplazan en un sistema de flujo o torrente líquido (100-25 000 células por segundo). Las células pasan por un punto donde son impactadas por un láser que emite luz a una cierta longitud, desviándola de acuerdo a características propias de cada célula. La variación de la longitud de onda así producida es captada y depurada por un complejo sistema de lentes y espejos especiales, que concentra la luz y la transforma en pulsos de voltaje. Estos son codificados e interpretados por un computador provisto del programa adecuado. Los datos obtenidos pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran confiabilidad y exactitud (Castillo y cols. 1999).

Dependiendo de la o las características celulares a analizar, las células son acopladas a anticuerpos monoclonales conjugados a moléculas fluorescentes. Estas moléculas fluorescentes, llamadas fluorocromos, son excitadas por el láser y emiten una respuesta fluorescente en una determinada longitud de onda, permitiendo la identificación de subgrupos específicos de poblaciones celulares. La capacidad para detectar la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda abre completamente el campo del análisis multiparamétrico (Castillo y cols. 1999; Barrera y cols. 2004).

Hoy en día, la citometría de flujo se utiliza en microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular entre otros. Es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga del anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo. Esto hace posible que el uso del citómetro de flujo se adapte prácticamente a cualquier necesidad de investigación (Barrera y cols. 2004).

Son innumerables las utilidades de la citometría de flujo en la investigación básica. Por ejemplo, las aplicaciones de la citometría en medicina veterinaria se basan, en los estudios de la respuesta inmune de infecciones económicamente relevantes para la fabricación de vacunas, el perfeccionamiento de las vacunas ya existentes, el mejoramiento genético de especies bovinas y equinas, el desarrollo de modelos de respuesta inmune en animales y el entendimiento profundo de la patogénesis de ciertas enfermedades infecciosas. La relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más estrecha y la citometría de flujo ya se considera como una herramienta diagnóstica (Barrera y cols. 2004; Laguado 2007).

## **2.- HIPÓTESIS**

La vacunación con BCG cepa Phipps ocasionará una respuesta inmune moderada, en becerras menores a 3 meses de edad, con la ventaja de no interferir durante la aplicación de la prueba de la tuberculina, utilizada para el diagnóstico de la TBB.

## **3.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta inmune de becerras menores a 3 meses de edad, vacunadas con BCG cepa Phipps, en un hato con prevalencia alta de TBB.

## **4.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Estudiar la respuesta inmune celular de becerras inmunizadas con BCG, mediante la prueba de detección de IFN- $\gamma$ .
- 2) Evaluar la respuesta humoral de becerras vacunadas con BCG, mediante la prueba de ELISA.
- 3) Detectar la presencia de *M. bovis* en exudado nasal, mediante la PCR y el aislamiento bacteriológico.
- 4) Evaluar las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de las becerras por citometría de flujo.
- 5) Comprobar si la vacunación con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC de BCG cepa Phipps induce la hipersensibilidad tardía en becerras jóvenes.



## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.- ANIMALES DE ESTUDIO**

El presente estudio se realizó en una cuenca lechera del estado de Hidalgo. El hato tenía una prevalencia de TBB de 40 % al inicio del estudio. Se utilizaron 10 becerras de raza *Holstein-friesian* menores de 3 meses de edad.

### **5.2.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

Inicialmente, se realizaron las pruebas de tuberculina, de detección de IFN- $\gamma$  y de ELISA, para confirmar el estatus libre de TB de los animales. Además, estas pruebas fueron realizadas en las madres de las becerras con el mismo propósito.

Se formaron dos grupos: 5 becerras recibieron la vacuna BCG cepa Phipps a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC en 1.5 ml de solución salina de fosfatos (PBS) estéril vía subcutánea en las tablas del cuello y 5 becerras quedaron como controles negativos, inoculadas con 1.5 ml de PBS estéril como placebo.

Los animales se evaluaron mediante la prueba de detección de IFN- $\gamma$ , para la respuesta inmune celular, la prueba de ELISA, para la respuesta humoral y la citometría de flujo para la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T, a los 0, 7, 15, 21, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 270 días. La prueba de la tuberculina se practicó 10 días antes de la vacunación (día -10) y al día 270. La presencia de *M. bovis* se detectó mediante el aislamiento bacteriológico y la PCR simple y anidada a los 0, 90, 180 y 270 días posvacunación.

### **5.3.- OBTENCIÓN DE LA VACUNA BCG CEPA PHIPPS**

Para la obtención de la vacuna BCG cepa Phipps, es necesario el uso de medios de cultivos especiales que favorecen su crecimiento, como el medio agar Middlebrook 7H10, enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) y medios líquidos como Middlebrook 7H9, enriquecido con ADC. Por lo cual, se utilizaron esos medios en los diferentes pasos de la producción de la BCG.

La cepa vacunal se obtuvo a partir de un lote semilla de BCG cepa Phipps almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se sembró el lote semilla en el medio de cultivo Middlebrook 7H10 enriquecido

con OADC y los cultivos se incubaron a 37°C hasta su crecimiento (15 días). Posteriormente, las colonias se transfirieron en el medio líquido Middlebrook 7H9, adicionado con ADC, para la elaboración del próximo lote semilla y se incubaron a 37°C a 200 rpm. El crecimiento de los cultivos se monitoreó mediante un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm, hasta tener una densidad óptica (DO) de  $\pm 0.8$  nm.

A partir del nuevo lote semilla, se sembraron bacterias en el medio Middlebrook 7H10 con OADC, a 37°C, hasta su crecimiento y las bacterias se transfirieron en el medio Middlebrook 7H9 con ADC. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C, con agitación constante (200 rpm), hasta obtener una DO de 0.4 nm y se almacenaron a -70°C.

Para la cuantificación de las UFC, se realizaron diluciones seriadas ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ), sembrando por triplicado 100  $\mu$ l en medio Middlebrook 7H10 con OADC. Las placas se incubaron durante 3 a 4 semanas a 37°C y el conteo de las UFC se realizó de la siguiente manera:

(UFC) (FD) (10) = bacterias/ml (FD = factor de dilución)

(La vacuna se elaboró en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el laboratorio de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón)

#### **5.4.- PRUEBA INTRADÉRMICA CERVICAL DOBLE COMPARATIVA**

Se realizó la inoculación intradérmica, en las tablas del cuello, del PPD bovino cepa AN5 y PPD aviar cepa D4 (PRONABIVE, D.F., México), en sitios separados por 12 cm de distancia. Se inyectó 100  $\mu$ l de PPD bovino conteniendo 3250 UI/ml y 100  $\mu$ l de PPD aviar conteniendo 2500 UI/ml. Antes de la inoculación, se midió el grosor de la piel con vernier, registrando los valores en una escala milimétrica. Después de 72 horas, el espesor de la piel se midió de la misma manera. Los valores finales de cada sitio de inoculación se restaron de los valores iniciales para obtener la diferencia del espesor de piel después de la inoculación. Una reacción positiva se estableció cuando existió una diferencia  $> 4$  mm entre los valores de los PPD bovino y aviar. Se consideró un

animal sospechoso cuando la diferencia fue entre 2-4 mm. Un valor < 2 mm se tomó como una prueba negativa.

### 5.5.- PRUEBA DE DETECCIÓN DE IFN- $\gamma$

Se colectó sangre heparinizada de los 10 animales y se distribuyó, en condiciones de esterilidad, en placas de 48 pozos (Nuncclon, Denmark), a razón de 1 ml de sangre por pozo. El primer pozo se estimuló con 20  $\mu\text{g/ml}$  de PPD bovino, el segundo pozo con 20  $\mu\text{g/ml}$  de PPD aviar, en los tercer y cuarto pozos se utilizó 4  $\mu\text{g/ml}$  de los antígenos específicos ESAT-6 y CFP-10 respectivamente, el quinto pozo sirvió de control positivo, con 10  $\mu\text{g/ml}$  de *Phytolacca americana* o Pokeweed (PWM), para verificar la viabilidad y funcionalidad celular y el sexto pozo quedó como control sin estimulación. Los cultivos se incubaron a 37°C, en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas y los plasmas colectados se congelaron a -70°C hasta su análisis.

La producción de IFN- $\gamma$  se analizó a partir de las muestras de plasma siguiendo las instrucciones de un kit comercial (*Mycobacterium bovis* Gamma-Interferon Test Kit for Cattle Bovigam™), basado en la prueba de ELISA, disponible para la detección de IFN- $\gamma$  de bovinos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente, durante 1 hora, con 50  $\mu\text{l}$  del diluyente verde, 50  $\mu\text{l}$  de cada plasma y los controles positivos y negativos. Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con la solución de lavado. Se colocó el conjugado (anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  de bovino), durante 1 hora, a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron en la oscuridad con una solución de cromógeno/sustrato durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 50  $\mu\text{l}$  de solución de paro y los resultados se evaluaron a una densidad óptica de 450 nm (DO<sub>450nm</sub>), mediante un lector de ELISA (Benchmark-Plus Microplate Spectrophotometer). Los resultados se consideraron positivos cuando la DO<sub>450nm</sub> del PPD bovino - la DO<sub>450nm</sub> del PPD aviar y la DO<sub>450nm</sub> del PPD bovino - la DO<sub>450nm</sub> del pozo sin estímulo  $\geq$  a 0.1.

## **5.6.- PRUEBA DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

### **5.6.1.- Obtención del CFPE de *M. bovis* y *M. avium***

Los CFPEs se obtuvieron a partir de las cepas de *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4. Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 6 semanas en el medio sintético líquido Dorset-Henley modificado. Las proteínas presentes en el filtrado de cultivo se precipitaron con sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] a una saturación final de 80 %, en agitación constante, a 4°C durante 24 horas. La solución se centrifugó a 15 000 rpm durante 60 minutos a 4°C, la pastilla se resuspendió en 10 ml de PBS, pH 7.2 y se dializó en PBS utilizando bolsas de diálisis con un punto de corte de 10 KDa (Cellu.Sep H1, Membrane Filtration Products, Inc. Seguin TX, USA) a 4°C durante 36 horas. La concentración de proteínas de los CFPEs se determinó por el método de Bradford, se ajustó a 3.5 mg/ml y se dividió en alícuotas de 1 ml que se congelaron a -70°C (OPS-OMS 1972; Bradford 1976).

### **5.6.2.- Prueba de ELISA**

Se realizaron ELISAs comparativas para detectar anticuerpos en suero, utilizando los CFPEs de *M. bovis* cepa AN5 y de *M. avium* cepa D4 como antígenos. Se sensibilizaron las placas (Nunclon, Denmark) con 1 µg/pozo de CFPE en 100 µl de solución de carbonato/bicarbonato (0.1 M), pH 9.6, toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con 200 µl/pozo de solución de Tween-20 al 0.1% en PBS (PBS-Tween), se bloquearon con 100 µl de solución de bloqueo (leche descremada al 3% en PBS-Tween) y se incubaron 1 hora a 37 °C. Después de 5 lavados en PBS-Tween, se agregó 100 µl de suero (1:100) por duplicado, así como los controles positivo y negativo en solución de bloqueo y se incubaron 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron 5 veces en PBS-Tween, se añadió 100 µl de proteína G conjugada con peroxidasa (1:10 000) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en solución de bloqueo y se incubaron 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con una solución de sustrato/cromógeno conteniendo 0.04% de ortofenilendiamina y 0.012% de peróxido de hidrogeno en solución de citrato 0.1 M (pH 4.5) durante 5 minutos a 37 °C. Se paró la reacción agregando 50 µl de ácido sulfúrico 2M y se midió la absorbancia a una

longitud de onda de 492 nm con un lector de ELISA (Benchmark-Plus Microplate Spectrophotometer) (Ritaco y cols. 1990).

## **5.7.- EXTRACCIÓN DE ADN**

Las muestras de exudado nasal se recolectaron de una cavidad nasal de los animales, utilizando hisopos estériles sumergidos en 5 ml de PBS estéril. Las muestras se mantuvieron a 4 °C para el cultivo bacteriológico y la extracción de ADN.

La extracción de ADN se hizo por el método de bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB), lisozima y proteinasa K. Se centrifugó 1 ml de sedimento de exudado nasal a 12 000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 400 µl de TE 1X y 50 µl de lisozima y las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadió 70 µl de SDS 10% y 5 µl de proteinasa K durante 20 minutos a 65°C. Después, se agregó 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB durante 10 minutos a 65 °C. Se agregó 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la primera fase (600 µl), se adicionó 0.6 volumen (360 µl) de alcohol isopropílico absoluto y se dejó 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70 % conservado a -20° C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente con las tapas abiertas durante 20 minutos. Finalmente, se suspendió el ADN en 50 µl de agua inyectable y se almacenó a -20 °C hasta su uso. La integridad del ADN se analizó en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y su cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Gene Quant II, RNA/DNA Calculator) (Morales y cols. 2008; Van Soolingen 1995).

## **5.8.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **5.8.1.- PCR simple**

Se realizó la PCR simple a partir de los iniciadores TB1-F (5'GAAACAATCCGGAGTTGACAA3') y TBR-1 (5'AGCACGCTGTCAATCATGTA3'), que amplifican una región de 372 pb del gen que codifica la proteína de secreción MPB70 del CMTB. La PCR, para 25 µl de reacción, se efectuó empleando 5 pM de cada

iniciador, 2.5 µl de búfer 10 X, 0.5 µl de dNTP (2mM), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.25 µl de la enzima Taq polimerasa (5U/µl) y 5 µl de muestra. Como control positivo se utilizó el ADN de una cepa de *M. bovis* aislado de un bovino tuberculoso y como control negativo agua inyectable. Las condiciones del termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) fueron: precalentamiento a 96°C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, constituidos de fases de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, de alineación e hibridación a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Después de la amplificación, sigue una fase de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio y la reacción se visualizó utilizando un analizador de geles (UVP Bioluminescence Systems, Epi Chemi II Darkroom) (Cousin y cols. 1992).

#### **5.8.2.- PCR Anidada**

Se realizó la PCR anidada a partir de los iniciadores M22/3 (5'GCTGACGGCTGCACTGTCGGGC3') y M22/4 (5'CGTTGGCCGGGCTGGTTTGGCC3'), que amplifican una región interna de 208 pb del gen MPB70. La PCR, para 25 µl de reacción, se efectuó empleando 2.5 µM de cada iniciador, 2.5 µl de búfer 10 X, 0.5 µl de dNTP (2mM), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.25 µl de la enzima Taq polimerasa (5U/µl) y 5 µl del producto de PCR simple. Las condiciones del termociclador fueron: precalentamiento a 96°C por 12 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, constituidos de fases de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, de alineación e hibridación a 71 °C por 30 segundos y extensión a 71 °C por 30 segundos. Después de la amplificación, sigue la fase de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio y la reacción se visualizó utilizando un analizador de geles (UVP Bioluminescence Systems, Epi Chemi II Darkroom) (Cousin y cols. 1992).

#### **5.9.- AISLAMIENTO BACTERIOLÓGICO**

Para el aislamiento bacteriológico, las muestras de exudado nasal se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se descontaminaron con 3 ml de Zefirán al 0.3% durante 10 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se sembró por duplicado en medio Stonebrink

adicionado de piruvato de sodio. Las muestras se incubaron a 37 °C y se inspeccionaron semanalmente. Las colonias de interés se identificaron mediante la tinción Ziehl Neelsen y pruebas bioquímicas como producción de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis del Tween 80, crecimiento en isoniacida y pirazinamida y sensibilidad a la TCH. Los cultivos se consideraron negativos cuando no se observó crecimiento de *M. bovis* después de tres meses (Ramírez y cols. 2004).

#### **5.10.- CITOMETRIA DE FLUJO**

Se colocó 2 ml de sangre periférica heparinizada en dos pozos individuales en placas de cultivo de 24 pozos (Nunclon, Roskilde, Denmark). Los cultivos de sangre se incubaron a 37 °C en una atmosfera humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. La sangre se colectó y los eritrocitos se lisaron con una solución de lisis conteniendo NH<sub>4</sub>Cl (pH 7.2-7.4), durante 15 minutos. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS para la viabilidad y el conteo celular mediante azul tripan (1:10). La concentración celular se ajustó a 500 000 células/tubo en una solución de PBS conteniendo 0.2 % de albumina fetal bovina y 0.2 % azida de sodio (PBA). Las células se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-bovino (CD4, CACT138A, VMRD o CD8, BAT82A, VMRD) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de lavar con PBA, las células se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceina (FITC conjugated, 115-095-205, Jackson Immuno Research) o ficoeritrina (PE conjugated, 115-115-206, Jackson Immuno Research) durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células marcadas se lavaron y se dejaron en 50 µl de paraformaldehido al 1 %. Al otro día, las muestras se leyeron por medios de un citómetro de flujo (FACS Calibur; Becton Dickinson). Las subpoblaciones de linfocitos T se identificaron a partir de la luz "Forward y Side Scatter" y 10 000 células se leyeron por muestras. Los datos se analizaron mediante el Software FlowJo 7.6.1. El porcentaje de células marcadas positivas se determinó a partir de alícuotas controles de células en los cuales se omitió poner el anticuerpo primario (Sopp y cols. 2006).

## **5.9.- ANALISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se hizo mediante la prueba t de Student, con el programa Statistical Analysis System, para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos de animales a cada muestreo. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerando como significativo (Waynew 2008; SAS 1998).



## 6.- RESULTADOS

### 6.1.- Prueba de intradermorreacción

La prueba cervical doble comparativa se realizó en dos ocasiones durante el estudio. La primera se aplicó 10 días antes de la vacunación, con el propósito de descartar animales reactivos y estudiar animales libres de TB. La segunda prueba de la tuberculina se realizó a los 270 días posvacunación y se observó una reacción positiva en una becerro del grupo control (# 9532), con una diferencia entre el PPD bovino (20 mm) y el PPD aviar (6 mm) de 14 mm. Cabe mencionar que del grupo vacunado, murieron dos animales, 180 días después del inicio del experimento (la becerro # 9517 murió de diarrea profusa y la # 9531 murió de neumonía crónica). No se encontraron lesiones tuberculosas en ninguna becerro a la necropsia (Tabla 1).

**Tabla 1.** Prueba cervical doble comparativa de becerros vacunados con BCG y no vacunados 270 días posvacunación.

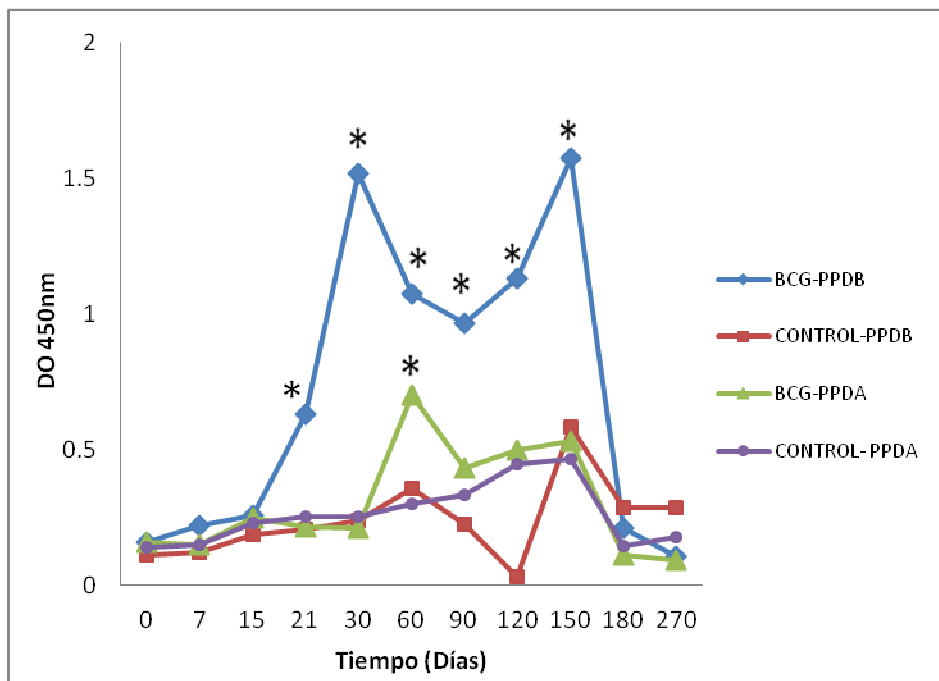
Grupos	No. Animal	PPDB (mm) L 0 hrs/L 72 hrs <sup>‡</sup>	PPDA (mm) L 0 hrs/L 72 hrs <sup>‡</sup>	INTERPRETACIÓN
<b>BCG</b>	9517	*	*	*
	9527	3/5	3/5	-
	9531	**	**	**
	9533	3/5	3/5	-
	9535	3/4	3/4	-
<b>Control</b>	9515	4/5	4/5	-
	9524	4/5	5/5	-
	9529	4/5	4/5	-
	9532	4/20	4/6	+
	9534	3/4	3/4	-

<sup>‡</sup> Lectura en mm de la prueba de la tuberculina cervical doble comparativa de cada animal el día de la inoculación (L 0 hrs) y 72 horas posinoculación (L 72 hrs); (-) animales negativos; (+) Positivos; \* El animal murió de diarrea (colibacilosis); \*\* El animal murió de neumonía crónica.

## 6. 2.- Detección de la producción de IFN- $\gamma$

En la figura 1, se muestran los resultados de la producción de IFN- $\gamma$  en sangre completa estimulada con PPD bovino y PPD aviar. En el grupo vacunado con BCG, se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) hacia el PPD bovino, del día 21 al día 150 posvacunación, con incrementos importantes al día 30 ( $DO_{450nm} 1.520 \pm 0.24$ ) y al día 150 ( $DO_{450nm} 1.574 \pm 0.20$ ). En cuanto al grupo control, sus valores se mantuvieron bajos, excepto al día 150, en donde hubo un ligero incremento ( $DO_{450nm} 0.586 \pm 0.14$ ), debido al valor de  $DO_{450nm}$  alto de una becerria, reflejando un contacto del animal con *M. bovis* en el campo.

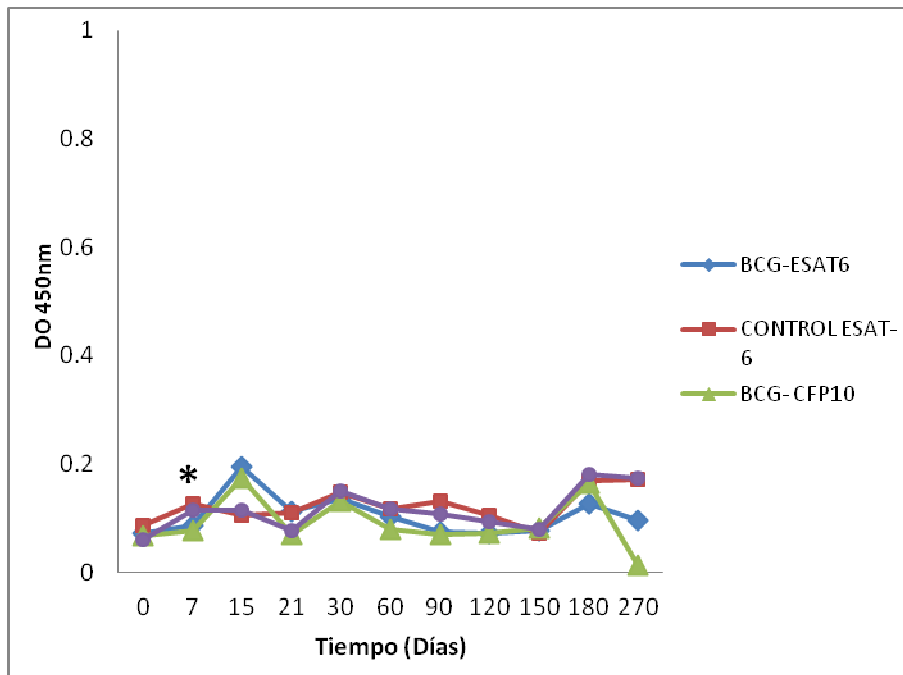
En cuanto a la producción de IFN- $\gamma$  hacia el PPD aviar, se observó un incremento significativo en el grupo vacunado con BCG al día 60 posvacunación ( $DO_{450nm} 0.700 \pm 0.02$ ). En general, los niveles de producción de IFN- $\gamma$  hacia el PPD aviar fueron menores de los observados con el PPD bovino.



**Figura 1.** Promedios de la producción de IFN- $\gamma$  hacia PPDB o PPDA en sangre completa de becerrias vacunadas con BCG y no vacunadas en diferentes tiempos.  
\*Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

En la figura 2, se muestra la producción de IFN- $\gamma$  hacia los antígenos ESAT-6 y CFP-10. En general, la producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 es muy baja en ambos grupos de animales, sin embargo, podemos observar una diferencia significativa al día 7 posvacunación entre ambos grupos ( $P < 0.05$ ), con el grupo control teniendo el valor más alto, debido a que 4 de los 5 animales tienen un valor de  $DO_{450\text{nm}}$  superior a 0.128. Además, podemos percibir un leve incremento al día 180 ( $DO_{450\text{nm}} 0.170 \pm 0.128$ ), que se mantiene al día 270, debido a un incremento de los valores de  $DO_{450\text{nm}}$  de una becerro (Núm. 9532). En el grupo vacunado, se observa un incremento de los valores al día 15, provocado por el valor de  $DO_{450\text{nm}}$  de 2 becerras que alcanzan niveles superiores a 0.1655. Los valores regresan a niveles basales posteriormente. Cabe mencionar que la producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 es baja en comparación con los niveles obtenidos hacia el PPD bovino en el grupo vacunado, mientras que los niveles son similares entre ambos antígenos en el grupo control (figuras 1 y 2).

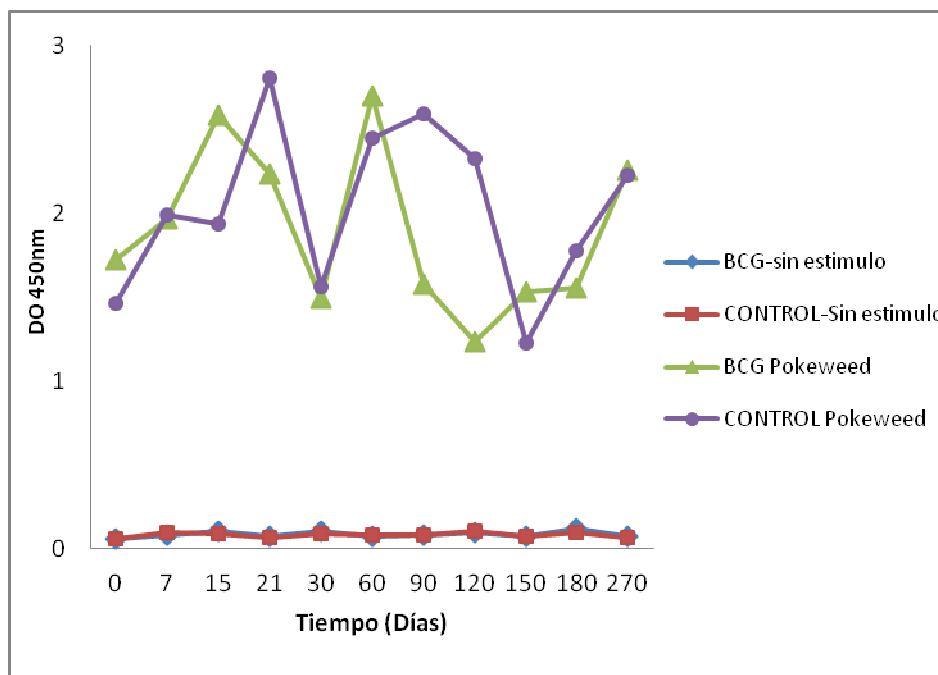
En presencia del antígeno CFP-10, los niveles de IFN- $\gamma$  son bajos durante todo el estudio, en ambos grupos de animales. No obstante, al día 7, se observó una diferencia significativa en el grupo control ( $P < 0.05$ ), debido a que la mayoría de los animales tienen valores de  $DO_{450\text{nm}}$  superiores a 0.109 y un ligero incremento en los días 180 y 270 ( $DO_{450\text{nm}} 0.180 \pm 0.04$  y  $0.174 \pm 0.09$ ) respectivamente, provocado por la becerro # 9532, al igual que lo observado en la producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6, mostrando la circulación de *M. bovis* virulenta en el campo. En el grupo vacunado, podemos observar ligeros picos de producción de IFN- $\gamma$  a los 15 días ( $DO_{450\text{nm}} 0.174 \pm 0.05$ ) y 180 ( $DO_{450\text{nm}} 0.164 \pm 0.04$ ), debido a un incremento general de las  $DO_{450\text{nm}}$  y la producción regresa a niveles basales al día 270. Cabe mencionar que existe una gran similitud entre las curvas de producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 y CFP-10 en ambos grupos de animales.



**Figura 2.** Producción de IFN- $\gamma$  en sangre completa estimulada con los antígenos ESAT-6 o CFP-10 de becerras vacunadas con BCG y no vacunadas en diferentes tiempos.  
\* Diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $P < 0.05$ ).

Los niveles de IFN- $\gamma$  en sangre no estimulada de los 2 grupos de animales se mantuvieron bajos durante todo el estudio. En ambos grupos, se detectaron valores menores a 0.122, indicando que los animales no cursaban por algún proceso infeccioso inespecífico (figura 3).

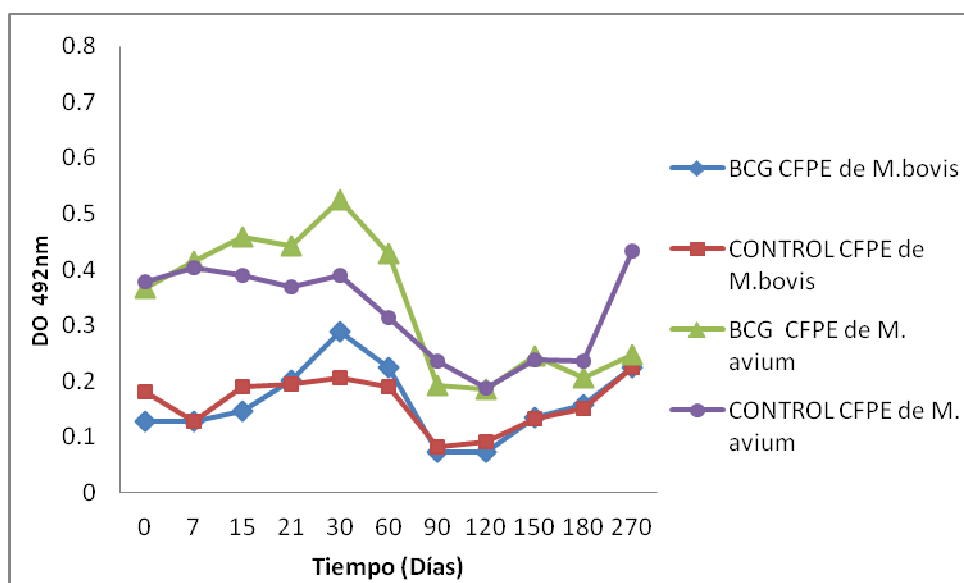
Los niveles de IFN- $\gamma$  en sangre estimulada con el mitógeno Pokeweed fueron altos y muy heterogéneos en ambos grupos durante todo el estudio, demostrando la viabilidad y funcionalidad de las células. Sin embargo, en el grupo vacunado con BCG, los niveles de IFN- $\gamma$  de un animal bajaron drásticamente a partir del día 90, demostrando un problema de salud general. Entre los días 120 y 150, el animal falleció de neumonía (figura 3).



**Figura 3.** Producción de IFN- $\gamma$  en sangre completa no estimulada o estimulada con el mitógeno pokeweed de beceras vacunadas con BCG y no vacunadas en diferentes tiempos.

### 6.3.- Detección de anticuerpos

En la figura 4, se muestran los niveles de anticuerpos hacia el CFPE de *M. bovis* y CFPE de *M. avium* de ambos grupos de animales. No se encontró diferencia significativa entre los grupos durante todo el estudio. Sin embargo, de manera descriptiva, se observó un incremento al día 30 posvacunación ( $DO_{492nm} 0.524 \pm 0.12$ ) en animales vacunados, seguido de un decremento hasta el día 90, que se mantuvo estable hasta el fin del experimento. En el grupo control, se observó un incremento al día 270 ( $DO_{492nm} 0.433 \pm 0.18$ ), debido a una becerca (Núm. 9532) que presentó niveles altos de anticuerpos. En cuanto a los títulos de anticuerpos hacia el CFPE de *M. avium*, no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos, al igual que hacia el CFPE de *M. bovis*. Los niveles de los 2 grupos fueron bajos en general y tienden a subir del día 120 hasta el fin del estudio. Se percibió un ligero pico al día 30 en animales vacunados, similar a lo encontrado hacia el CFPE de *M. bovis*.



**Figura 4.** Promedios de los niveles de anticuerpos IgG hacia el CFPE de *M. bovis* o el CFPE de *M. avium* en bovinos vacunados con BCG y no vacunados en diferentes tiempos.

#### 6.4.- Detección de *Mycobacterium bovis*

##### 6.4.1.- Aislamiento de *Mycobacterium bovis*

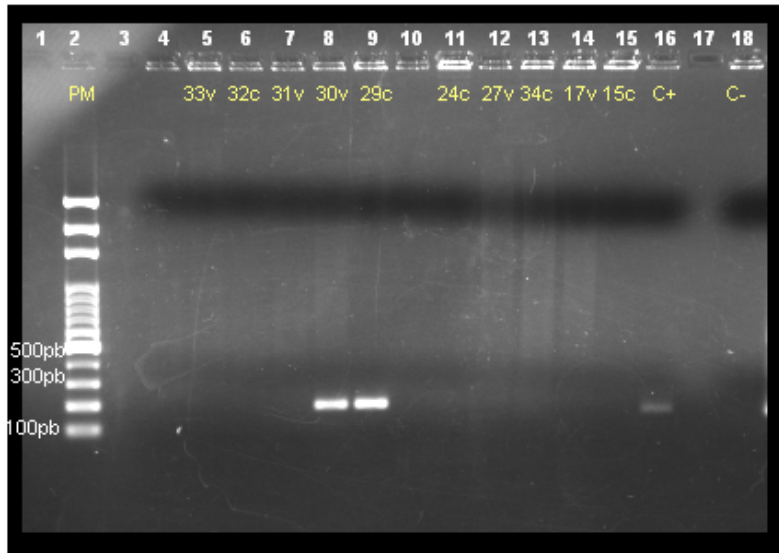
No se logró aislar *M. bovis* en exudados nasales durante el transcurso del estudio.

##### 6.4.2.- PCR simple

Durante el tiempo del estudio, no se obtuvieron resultados positivos mediante la PCR simple del gen MPB70.

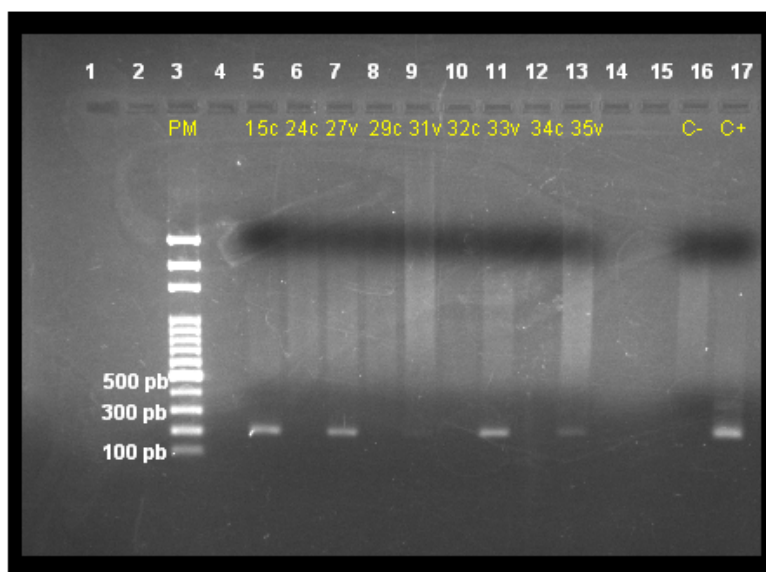
### 6.4.3.- PCR anidada

Utilizando la PCR anidada, se amplificó un fragmento interno de 208 pb de los productos de PCR simple obtenidos del gen MPB70. Al día 0, el gen se detectó en 2 becerras (figura 5), una pertenecía al grupo vacunado con BCG (carril 8) y la otra al grupo control (carril 9).



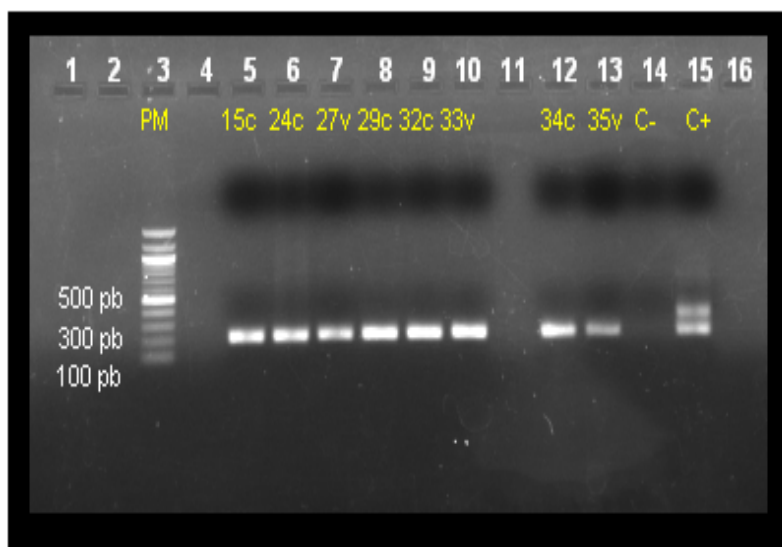
**Figura 5.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de becerras vacunadas con BCG o no vacunadas al día 0 del experimento. Carril 2: peso molecular; Carriles 5-9 y 11-15: muestras de ADN de las becerras (c: grupo control; v: grupo vacunado con BCG); Carril 16: control positivo (*M. bovis*); Carril 18: control negativo (agua).

En la figura 6, están representados los resultados de la PCR anidada del día 90 posvacunación. Podemos observar 4 muestras positivas, tres del grupo vacunado con BCG y una del grupo control.



**Figura 6.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de becerras vacunadas con BCG y no vacunadas al día 90 posvacunación. Carril 3: peso molecular; Carriles 5-13: muestras de ADN de las becerras (c: grupo control; v: grupo vacunado con BCG); Carril 16: control negativo (agua); Carril 17: control positivo (*M. bovis*).

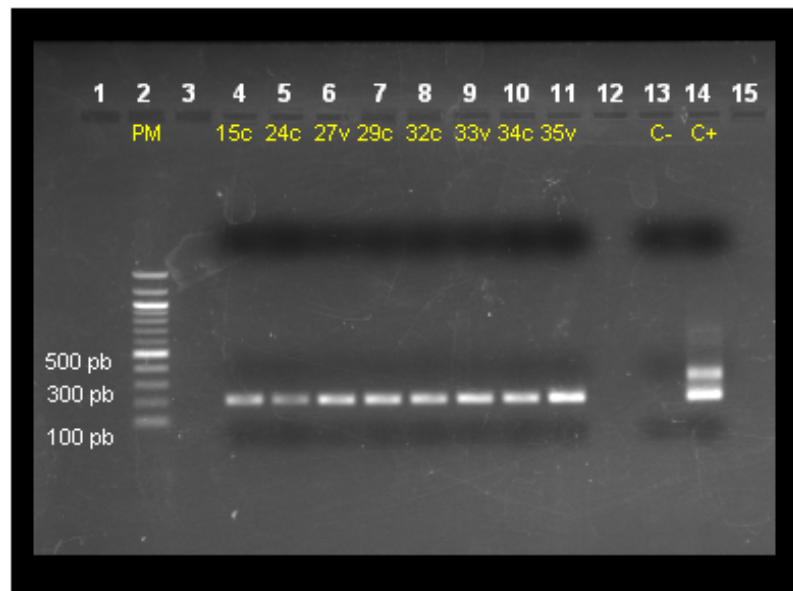
Al día 180, todas las becerras obtuvieron un resultado positivo mediante la PCR anidada del gen MPB70 (figura 7). Cabe mencionar que se observan las muestras de 8 becerras, ya que 2 del grupo vacunado con BCG se murieron.



**Figura 7.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de becerras vacunadas con BCG o no vacunadas al día 180 posvacunación. Carril 3: peso molecular; Carriles 5-10 y 12-13: muestras de ADN de las becerras (c: grupo control; v: grupo vacunado con BCG); Carril 14: control negativo (agua); Carril 15: control positivo (*M. bovis*).



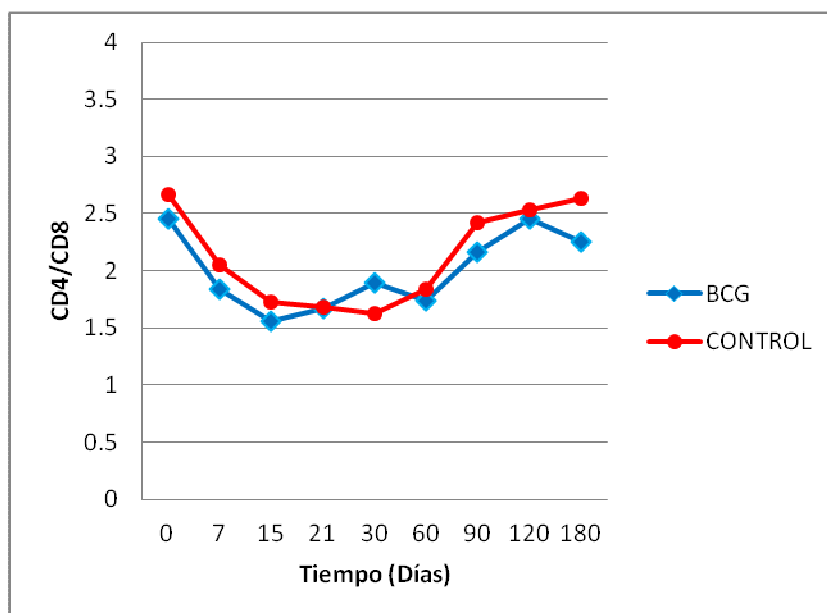
Al día 270 posvacunación, podemos observar que las becerras de ambos grupos de animales obtuvieron un resultado positivo mediante la PCR anidada del gen MPB70 (figura 8), al igual que al día 180.



**Figura 8.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de becerras vacunadas con BCG o no vacunadas al día 270 posvacunación. Carril 2: peso molecular; Carriles 4-11 muestras de ADN de las becerras (c: grupo control; v: grupo vacunado con BCG); Carril 13: control negativo (agua); Carril 14: control positivo (*M. bovis*).

### 6.5.- Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

En cuanto a la proporción de linfocitos T CD4/CD8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas durante el experimento entre los 2 grupos de animales (figura 9). Las curvas son muy similares, con el grupo control teniendo una relación CD4/CD8 más alta casi durante todo el estudio. De manera descriptiva, se observó que entre los días 0 y 15, la proporción de células T CD4<sup>+</sup> baja en ambos grupos de animales y tiende a subir entre los días 21 y 120. En cuanto a la proporción de células T CD8<sup>+</sup>, no se observaron cambios notables, tanto en animales vacunados como en animales no vacunados.



**Figura 9.** Proporción de linfocitos T CD4/CD8 presente en células mononucleares de sangre periférica de becerras vacunadas con BCG o no vacunadas en diferentes tiempos.

## 8. Discusión

La BCG, una cepa viva atenuada de *M. bovis*, constituye la única vacuna humana comercial aprobada en contra de la TB y representa el “estándar de oro” para inducir una respuesta inmune protectora hacia la enfermedad, aunque su protección es variable, tanto en humanos como en bovinos. La BCG posee un excelente patrón de seguridad en humanos e induce niveles significativos de protección en bovinos, por lo cual es una excelente opción de vacuna en contra de la TB en ganado actualmente. Se ha demostrado que la vacuna BCG confiere protección inmunitaria contra *M. bovis* en bovinos, reduciendo la severidad de la infección hasta un 75 %, con una disminución de la carga bacteriana y del grado de lesiones (Vordermeier y cols. 2002). El establecimiento de una respuesta CMI es esencial en la inmunidad protectora contra la TBB, por lo que es deseable que las vacunas sean capaces de estimular y mantener este tipo de inmunidad, en la cual, participan de manera relevante los linfocitos Th1 específicos productores de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2 (García y cols. 2009). En la evaluación de vacunas contra la TBB, la cuantificación de la producción de IFN- $\gamma$ , por las células T específicas, representa un parámetro importante que permite determinar de forma parcial, el establecimiento de la inmunidad protectora.

La importancia del presente estudio radicó, primordialmente, en la vacunación de becerras, bajo un escenario experimental natural, en donde se desarrolla la infección en condiciones de campo no controladas, desafíos no determinados y en el cual participan cepas patógenas de *M. bovis*, micobacterias ambientales, infecciones no micobacterianas y el propio sistema inmune de las becerras. Para lo cual, se evaluó la respuesta inmune de becerras menores de 3 meses de edad, vacunadas con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC de BCG cepa Phipps, expuestas de manera natural a *M. bovis*; la explotación lechera donde se encontraban las becerras tenía una prevalencia de 5 % en becerras y 40 % en vacas en producción al inicio del estudio.

Con el propósito de obtener información relevante sobre la CMI que se genera después de la vacunación con BCG, se realizó una cinética de producción del IFN- $\gamma$ , donde el efecto de la vacuna se manifestó entre los días 21 y 150 posvacunación, correlacionando con lo reportado; en estudios de vacunación de becerras con  $10^4$  o  $10^6$

UFC de BCG cepa Pasteur, encontraron que los niveles de IFN- $\gamma$  sufren un incremento rápido hacia el PPD bovino, con un pico entre la 2 y 4 semanas y una disminución entre la 5 y 8 semanas posvacunación (Buddle y cols. 2005). Se ha reportado que una inducción rápida de IFN- $\gamma$  después de la vacunación por vía subcutánea nos indica que la vacuna será protectora contra la TB. En un estudio, donde la vacunación subcutánea con BCG no indujo protección, no se observó un incremento rápido de la producción de IFN- $\gamma$  hacia el PPD bovino entre las semanas 2 y 4 posvacunación (Buddle y cols. 2002). Por lo cual, podemos deducir, en el presente trabajo, que la vacunación estimuló una respuesta celular protectora en las becerras. La producción sostenida de IFN- $\gamma$  hasta el día 150 nos indica que el sistema inmune de las becerras se encuentran bajo un estímulo constante, probablemente provocado por la presencia de *M. bovis* en el hato. Por otro lado, en este estudio, se observaron diferencias importantes en la producción de IFN- $\gamma$  hacia el PPD bovino, entre el grupo de becerras vacunadas con BCG y el grupo control, de igual manera al ser comparados con los inducidos hacia el PPD aviar, indicando que la producción de IFN- $\gamma$  es inducida por la vacunación con BCG y es específica de los antígenos de *M. bovis*.

La vacunación constituye un modelo apropiado para el control de la TBB. Sin embargo, la vacuna BCG compromete la especificidad de la prueba diagnóstica de la tuberculina, por lo cual no es utilizada para el control de la TBB. La complejidad de las proteínas presentes en la tuberculina y la presencia de componentes compartidos con la BCG y micobacterias ambientales orientaron las búsquedas hacia antígenos específicos, característicos de *M. bovis*. La identificación de 2 antígenos, ESAT-6 y CFP-10, presentes en las micobacterias del CMTB y ausentes de la BCG y micobacterias no tuberculosas, permitió incrementar la especificidad del diagnóstico, diferenciando animales infectados de animales vacunados o sensibilizados con micobacterias ambientales (Rua-Domenech y cols. 2005; Garbaccio y cols. 2006; Behr 1999; Vordermeier y cols. 2001). En el presente trabajo, los ligeros incrementos en la producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 y CFP-10 encontrados tanto en animales vacunados como no vacunados, son indicativos de que algunas becerras estuvieron en contacto con micobacterias patógenas. Los niveles de IFN- $\gamma$  hacia ambos antígenos son casi siempre más altos en el grupo control, confirmando que la vacuna no sensibilizó los animales hacia las 2 proteínas. Una

respuesta fuerte y sostenida hacia ESAT-6 y CFP-10 de una becerro del grupo control nos permitió sospechar que el animal estaba infectado, ya que se ha reportado que los niveles de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 correlacionan con el grado de la patología en TBB experimental (Vordermeier y cols. 2002). En general, las curvas de producción de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 y CFP-10 son muy similares en ambos grupos de animales, lo que nos permite utilizarlos juntos o solos para diferenciar animales infectados con *M. bovis* de vacunados con BCG.

El efecto de la vacunación sobre el sistema inmune en becerros recién nacidas no ha sido bien descrito. La protección conferida por la vacunación temprana es muy crítica por la gran diversidad y cantidad de patógenos potenciales dentro del entorno del becerro. Se ha mencionado que el sistema inmune de becerros recién nacidos es completamente inmunocompetente, aunque no sensibilizado. Al nacer, el número de linfocitos B es aproximadamente 30 % del encontrado en animales adultos y alcanza niveles adultos alrededor de 20 días posparto. La CMI es deficiente en becerros recién nacidos. Sin embargo, alcanza niveles similares a los de adultos a 2 semanas de edad (Osburn y cols. 1974; Senogles y cols. 1978). Por lo tanto, los becerros de 1 mes poseen un sistema inmune maduro. Para este estudio, se utilizaron becerros con un promedio de tres meses de edad, con un sistema inmune maduro, como lo indicaron las altas producciones de IFN- $\gamma$  frente al mitógeno Pokeweed, con valores de  $DO_{450nm}$  superior a 1.2, aunque estas fueron heterogéneas, en ambos grupos de animales. El empleo del mitógeno en la prueba de detección de IFN- $\gamma$  nos permitió verificar tanto la madurez del sistema inmune como la viabilidad y funcionalidad de las células. Además, permitió detectar animales con problemas de salud, ya que los valores bajan de manera drástica, cuando el animal está enfermo, cerca de fallecer.

*M. bovis* es una bacteria intracelular facultativa y la idea de que los anticuerpos puedan tener un papel protector generalmente es rechazada, ya que una vez que el bacilo se encuentra dentro del macrófago, su inaccesibilidad impide a los anticuerpos ejercer su acción y el establecimiento de una inmunidad humoral protectora. Se considera que los mecanismos de defensa del hospedero contra patógenos intracelulares son mediados por la inmunidad celular. Consecuentemente, la mayoría

de las vacunas que se desarrollan contra la TB, intentan conferir protección por estimulación de la inmunidad celular. La reevaluación de los aspectos relacionados con la protección mediada por los anticuerpos frente a la infección por *M. bovis* y la búsqueda de nuevas alternativas parece sumamente interesante teniendo en cuenta las nuevas evidencias del papel protector de los anticuerpos frente a otros microorganismos intracelulares. El estudio de bacterias intracelulares, ha proporcionado ejemplos que evidencian la protección mediada por los anticuerpos. En un estudio, mostraron que en la infección causada por la bacteria intracelular obligada *Ehrlichia chaffensis*, los anticuerpos específicos podrían mediar la protección contra el patógeno, bloqueando la entrada a las células o promoviendo la expresión de citocinas proinflamatorias (Lee y cols. 1997; Winslow y cols. 2000). Otro ejemplo interesante es la vacuna de subunidades de polisacáridos de *Salmonella typhi*, donde la protección hacia este patógeno intracelular facultativo es mediada por anticuerpos (Glatman-Freedman. 2003).

La producción de anticuerpos en las diferentes etapas de la TBB es muy variable y generalmente niveles altos se detectan en etapas avanzadas de la enfermedad, asociados a un estado anérgico del animal (Garibay 2005). En este trabajo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos hacia los CFPEs de *M. bovis* y *M. avium* en ambos grupos de animales, lo que correlaciona con lo reportado. Buddle y col. 2003 evaluaron la respuesta inmune celular y humoral de animales vacunados y revacunados con una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC de BCG Pasteur y encontraron que no existe una síntesis de anticuerpos después de la vacunación. Los altos títulos de anticuerpos hacia el CFPE de *M. bovis* observados entre los días 0 y 60 son probablemente debido a la prueba de la tuberculina que se aplicó 10 días previos a la vacunación, ya que se ha reportado que esta prueba incrementa los niveles de anticuerpos en animales controles, no vacunados, ni infectados (Lyashchenko y cols. 2004). Al fin del estudio, una becerro del grupo control (Núm. 9532) mostró niveles altos de anticuerpos hacia el CFPE de *M. bovis*. Además, el animal mostró una producción alta de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 y CFP-10, lo que permitió sospechar que el animal estaba infectado. En un estudio en donde evaluaron los sueros de 560 animales infectados o no infectados por *M. bovis* mediante la prueba de ELISA, utilizando el PPD

bovino como antígeno, detectaron niveles de anticuerpos similares en ambos grupos de animales, demostrando la pobre eficacia de la prueba en la detección de animales infectados. Sin embargo, altos títulos (6 %) se observaron en algunos animales del grupo infectado (Amadori y cols. 1998). En base a eso, podemos concluir que la detección de anticuerpos mediante ELISA podría servir como prueba complementaria, junto con la prueba de la tuberculina y/o la prueba de detección de IFN- $\gamma$ , en la detección de animales infectados.

La prueba de la tuberculina es caracterizada por generar una respuesta de hipersensibilidad retardada, que permite medir la inmunidad celular. Actualmente, sigue siendo la prueba de inmunodiagnóstico más aplicada como herramienta de vigilancia para la TBB después de la cual, los animales reactivos deben ser sacrificados. Sin embargo, en países en desarrollo como México, en donde el sacrificio de los animales reactivos es costoso, la aplicación de una vacuna como estrategia de control de la enfermedad representa una solución atractiva. La BCG representa la única vacuna comercial disponible en humano y ha sido ampliamente probada en ganado en contra de la TB. No obstante, el impedimento de la introducción de la BCG como vacuna en bovinos se debe a que sensibiliza los animales a la prueba de la tuberculina, lo que invalida el diagnóstico.

En este trabajo, se realizó la prueba de la tuberculina cervical doble comparativa, 10 días antes de la vacunación, para confirmar el estado libre de TB de los animales y 270 días posvacunación. Ningún animal reaccionó a la prueba de la tuberculina 10 días prevacunación. Sin embargo, a los 270 días, un animal del grupo control (Núm. 9532) fue reactor, confirmando que el animal está infectado, ya que fue positivo a las pruebas de detección de IFN- $\gamma$  hacia ESAT-6 y CFP-10, ELISA y a la PCR anidada. En cuanto al grupo vacunado, no se presentó ningún animal positivo a los 270 días posvacunales, demostrando que la vacunación con BCG no siempre interfiere con la prueba de la tuberculina como se ha reportado. La falta de respuesta en la prueba de la tuberculina después de la vacunación podría ser debida a la cepa utilizada, ya que en la mayoría de los estudios, en donde encuentran una reacción positiva a la prueba de la tuberculina después de vacunar con BCG, utilizan las cepas Pasteur o Danesa

(Buddle y cols. 1995; Buddle y cols. 2003; Whelan y cols. 2011). Un estudio realizado con diferentes cepas de BCG en ratones, ha revelado que la cepa Phipps provoca respuestas de hipersensibilidad retardada moderadas. El mismo estudio demuestra que la vacunación con cepas de BCG de menor protección es asociada con una fuerte inflamación pulmonar y corresponde a fuertes respuestas de hipersensibilidad retardada, mientras que las cepas que procuren un nivel alto de protección inducen respuestas de hipersensibilidad retardada bajas (Castillo y cols. 2006). Por lo tanto, la vacunación de becerros con la cepa BCG Phipps se podría considerar para el control de la TBB, ya que no interfiere en la prueba diagnóstica de la tuberculina.

La inmunidad hacia infecciones micobacterianas es dependiente de las interacciones entre las células T y los macrófagos. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados secretan IFN- $\gamma$ , promoviendo los mecanismos microbicidas de los macrófagos, mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos eliminan las células infectadas. Los cambios de esas dos subpoblaciones de linfocitos T han sido reportados en animales infectados o vacunados con BCG, indicando su implicación en la respuesta inmune anti-micobacteriana. En este estudio, no se observaron cambios significativos de esas subpoblaciones en animales vacunados. Se ha reportado un incremento de células T CD4<sup>+</sup> alrededor del día 20 y ningún cambio notable en las células T CD8<sup>+</sup> después de la infección de becerros con  $7 \times 10^6$  UFC de *M. bovis* (Kennedy y cols. 2002). En un estudio de Pollock y cols 1996, utilizando  $1 \times 10^7$  UFC de una cepa virulenta de *M. bovis*, encontraron que las células T CD4<sup>+</sup> incrementan del día 23 al día 44, seguido de un incremento de las células T CD8<sup>+</sup> hasta el fin del estudio que duró 95 días. En otro estudio, en el cual vacunaron animales con  $8 \times 10^6$  UFC de BCG Danesa, no se observaron cambios de esas 2 subpoblaciones en las 3 primeras semanas. Las células T CD4<sup>+</sup> se incrementaron significativamente entre las semanas 4 y 6, mientras que el incremento de las células T CD8<sup>+</sup> se percibió hasta la semana 8 y las 2 subpoblaciones regresaron a un nivel de pre-vacunación a la semana 10 (Buza y cols. 2009). El uso de diferentes dosis, cepas y vías de inoculación de las micobacterias (subcutánea o intranasal), además de la edad de las becerros, ya que en la mayoría de los estudios utilizan animales mayores a 6 meses de edad y los diferentes niveles de control de las condiciones del experimento, son probablemente factores que provocan diferencias



entre cada estudio. La disminución de las células T CD4<sup>+</sup> que se observa en los primeros 15 días del experimento podría reflejar cambios naturales edad-dependientes, ya que ocurre en ambos grupos de animales. Al inicio del experimento, las becerras tenían alrededor de 3 meses de edad y los estudios de cinética de subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de becerras demostraron que los porcentajes de células T CD4<sup>+</sup> bajaban significativamente entre 30 y 120 días de edad, mientras que no se notaban cambios en la distribución de las células T CD8<sup>+</sup> (Wilson y cols. 1996; Kampen y cols. 2006), correlacionando con los resultados obtenidos y confirmando que la vacuna no indujo cambios en las 2 subpoblaciones.

El aislamiento por cultivo bacteriológico convencional representa la prueba de oro para la detección de *M. bovis* en muestras clínicas como tejidos, secreción nasal, leche y sangre. Sin embargo, en este estudio, no se logró aislar *M. bovis* de las secreciones nasales mediante el cultivo. No obstante, existen pruebas que ofrecen otras ventajas en cuanto a la sensibilidad y rapidez como la PCR, de la cual se han desarrollado protocolos para la identificación de *M. bovis*. Sin embargo, cuando se realizó la PCR simple del gen MPB70, no se logró amplificar el gen. Un número bajo de bacilos presentes en la muestra, los procesos de descontaminación y la excreción intermitente de la bacteria fueron probablemente algunos factores que impidieron tanto el aislamiento bacteriológico como la amplificación del gen por PCR simple.

La excreción por el tracto respiratorio y la inhalación de *M. bovis* son consideradas como las vías principales de transmisión de la infección entre bovinos. Un estudio con becerros experimentalmente infectados con *M. bovis* indica que después de un cierto periodo posterior a la inoculación (80-100 días), se puede aislar la micobacteria consecutivamente de las secreciones nasales durante un tiempo (10-60 días posinfección), antes de que la excreción se vuelva intermitente (Neill y cols. 1988a; 1989; 1991). Los periodos entre las excreciones varían de 6 a 25 semanas. La cantidad de bacilos y el periodo antes de que empiece la excreción parecen ser inversamente relacionados con la dosis de infección. Evidencias de la excreción se ha demostrado en estudios de campo en donde más del 20 % del ganado tuberculoso tenían la bacteria en fosas nasales (McIlror y cols. 1986; Neill y cols. 1988a). Además, se ha reportado el

aislamiento de *M. bovis* en secreciones nasales de animales infectados experimentalmente, los cuales eran negativos a la prueba de la tuberculina, pero positivos a ensayos *in vitro* hacia antígenos micobacterianos (Neill y cols. 1992).

El empleo de la PCR anidada, que amplifica los productos de la PCR simple del gen MPB70, permite incrementar la sensibilidad del diagnóstico. Como sucedió, en un estudio en el cual analizaron la PCR anidada del gen MPB70, obtuvieron una especificidad de 77 % y una sensibilidad de 100 %, mientras que con la PCR simple del mismo gen, la especificidad fue de 88 % y la sensibilidad de 53 %. Además, observaron una buena concordancia de la prueba, tanto con la histopatología como con los cultivos de *M. bovis* (Estrada y cols. 2004). En el presente trabajo, se logró detectar *M. bovis* mediante esa prueba en los diferentes muestreos en los que se obtuvieron muestras de secreciones nasales. El número de becerras positivas a la prueba incrementó a cada muestreo, hasta obtener resultados positivos para todos los animales en los últimos 2 muestreos, indicando que *M. bovis* circula en el hato y que con el tiempo, las probabilidades de que los animales entren en contacto con la micobacteria se incrementan, sobre todo en un hato de alta prevalencia. Sin embargo, el hecho de que los animales tengan la bacteria en las secreciones nasales, no indica que el animal este infectado, según los resultados negativos de las otras pruebas que se efectuaron (tuberculina, IFN- $\gamma$  y ELISA), con la excepción de una becerro del grupo control, positiva a todas las pruebas al final del estudio.

## 9. CONCLUSIONES

- La vacunación con BCG cepa Phipps, empleado a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC, ocasionó una respuesta inmune moderada, en becerras menores a tres meses de edad:
  - Indujo una respuesta mediada por células en sangre periférica, mediante la producción de IFN- $\gamma$  específica hacia el PPD bovino.
  - No indujo una respuesta humoral mediada por anticuerpos hacia *M. bovis*.
  - No provocó cambios en las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.
  - No sensibilizó los animales a la prueba de la tuberculina hacia el PPD bovino.
- Por lo tanto, la vacunación con a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC de BCG cepa Phipps, en becerras de unos meses de edad, confiere protección mediante la producción de IFN- $\gamma$ , citocina esencial en la respuesta inmune hacia *M. bovis*, sin interferir con la prueba diagnóstica de la tuberculina. Por lo cual, se podría considerar como una estrategia en el control de la TBB en hatos de altas prevalencias.
- La detección de *M. bovis* mediante el cultivo bacteriológico y la PCR simple del gen MPB70 no representan métodos adecuados para el diagnóstico de la TBB, mientras que la PCR anidada resultó más efectiva para detectar la micobacteria, sin asegurarnos que el animal este infectado, por lo cual, son necesarios más estudios para determinar la significancia de los resultados obtenidos en el presente estudio.

## 10.- ANEXO

### Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
°C	Grados centígrados
CFP-10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 KDa
CFPE	Extracto proteínico de filtrado de cultivo
cm	Centímetros
CMI	Inmunidad mediada por células
CMTB	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado por enzimas
ESAT-6	Antígeno 6 de secreción temprana
Fg	Femtogramos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HT	Hipersensibilidad tardía
IDR	Intradermorreacción
IFN-γ	Interferón-gamma
IL	Interleucina
IP-10	Proteína inducida por IFN-γ
IS6110	Secuencias de inserción específica del complejo <i>M. tuberculosis</i>
KDa	Kilodaltones

L	Litros
LAM	Lipoarabinomanano
mAGP	Ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MCH	Complejo mayor de histocompatibilidad
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MIP-1 $\alpha/\beta$	Proteína inflamatoria de macrófagos
$\mu$ l	Microlitros
ml	Mililitros
MPB70	Proteína de secreción inmunogénica principal de <i>M. bovis</i>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio
NK	Células asesinas naturales
nm	Nanómetros
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa
PBA	PBS-Albumina fetal bovina-Ázida de sodio
Pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PPD	Derivado proteico purificado
PWM	Mitógeno Pokeweed o <i>fitolaca americana</i>
RD	Regiones de diferencia
rpm	Revoluciones por minuto
TB	Tuberculosis
TBB	Tuberculosis Bovina
TBH	Tuberculosis Humana

TLR	Receptores tipo Toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa
UI	Unidades internacionales
UFC	Unidades formadoras de colonias
WC1	Workshop Cluster 1

## Soluciones

### SOLUCIÓN DE FIJADO

Solución de carbonatos 0.06 M pH 9.6  
 Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 3.8 gr/L  
 Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.93 gr/L  
 Agua destilada 1 L

### SOLUCIÓN DE LAVADO

Solución de fosfatos (PBS) pH 7.4 y Tween 20 al 0.1 %  
 Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1 gr/L  
 Fosfato sódico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32 gr/L  
 Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 gr/L  
 Tween 20 0.5ml/L  
 Agua destilada 1 L

### SOLUCIÓN BLOQUEADORA

Leche descremada en PBS y Tween 20 al 0.1%  
 Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1 gr/L  
 Fosfato sódico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32 gr/L  
 Cloruro de sodio (NaCl) 8.5 gr/L  
 Tween 20 0.5ml/L  
 Leche descremada en polvo 1.5 gr/100ml  
 Agua destilada 1L

### **SOLUCIÓN DE REVELADO**

Solución de citratos pH 4.5

Acido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) 4.6 gr/L

Citrato trisódico ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) 7.4 gr/L

Agua destilada 1L

Agregar al momento de su empleo:

Ortofenildiamina 0.004gr/10ml

Agua Oxigenada ( $H_2O_2$ ) 4  $\mu$ l /10 ml

### **Solución lisis pH 7.2-7.4**

8.28 g  $NH_4Cl$

1 g  $KHCO_3$

0,037 g EDTA

100 ml agua destilada

### **PBS-albumina 0.2%-ázida de sodio 0.2%**

100 ml PBS

0.2 g albumina bovina

0.2 g ázida de sodio

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Vallecillo AJ, Gutierrez PJA, Suarez GF, McNair J, Cataldi A, Espitia C, Andersen P, Pollock JM. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalence of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:4326-4335.
2. Amadori M, Tameni S, Scaccaglia P, Cavirani S, Archetti IL, Quondam Giandomenico R. Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36:566-568.
3. Barrera RML, Drago SME, Pérez RJ, Zamora CA, Gómez AA, Sainz ETR, Mendoza PF. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 2004;17:42-55.
4. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Sci.* 1999;248:1520-1523.
5. Bieta F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guillotea L. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* 2005;36 : 411–436.
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
7. Brown RM, Cruz O, Brennan M, Gennaro ML, Schlesinger L, Sheiky YA, Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacilli Calmette-Guerin vaccination. *J. Infect. Dis* 2003; 187:513.517.
8. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine.* 2002;20:1126-1133.
9. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy AR, Heslop J. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. *Res.Vet. Sci.* 1995;59:10-16.
10. Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LAL, de Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. *Infec. Immun.* 2003;71:6411-6419.
11. Buddle BM, Bryce M, Wedlock ND, Denis M, Skinner AM. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 108: 45–51.
12. Buddle BM, Wedlock DN, Denis M. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. *Vet. Microbiol.* 2006;112:191-200.
13. Buza J, Kiros T, Zerihun A, Abraham I, Ameni G. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacilli Calmete-Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009;130:251-255.
14. Calderon MN, Parra LC, Alfonso R, Barato P, Giraldo D, Pinto LM, Patarrago MA. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen immunogenicity in Owl monkey. *Nova Pub. Sci.* 2006;4:14-26.



15. Campo mexicano 2010  
[http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Peuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovlech.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Peuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/bovlech.pdf)
16. Castillo NJL. Citometría de flujo en la evaluación de potencial de membrana y viabilidad celular de *Helicobacter pilory*. Facultad de ciencias microbiológicas. Magister en ciencias 2005.
17. Castillo NJL, Kawaguchi PF, Madariaga BJ, Venegas RO, Lecannelier FE, Ocampo RS, Castillo NM. Aspectos que afectan el análisis de contenido de ADN por citometría de flujo. Rev. Méd. Chile. 1999; 127: 1385-1397.
18. Castillo RAI, Castañón AM, Hernández PR, Calva JJ, Sada DE, López VY. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. Infec Immun. 2006;74:1718-1724.
19. Cheong KH, Ho PY, Ahn J, Ray WW, Palmer VM, Jo HM, Barrington G, Mosaad AA, Taek PK, Kyung JW, Yeong HI, Nae CS, Jae SS, Davis CW. 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. Clinic Microbiol. 2005;43:4498-4506.
20. Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol. 2002; 2919-2928.
21. Cousins VD, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction from rapid diagnostic of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1992;30:255-258.
22. Daniel W. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. México D.F.: UTEHA Noriega Editores, 1998.
23. De Hoyos V. Métodos para la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos. Tesis de Licenciatura Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencia Bacteriología Bogotá. 2009.
24. De Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. Infect. Immun. 2005; 73:6711-20.
25. Díaz OF, García CL, Estrada CC, Vega LMA, Banda RV, Arriaga DC. Respuesta inmune humoral de cobayos hacia componentes proteicos de micobacterias. Tec. Pec. Méx. 2002;40:157-164.
26. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriaga DC, González SD, Estrada SC. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. Vet. Méx. 2003;34:14-26.
27. Díaz OF, Jaramillo ML. Tuberculosis bovina: Respuesta inmunitaria, patogenia e implicaciones diagnósticas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, Cuajimalpa, México D.F. 2010.
28. Espinoza AA. Evaluación de la vacuna BCG Phipps recombinante en becerras recién nacidas en y un hato con prevalencia alta en tuberculosis. Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista Cuautitlán Izcalli Edo Méx. 2008.

29. Estrada CC, Díaz OF, Díaz AC, Villegas NS, Pérez GR, González DS. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet. Mex. 2004;35:225-236.
30. Estrada SC, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. Vet. Méx. 2001;32:207-211.
31. Garbaccio, S. Diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de la tuberculosis bovina temas de zoonosis III. Asociación Argentina de Zoonosis. 2006;25:222-226.
32. García MA, Sarmiento M, Acosta A. La inmunidad antituberculosa y su aplicación en el desarrollo de candidatos vacunales. VacciMonitor 2009;18:31-37.
33. Garibay EA. Defectos en la expresión de las proteínas de membrana que predisponen a una alta susceptibilidad a la tuberculosis. Rev Edu Bioq. 2005;24:54-58.
34. Garnier TK, Eglmer JC, Camus N, Medina H, Mansoor M, Pryor S, Duithoy S, Griondin C, Lacroix C, Monsemp S, Simon BH, Atkin J, Doggett R, Mayes L, Keating PP, Wheeler J, Parktill BC, Barell ST, Cole SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl. Acad. 2003;100:7877-7882.
35. Glatman-Freedman. Advances in antibody mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. Immunol. Med. Microbiol. 2003; 39:9-16.
36. González SD, Díaz OF, Jaramillo ML, Pérez GR, Padilla UJ, Santillán FMA, Arriaga DC, Bojorquez NL. Evaluación de diferentes inmunógenos contra la tuberculosis bovina mediante la presencia de lesiones a la necropsia. Vet. Méx. 2007M;38:271-284 .
37. González SD, Díaz OF, Jaramillo ML, Santillán FMA, Erazo GR, Arriaga DC. Detección y descripción anatomopatológica de tuberculosis en una colonia de Ankole-Watusi. Téc. Péc. Méx. 200;45:101-109.
38. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eglmeier Col St. Identification of variable regions in the genome of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol. Microbiol. 1999;32:643-655.
39. Gorocica P, Jiménez M, Garfías Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Méx . 2005;18:142-153.
40. Hamblin S. Anne. Cytokines and cytokine receptors. Second edition, IRL PRESS, London. 1993.
41. Hope JC, Thom ML, McAulay M, Mead E, Vordermeier HM, Clifford D, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. Clin Vaccine Immunol. 2011;18:373-379.
42. Jiménez M, Baez R, Linares M, Chavéz R, Lascurain R, Zenteno E. Avances en el estudio de los mecanismos de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. Rev Inst Nat Enf Resp Méx. 2001;41:39-48.
43. Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK Lund A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. Vet. Immunol. Immunopathol. 2006.113:53-63.

44. Kennedy HE, Welsh MD, Bryson DG, Cassidy JP, Forster FI, Howard CJ, Collins RA, Pollock JM. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells. *Infect. Immun.* 2002;70:1488-1500.
45. Kubica T, Agzamova R, Wright A, Rakishev G, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* isolates with *M. tuberculosis* specific characteristics. *Emerg Infect.* 2006;12:763-765.
46. Laborín LR, Livier M, Rosales E, Fedórovich AL. Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:22-26.
47. Laguado J. Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología veterinaria y agricultura. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 2007;12:1077-1095.
48. Latini O, Canal A, Ferrara O. Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Arch. med. vet.* 1997;9:197-204.
49. Laurens AH, Van Pinxteren LA, Pernille R, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 2000;7:155-160.
50. Lee E, Rikihisa Y. Anti-*Ehrlichia chaffeensis* antibody complexed with *E. chaffeensis* induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of I $\kappa$ B- $\alpha$  and activation of NF- $\alpha$ B. *Infect Immun.* 1997;65:2890-2897.
51. Liebana E, Aranaz A, Mateos M, Villafranca E, Gómez M. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue sample by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:33-36.
52. López MLM, Díaz OF, Vallecillo MJ, Esquivel SH, Gutiérrez PJA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica; De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 2006;48:173-178.
53. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM. Association of tuberculin-Boosted antibody responses with pathology and cell-mediated immunity in cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and infected with *M. bovis*. *Infect. Immun.* 2004;72:2462-2476.
54. Maciąg A, Piazza A, Riccardi G, Milano A. Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol* 2009;9:1-11.
55. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en Tuberculosis Bovina y Brucelosis. SAGAR. Comisión para la erradicación de la TBB y Brusela (CONETB) octubre 1998.
56. McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet. Rec.* 1986; 118:718-721.
57. Milián SF, Harris B, Arriaga DC, Thomsen B, Stuber T, González SD, Álvarez OG, Santillán FMA, Morales LA, Estrada CC. De Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2010;4:403-41.
58. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test, *Vet. Microbiol.* 1994;40:111-124.

59. Morales LA, Peñuelas UK, Álvarez OG, Martínez VI, Maldonado J, Mendoza DG, Milián SF. Correlación entre PCR en exudado nasal y la reacción de tuberculina para la detección de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos. Rev. Sci, 2008;1:17–21.
60. Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. Vet. Rec. 1992; 131:45-47.
61. Neill SD., Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. Vet. Rec. 1988a; 123:340-343.
62. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. Vet. Rec. 1989; 124:269-271.
63. Neill SD, O'Brien JJ, Hanna J. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Vet. Microbiol. 1991; 28:103-109.
64. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis. Pub Med. 2001; 81:79-86.
65. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 1994; 40:41-52.
66. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR). <http://www.sagar.gob.mx/user/Conasag/nomtb.htm>.
67. OPS-OMS. Preparación y estandarización del derivado proteínico purificado (PPD) de la tuberculina. Nota Técnica N° 17. Buenos Aires, Argentina: Centro Panamericano de zoonosis,OPS-OMS,1972.
68. Osburn BI, Stabendfeldt GH, Ardens AA, Trees C, Saweyer M. Perinatal immunity in calves. J Am Vet Med Assoc 1974;164:295-298.
69. Padilla J. Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en bovinos inmunizados con proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis*, inmunomodulados con interferón-gamma y BCG contra la tuberculosis bovina. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista UNAM 2004.
70. Payeur JB, Jamagin JL, Marquart JG, Schaper LA, Martín BM. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories USDA 1993;1-187.
71. Periodismo de Ciencia y Tecnología. La tuberculosis de las vacas en México. Octubre 2000.  
<http://www.invdes.com.mx/antiores/Octubre2000/htm/vaca.html>
72. Pollock JM, Welsh , McNair. Immune response in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. Vet. Immunol. immunopathol. 2005; 108:37-43.
73. Pollock JM, Welsh M. The WC1<sup>+</sup> T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 2002;89:169-176.
74. Pollock JM, Pollock DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard D, Neill SD, Mackie DP. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. Immunol. 1996;87:236-241.
75. Pollock MJ, Rodgers DJ, Welsh DM, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. Vet. Microbiol. 2006;112:141-150.
76. Prat AC, Dominguez BJ, Ausina RV. *Mycobacterium bovis*. 2001 p.1-7
77. Raja A. Immunology of tuberculosis. Med Res. 2004;213-232.

78. Ramírez CCI, Santillán FMA, Arriaga DC, Arellano RB, Morales AF. Empleo de una PCR-multiplex para diferenciar caprinos vacunados con *M. bovis* BCG de infectados con *M. bovis* de campo. *Téc Pec Méx.* 2004;42:419-428.
79. Razo MD, García NJ, Llorente L. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. Determinación de intervalos de referencia en población adulta sana de la ciudad de México. *Patología-México.* 1996;43:21-26.
80. Rittacco 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. *J. Vet. Med. B.* 1990;37:19-27.
81. Rivera P, Giménez JF. La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *Red Vet.* 2010;11:1695-7504.
82. Rodríguez SIP, Barrera SHA. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL.* 2004;7:323-335.
83. Romero TA, Arriaga DC, Guevara VJ, García SJA, Torres LRA, Estrada CC. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. *Vet Méx.* 2006;37:137-143.
84. Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin test, interferon assay and other ancillary diagnostic technique. *Vet. Sci.* 2005; 8:190-210.
85. Rugeles LMT, Patiño GJP, Montoya GJC. Inmunología una ciencia Activa. ed. Universidad Antioquia Facultad de Medicina. 2009;2° ed.39.
86. Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase Chain Reaction to Detect *Mycobacterium tuberculosis* in Histologic Specimens. *Am J Respir Crib Care Med.* 1998;158:1150-1155.
87. SAS Procedures Guide; Statistics, (release 6.03) 1998 SAS Institute, Inc, Cary N.C.
88. Senogles DR, Muscoplat CC, Paul PS. 1978. Ontogeny of circulating B lymphocytes in neonatal calves. *Res Vet Sci,* 25:34-36.
89. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), 2010.
90. Silva E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 2001;78:111-117.
91. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16:463-496.
92. Smyth AJ, Welsh MD, Girvin RM, Pollock JM. *In vitro* responsiveness of  $\gamma\delta$  T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: predominant involvement of WC1<sup>+</sup> cells. *Infect. Immun.* 2001;69:89-96.
93. Sopp P, Howard CJ and Hope JC. Flow cytometric detection of gamma interferon can effectively discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated cattle from *M. bovis*-infected cattle. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2006;13:1343-1348.
94. Toledo OP, Milian SF, Santillán FMA, Ramírez CIC. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Vet. Méx.* 1999.;30:227-229.
95. Torres LR. Correlación histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina con la presencia de *Mycobacterium bovis* analizada mediante la prueba de reacción en cadena de la polimeras (PCR). Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista Cuautitlán Izcalli Edo Mèx. 2005.

96. Van Soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1995.
97. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2001; 8:571-578.
98. Vordermeier HM, Chamber MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6 specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immunol.* 2002;70:3026-3032.
99. Vordermeier HM, Chambers AM, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson BM. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis cattle. *J. Vet Sci.* 2002; 171:229- 244.
100. Vordermeier HM, Cockle PC, Whelan A, Rhodes S, Palmer N, Bakker D, Hewinson RG. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:675-682.
101. Vordermeier HM, Goodchild A, Clifton- Hadley R, De la Rua R. The interferon-gamma field trial: background, principles and progress. *Vet. Rec.* 2004;155:37-38.
102. Vordermeier M, Glyn HR, Development of cattle TB vaccines in the UK, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 112: 38-48.
103. Ward JC. Tuberculosis bovina. Manual de Ganadería Doble Propósito. 2005;4:364-369.
104. Waynew D, Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 2008 ed. Limusa México.
105. Wedlock ND, Denis M, Vordermeier MH, Hewinson GR, Buddle MB. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN $\gamma$  post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunop.* 2007;118:50-58.
106. Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, Bryson DG, Pollock JM. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, 2005;114:101–111.
107. Whelan AO, Coad M, Upadhyay BL, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. *Vaccine.* 2011;29: 5453-5458.
108. Wiker HG, Lyashchenko KP, Aksoy MA, Lightbody KA, Pollock JM, Komissarenko VS, Bobrovnik OS, Kolesnikova NI, Leonido M, Gennaro LM, Harboe M. Immunochemical Characterization of the MPB70/80 and MPB83 Proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun.* 1998;66:1445-1452.
109. Wilson RA, Zolnai AP, Rudas LV, Frenyo. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves and adult bovine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 53:49–60.
110. Winslow GM, Yager E, Shilo K, Volk E, Reilly A, Chu FK. Antibody-Mediated elimination of obligate intracellular bacterial pathogen. *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infect. Immun.* 2000;68:2187-2195.

111. Wood PR, Jones SL. BOVIGAMTM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 2001;81:147-155.
112. Zendejas H, Milián F, García L, Cruz G, Anaya A, Huitrón G. La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina. *Téc. Pecu. Méx.* 2007;45:279-287.