



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE DIFERENTES INMUNÓGENOS, BAJO
CONDICIONES DE CAMPO EN UN HATO CON ALTA
PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS BOVINA.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

FELIPE ÁNGEL CASTAÑEDA CUEVAS

TUTOR: FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

COMITÉ TUTORAL: FERNANDO DÍAZ OTERO
BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

MÉXICO D.F.

2012



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.

DEDICATORIA

A mis padres: María Esther y Felipe por haberme dado la vida, educación, paciencia y amor, además de todo lo que estuvo a su disposición y en ocasiones mucho más.

A mis hermanos: Moisés y Jessica por su apoyo, tiempo, tolerancia y su amor.

A mis grandes amigos, por su compañía y paciencia en las buenas y en las malas, aunque algunos ya no estén.

A mis profesores y otras personas que han tenido que ver en mi formación académica y como ser humano y que han hecho de mí una persona responsable.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Fernando Díaz Otero y la M. en C. Laura Jaramillo por toda la atención recibida por su parte y sobre todo por su infinita paciencia.

Al Doctor Heber Martínez Estrella por su apoyo ya que sin usted el presente trabajo no se hubiera podido realizar.

A los ganaderos, encargados y trabajadores por su paciencia y por permitirnos realizar el presente trabajo con sus animales.

A mis compañeras del laboratorio que me ayudaron y apoyaron en momentos difíciles y en más de una ocasión, enseñándome, escuchando y por su gran paciencia, Eve-Lyne Quevillon Cardinal, Xóchitl Eva González, Lizet Corona y Gabriela Vega.

Al Doctor José Juan Martínez Maya por su apoyo en la parte estadística de este trabajo.

Al MVZ Mario Santa Cruz por su amable atención y ayuda al facilitar los expedientes de necropsias de los animales del estudio.

A los compañeros de la cuenca Rafael, Ricardo, Silvia, Beatriz, Luis, Antonio y Leopoldo Napoleón por su apoyo.

A los compañeros y amigos durante la maestría Mauricio, Juan José, Armando, Verónica, Rolando, Mireya, Manuel, Enrique, Martha, Victoria, Efraín, Teresa, etc. con quienes compartí esta gran experiencia.

A mis asesores de tesis los Doctores Fernando Díaz Otero, Francisco Suárez Güemes y Beatriz Arellano Reynoso por sus aportaciones, observaciones y correcciones durante la realización de este trabajo.

A Alejandra Esparza Martínez por animarme y apoyarme a cumplir esta meta.

La investigación se efectuó en el laboratorio de inmunología del centro nacional de investigaciones en microbiología animal (CENID-microbiologia-animal) del INIFAP, como parte de las investigaciones del proyecto:

“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

ÍNDICE	pagina
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
Generalidades de la Tuberculosis bovina.....	3
Importancia de la TBb en la salud humana.....	5
Importancia de la TBb en la sanidad animal.....	8
Agente etiológico.....	9
Envoltura de las micobacterias.....	10
Factores de virulencia.....	11
Factores de riesgo.....	13
Patogenia de la TBb.....	15
Respuesta inmune del hospedero.....	17
Inmunidad inespecífica.....	17
Inmunidad específica.....	20
Pruebas utilizadas para el diagnóstico de TBb.....	22
Prueba de tuberculina.....	22
Prueba de Interferón gamma (IFN- γ).....	24
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	25
Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
Inmunógenos utilizados para el control de la tuberculosis.....	27

<i>Mycobacterium bovis</i> bacilo Calmette-Guerín (BCG).....	27
Extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE).....	30
<i>Mycobacterium vaccae</i>	32
Vacunas de ADN.....	32
Vacunas recombinantes.....	33
Estudios epidemiológicos para evaluar la eficacia de vacunas.....	35
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Ubicación del lugar de trabajo.....	40
Metodología primera parte del estudio: evaluación retrospectiva de 3 diferentes inmunógenos.....	40
Descripción del hato y medidas de control realizadas durante el programa de inmunización.....	41
Flujo de los animales dentro del hato.....	41
Inmunógenos utilizados.....	41
Animales.....	42
Pruebas y cálculos estadísticos utilizados.....	42
Programas estadísticos utilizados.....	43
Metodología segunda parte del estudio: inmunización con BCG cepa Phipps a diferentes dosis y evaluación de la inmunidad	

celular y humoral.....	43
Descripción del hato.....	43
Vacuna y dosis utilizadas.....	44
Animales.....	44
Determinación del tamaño de muestra.....	44
Grupos de estudio.....	45
Pruebas de laboratorio.....	45
Prueba de IFN- γ	45
Prueba de ELISA.....	47
Prueba de tuberculina cervical comparativa.....	48
Prueba de PCR.....	48
Pruebas estadísticas utilizadas.....	50
Programas estadísticos utilizados.....	51
6. RESULTADOS.....	52
Primera parte: evaluación retrospectiva de 3 diferentes inmunógenos: BCG cepa Phipps, CFPE de <i>M. bovis</i> y <i>M. vaccae</i>	52
Prevalencia de TBb calculada mediante la prueba de tuberculina...52	
Frecuencia de animales reactivos calculada mediante la prueba de tuberculina realizada en el centro de recría, en los diferentes grupos de estudio.....	52
Eficacia vacunal obtenida mediante los resultados de las pruebas de tuberculina realizadas en el centro de recría.....	52
Frecuencia de reactivos mediante la prueba de tuberculina en los grupos inmunizados de animales en producción.....	53

Eficacia vacunal con las pruebas de tuberculina en los animales en producción.....	53
Frecuencia de lesiones compatibles con TBb presentes en los diferentes grupos de estudio.....	53
Eficacia vacunal obtenida mediante las frecuencias de animales con lesiones compatibles con TBb a la necropsia.....	54
Diseminación de lesiones.....	54
Segunda parte del estudio: Seguimiento y evaluación de la inmunidad, en becerras inmunizadas con BCG cepa Phipps a diferentes dosis.....	55
Evaluación de la respuesta inmune celular mediante la prueba de IFN- γ	55
Reactividad a la prueba de tuberculina.....	57
Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	57
Resultados de la prueba de PCR.....	58
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES.....	68
9. REFERENCIAS.....	69
10. ANEXOS.....	89
Cuadro 1. Frecuencias de reactivos a la prueba de tuberculina de los grupos inmunizados alojados en el centro de cría. CAIT Hgo. México.....	89
Cuadro 2. Porcentaje de la eficacia vacunal de 3 diferentes inmunógenos utilizados para el control de la TBb en el centro de cría. CAIT Hgo. México.....	89

Cuadro 3. Frecuencias de reactores a las pruebas de tuberculina realizadas en el hato en fase de producción, desglosadas por muestreo y por grupo inmunizado. CAIT Hgo. México.....	90
Cuadro 4. Eficacia vacunal de 3 diferentes inmunógenos, calculada con resultados de la prueba de tuberculina de bovinos en producción de un hato lechero de alta prevalencia. CAIT Hgo. México.....	90
Cuadro 5. Frecuencias obtenidas mediante los expedientes de necropsias, de animales con lesiones compatibles a TBb por grupo inmunizado. CAIT Hgo. México.....	91
Cuadro 6. Porcentajes de eficacia vacunal determinada mediante los resultados de las frecuencias de animales con lesiones compatibles a TBb a partir de los registros de necropsias. CAIT Hgo. México.....	91
Cuadro 7. Frecuencias en los grados de diseminación de la enfermedad presentes dentro de los grupos de estudio.....	91
Cuadro 8. Pruebas Kruskal-Wallis que fueron significativas en los diferentes antígenos y muestreos.....	92
Cuadro 9. Resultados de la prueba de Dunn.....	92
Cuadro 10. Frecuencias de becerras positivas a la prueba de IFN- γ y significancias de la prueba Chi ² de homogeneidad.....	92
Cuadro 11. Frecuencias de animales reactores a la prueba de tuberculina por grupos vacunados.....	93
Cuadro 12. Resultados de las frecuencias de animales a la prueba PCR.....	93
Figura 1. Comportamiento de la prevalencia a TBb en el centro de recría CAIT Hgo. México en un periodo de 2005-2008.....	94
Figura 2. Comportamiento de la prevalencia a TBb en el hato en producción	

CAIT, Hgo. México en un periodo del año 2000 – 2009.....	95
Figuras 3a y 3b. Cinéticas de producción de la citocina IFN- γ medida en D.O. expresada como valor promedio y desviación estándar, del mitógeno (pokeweed) y del control sin estímulo en los 3 diferentes grupos.....	96
Figuras 4a, 4b, 4c y 4d. Graficas de caja de las cinéticas de producción de IFN- γ , medidas en D.O. como valor de la mediana, en los muestreos 0, 15, 30 y 60 días respectivamente, en 3 grupos de becerras con 3 diferentes antígenos.....	97
Figuras 5a, 5b y 5c. Graficas de caja de las cinéticas de producción de IFN- γ medida como valor de la mediana en D.O., de los muestreos 90, 150 y 210 días respectivamente, en los 3 grupos de becerras, estimulando con 3 diferentes antígenos.....	98
Figura 6a, 6b, 6c y 6d. Graficas de caja de las cinéticas de producción de anticuerpos mediante la prueba de ELISA expresadas como el valor de la mediana, en D.O. de los muestreos 0, 15, 30 y 60 días respectivamente, en 3 grupos de becerras, utilizando 2 diferentes antígenos.....	99
Figura 7a, 7b y 7c. Graficas de caja de las cinéticas de producción de anticuerpos mediante la prueba de ELISA expresadas como el valor de la mediana, en D.O. de los muestreos 90, 150 y 210 días respectivamente, en 3 grupos de becerras utilizando 2 diferentes antígenos.....	100
Reactivos y soluciones utilizadas en las pruebas de laboratorio.....	101
Prueba de ELISA.....	101
Prueba de IFN- γ	102
Extracción de ADN.....	102

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad zoonótica y en México las explotaciones lecheras presentan una prevalencia promedio del 16.5 %. El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento de 3 inmunógenos: BCG Phipps, extracto proteico de filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis* y *M. vaccae* para el control de la TBb en un hato con alta prevalencia y la respuesta inmune de becerras vacunadas con la BCG Phipps. El trabajo se llevó a cabo en 2 etapas. En la primera, se hizo un análisis retrospectivo, a partir de los expedientes de las pruebas de tuberculina y de necropsias, de un hato donde se realizó un programa de control con vacunación. La segunda se dedicó al seguimiento de 2 grupos de animales vacunados con BCG cepa Phipps a 2 diferentes dosis (1×10^4 UFC y 1×10^6 UFC), ya que este inmunógeno obtuvo la mejor eficacia vacunal en la primera parte del estudio. El seguimiento de los grupos se hizo mediante pruebas inmunológicas como las pruebas de tuberculina e IFN- γ , para determinar la respuesta inmune celular y la prueba de ELISA, para estudiar la inmunidad humoral. Además, se realizó la prueba de PCR para la detección de *M. bovis* en secreción nasal. Los resultados de la primera parte mostraron una disminución en la prevalencia de TBb de 28 % a 11.7 %, como consecuencia del programa de control con vacunación. La eficacia vacunal para la BCG calculada mediante la frecuencia de reactores a la prueba de tuberculina y los expedientes de necropsias fueron del 37.11 % y del 28.7 % respectivamente. Además se observó un menor grado de diseminación de lesiones en los grupos vacunados, limitándose solamente a una linfadenopatía granulomatosa, mientras que en el grupo no vacunados, se presentaron casos de TBb miliar generalizada. En la segunda parte del estudio, se encontró un incremento significativo en la producción de IFN- γ , solamente en el grupo vacunado con una dosis de 1×10^6 UFC de BCG. De los 2 grupos vacunados, solo 5 de 22 animales reaccionaron a la prueba de tuberculina a los 3 meses posvacunación. Las cinéticas de anticuerpos mostraron un incremento hacia antígenos de *M. bovis* a los 15 días posvacunación, tanto en los grupos vacunados como en el grupo control, debido a la posible exposición a micobacterias ambientales. En la prueba de PCR, no se detectó la presencia de *M. bovis* en los grupos de estudio. Los resultados mostraron una eficacia vacunal baja, en hatos con alta prevalencia de TBb en comparación con otras investigaciones y que la vacunación con la BCG cepa Phipps induce una respuesta de IFN- γ en animales vacunados con una dosis de 1×10^6 UFC y no interfiere con la prueba de diagnóstico oficial.

Palabras clave: BCG Phipps, Eficacia vacunal, Evaluación, Tuberculosis bovina.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) is a zoonotic disease and in Mexico, the disease presents a mean prevalence of 16.5 % in dairy farms. The aim of the present study was to determine the efficacy of 3 different vaccines for the control of bTB: BCG Phipps, *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteic extract and *M. vaccae*, in a herd with high prevalence of the disease and the immune response of calves vaccinated with BCG Phipps. The work was carried out in two parts. In the first part, a retrospective analysis was conducted from records of tuberculin tests and necropsies of a herd under a vaccination control program. In the second part, the study were conducted with two groups of animals vaccinated with BCG Phipps strain at 2 different doses (1×10^4 CFU and 1×10^6 CFU), which had shown the best vaccine efficacy in the first part of the study. Monitoring of groups was done through immunological tests such as tuberculin and IFN- γ tests, in order to determine the cellular immune response and the ELISA test, to study the humoral immune response. In addition, PCR was used for detection of *M. bovis* from nasal secretion. The results of the first part of the research showed a decrease in bTB prevalence from 28 % to 11.7 %, as a result of vaccination control program. The BCG vaccine efficacy, first calculated by the frequency of tuberculin test reactors was 37.11 % and 28.7 % when necropsy results were taken into account. In addition, a lower grade of spread lesions was observed in the vaccinated groups, only limited to granulomatous lymphadenopathy, while in the unvaccinated group, there were cases of generalized military TBb. In the second part of the work, the results of IFN- γ production showed a significant increase only in the 1×10^6 BCG vaccinated group. Regarding to the tuberculin test, only 5 of 22 animals reacted in the 2 vaccinated groups, 3 months after vaccination. The antibodies kinetics showed an increase against *M. bovis* antigens 15 days post-vaccination in vaccinated and control groups, due to possible exposure to environmental mycobacteria. Moreover, the PCR test did not detect the presence of *M. bovis* in any study group. The results showed that vaccine efficacy was low in herds with high bTB prevalence in comparison with other researches and that vaccination with BCG Phipps strain induced a significant IFN- γ response in animals vaccinated with a dose of 1×10^6 CFU and that the vaccine does not interfere with official diagnostic test.

Key words: BCG Phipps, Bovine tuberculosis, Evaluation, Vaccine efficacy.

1. INTRODUCCIÓN

Generalidades de la Tuberculosis bovina

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* e incluye a las especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, y *M. canetti* (Gutiérrez *et al.*, 2005) estas especies producen TB en diferentes hospedadores. La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad ocasionada por *M. bovis*, se caracteriza por ser zoonótica y de distribución mundial (Abalos y Retamal, 2004; CFPSH, 2007; Shitaye *et al.*, 2007), ya que puede causar hasta un 10 % de los casos de TB humana, en países donde la TBb es común (O'Reilly y Daborn, 1995).

La TBb se define como una enfermedad infecciosa, crónica, debilitante, aunque en ocasiones puede presentar un curso agudo y progresivo. Causa emaciación progresiva, fiebre fluctuante, inapetencia, tos, disnea, taquipnea, linfadenitis, estos signos son observables en animales con un cuadro avanzado de la enfermedad, hoy en día debido al manejo en las explotaciones lecheras, donde en promedio a los 3 y medio partos se reemplazan a los animales, es poco común observar estos signos en los animales infectados. En los países con programas de erradicación raramente se observa evidencia clínica, debido a que la prueba intradérmica de tuberculina facilita el diagnóstico y eliminación de bovinos infectados antes de que aparezcan signos clínicos de TBb (OIE, 2004).

En caso de presentarse en los linfonodos cervicales puede causar obstrucción de vasos sanguíneos o de las vías respiratorias y digestivas, como en casos observados en un grupo de bovinos Ankole-Watusi (González *et al.*, 2007). El ganado bovino es el hospedero primario de *M. bovis*, la cual tiene la capacidad de penetrar las mucosas e invadir los tejidos linfáticos del tracto respiratorio (Dunlap *et al.*, 2000; Grange, 2001). La propagación de la infección se hace por la exposición a bovinos infectados, los cuales diseminan la micobacteria principalmente por vía aerógena mediante aerosoles provenientes de lesiones

pulmonares (Abalos y Retamal, 2004). Una segunda vía importante de transmisión de la infección es mediante la glándula mamaria infectada, a través del consumo de leche por los becerros (Grange, 2001; Ameni *et al.*, 2003; Amanfu, 2006; Harris *et al.*, 2007; Une y Mori, 2007).

En la TBb, existen dos tipos de hospederos, además del ganado bovino: los de manutención o reservorios y los incidentales. Los reservorios se infectan, enferman y pueden transmitir enfermedad a otros individuos susceptibles, conservando la infección en sus poblaciones, mientras que los hospederos incidentales se infectan y desarrollan la enfermedad, sin embargo, la diseminación a otros individuos es poco frecuente y una fuente externa de infección es requerida para mantener la enfermedad en la población (Abalos y Retamal, 2004; Biet *et al.*, 2005; Meikle *et al.*, 2011).

Se han identificado diferentes especies de mamíferos como reservorios de *M. bovis*: zarigüeyas en Nueva Zelanda (Porphyre *et al.*, 2008); los tejones en el Reino Unido e Irlanda (Neill *et al.*, 2001); el venado cola blanca en Estados Unidos (EE.UU.) (Corner, 2006; Palmer, 2008). Otros animales donde se ha aislado el microorganismo son: los bisontes en Canadá, kudus y búfalos en África (Corner, 2006; Jha *et al.*, 2007) y los jabalíes en España (Parra *et al.*, 2005; Naranjo *et al.*, 2008). Por ejemplo, en Michigan EE.UU., se reportaron dos casos de TB zoonótica en una unidad que se dedicaba a la cacería de venados. Se descubrió que la fuente de contagio fue un cadáver de venado, el cual fue positivo al cultivo bacteriológico, con un genotipo idéntico al encontrado en las personas infectadas (Wilkins *et al.*, 2008). En cuanto a los huéspedes incidentales, se han identificado animales de granja como son: ovejas (Marianelli *et al.*, 2010), cabras (Parra *et al.*, 2005; Crawshaw *et al.*, 2008; Cadmus *et al.*, 2009), caballos, asnos, mulas, cerdos, perros (Ellis *et al.*, 2006) y gatos (CFPSH, 2007), además animales de zoológicos como: osos, leones, tigres (Lantos *et al.*, 2003), leopardos, chitas, linceos (Briones *et al.*, 2000), hurones (Corner, 2006), alpacas, llamas, camellos, jirafas y rinocerontes (Une y Mori, 2007), así como fauna de vida libre como los minks y coyotes (CFPSH, 2007). Por lo tanto, *M. bovis* posee un vasto espectro de

mamíferos susceptibles, las aves son resistentes a la infección (O'Reilly y Daborn, 1995; Abalos y Retamal, 2004; OIE, 2004; Biet *et al.*, 2005; CFPSH, 2007).

Importancia de la TBb en la salud humana

A principio del siglo XIX, se asoció la enfermedad conocida como escrófula (linfadenitis cervical) al consumo de leche proveniente de vacas enfermas con TB. En 1868, las publicaciones de los estudios de Villemin demostraron la transmisión experimental de la tuberculosis humana y bovina a conejos. Además, los aislamientos de Koch del bacilo tuberculoso de ambas fuentes, humana y bovina (Grange, 2001), demostraron que el bovino puede transmitir la TB al ser humano.

Existen muchos estudios de frecuencias, prevalencias e incidencia de casos de TB zoonótica en humanos ocasionada por *M. bovis* en diversos países. En los países desarrollados se han observado menos casos de TB zoonótica en comparación con los países en desarrollo (Cosivi *et al.*, 1998; Grange, 2001).

En el Reino Unido, el centro de vigilancia de enfermedades transmisibles registró, de enero de 1986 a octubre de 1991, 9,687 aislamientos de micobacterias, de los cuales 117 (1.2 %) identificaron a *M. bovis* como agente causal (Hardie y Watson, 1992). Entre los años 1990 a 2003, se registró una incidencia de 15 a 50 nuevos casos de TB anuales, detectados por aislamiento bacteriológico, de los cuales 0.5-1.5 % fueron provocados por *M. bovis* (De La Rúa-Domenech, 2006). En Francia, encuestas realizadas en laboratorios de microbiología reportaron que de 7,075 aislamientos, 38 (0.5 %) correspondían a *M. bovis* (Robert *et al.*, 1999). En Nueva Zelanda con información de 3 laboratorios de referencia, se encontraron 54/1,997 casos, que representa un 2.7 % de prevalencia de TB zoonótica en humanos durante el periodo de 1995 a 2002 (Baker *et al.*, 2006). Mientras que en Australia, entre los años 1970 a 1994, se reportaron 0.43-3.1 % de casos de TB zoonótica, un estudio realizado con datos del departamento de salud y servicios familiares, determinó un promedio de 9.4 casos, con un rango 3 a 22 casos de tuberculosis zoonótica por año de 1970 a 1994 (Cousins y Dawson, 1999). En cuanto a los EE.UU. se han encontrado

diferentes porcentajes de casos de TB ocasionada por *M. bovis*. Por ejemplo, estudios realizados en el condado de San Diego California, a partir de datos de vigilancia epidemiológica provistos por el centro de prevención y control de enfermedades, que mostraron 129/1,931 (6.7 %) de casos de TB ocasionada por *M. bovis*. El análisis de estos casos reveló que los individuos eran principalmente de grupos étnicos hispanos, con edades de 0-14 años, individuos nacidos en otro país, pacientes seropositivos al virus de inmunodeficiencia humana (VIH), así como lesiones extrapulmonares. En el último caso, las lesiones extrapulmonares sugieren la ingestión de productos lácteos no pasteurizados (LoBue *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2007). Otras investigaciones realizadas a partir de registros del servicio nacional de genotipos de TB de los EE. UU., identificaron 165/11,860 (1.4 %) casos de *M. bovis* en humanos de 1995 a 2004, empleando la técnica de “spoligotyping”, mediante el seguimiento de casos encontrados a través de muestras positivas al cultivo bacteriológico (Hlavsa *et al.*, 2008).

En los países en vías de desarrollo, la TB causada por *M. bovis* representa un alto riesgo, para los seres humanos. Por ejemplo en el continente Africano, la TBb representa un peligro potencial, ya que un 85 % de la población ganadera y un 82 % de la población humana vive en áreas donde la enfermedad es prevalente y se encuentra parcialmente en fase de control (Ayele *et al.*, 2004). Países como Egipto, Zaire y Nigeria, reportaron prevalencias de TB pulmonar de 2.1 %, mientras que se registró una prevalencia de 9.4 % de TB extrapulmonar causada por *M. bovis* en seres humanos (Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1999). En Uganda, se han reportado que 7 % de linfadenitis cervical encontrada en hospitales del área de Moroto y Matany fueron causado por *M. bovis* (Oloya *et al.*, 2008). Estudios realizados en Madagascar en los años 1994-1995, en pacientes con sintomatología de TB, registraron una prevaecía de 1.3 % de casos de TB pulmonar y 1.25 % de TB extrapulmonar causadas por *M. bovis* (Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1999). Mientras que en Etiopia encontraron una prevalencia de 16.3 % durante el año 2005 (Shitaye *et al.*, 2007). En Tanzania, un estudio identificó 7/65 (10.8 %) casos provocados por *M. bovis* (Cleveland *et al.*,

2007). En China, se han reportado prevalencias variables de TB causada por *M. bovis*. En el año 1997, se registraron cifras de 4.2 % a 10.6 % dependiendo de las regiones, mientras que un estudio retrospectivo estableció que de 5,011 casos de pacientes con TB, 17 (0.34 %) fueron originados por *M. bovis* (Chen *et al.*, 2009). En Argentina, estudios realizados en la provincia de la Plata, entre los años 1992 a 2007, indicaron que de 4,360 casos de TB, 49 (1.12 %) fueron causados por *M. bovis* (Aguirre *et al.*, 2007). En la provincia de Córdoba, en el periodo de 1991 a 2000, estudios de la frecuencia de casos de TB realizados en un hospital de referencia mostraron que 7/646 casos de TB fueron causados por *M. bovis* (Barnes *et al.*, 2004). Mientras tanto, en Brasil se reportan prevalencias bajas (0.05 %) en el año 2000, ya que de 2,000 muestras obtenidas de pacientes con TB, se logró el aislamiento de *M. bovis* solo en 1 caso (Kantor *et al.*, 2008). En México, durante los años 1991 y 1992, se reportaron 15,210 casos de TB y se estimó que 5-8 % de ellos fueron provocados por *M. bovis* (WHO, 1994.137). Estudios realizados en pacientes con sintomatología respiratoria crónica, reportaron el aislamiento de *M. bovis* en 3/50 muestras (Toledo *et al.*, 1999). Mientras que un estudio retrospectivo llevado a cabo en Querétaro, México, con expedientes clínicos de los años 1992-1996 mostro que 265/799 (33.16 %) de casos, debidos a *M. bovis*, fueron asociados a factores como hacinamiento en viviendas, pobreza, malnutrición y diabetes, de estos casos, el 80 % se presento como tuberculosis pulmonar (Milián *et al.*, 2000). La importancia de *M. bovis* como agente causal de la TB extrapulmonar en humanos, principalmente en personas infectadas con el VIH, se ha demostrado en un estudio prospectivo de la frecuencia de casos de TB en muestras de pacientes positivos y negativos al VIH. El estudio, realizado por el servicio de neumología del Hospital General de México, mediante pruebas clínicas, inmunológicas, bacteriológicas, moleculares e histopatológicas reveló que *M. bovis* era la causa de la TB extrapulmonar en 13.75 % y 7.2 % de los pacientes positivos y negativos al VIH respectivamente (Cicero, *et al.*, 2009).

Importancia de la TBb en la sanidad animal

La TBb es una enfermedad de gran importancia para la producción ganadera, por las pérdidas económicas que causa y el riesgo que representa para la salud pública. Durante 1994 en México se contaba con 26.3 millones de cabezas de ganado bovino productor de carne, 2.2 millones de ganado bovino de doble propósito y casi un millón de cabezas de ganado bovino especializado en la producción de leche. En el año 1993 se establece la Comisión Mexicana para el Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina y se llevó a cabo un programa para la aplicación de la prueba de tuberculina en los hatos nacionales, gracias a esto se calculó una prevalencia del 0.5 % en el ganado de carne, 12 % en el ganado de doble propósito y 16 % en ganado lechero. Los resultados obtenidos en los años 1992-1993 por el programa de erradicación fueron alentadores económicamente, aunque tuvo un costo de 15 millones de dólares; sin embargo, por concepto de exportación, hubo un ingreso de 578 millones de dólares (WHO, 1994.137).

Cifras actuales dadas a conocer por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), muestran que una superficie equivalente al 83.11 % del país se encuentra en fase de erradicación, con una prevalencia menor a 0.05 % y el resto está en fase de control con una prevalencia del 2.05 %; excepto en las cuencas lecheras donde las prevalencias alcanzan un valor promedio del 16.5 % (SAGARPA, 2011).

En cuanto a la producción láctea en México, de un total de 7 millones de litros de leche producidos, el 40 % fue vendido a través de canales informales, otro 40 % se vendió para la elaboración de productos lácteos y el restante 20 % se envió para pasteurizar (WHO, 1994.137), esto representa un alto riesgo debido a la gran cantidad de leche que es consumida sin haber sido pasteurizada.

Cabe aclarar que esta enfermedad ha sido desde hace mucho tiempo un problema económico y de salud para nuestro país, debido a que las exportaciones de ganado en pie para engorda a los EE.UU., se ve disminuida puesto que no se

puede enviar ganado para exportación de regiones con TBb. Se estiman pérdidas de divisas por 450 millones de dólares al año (NOM, 1995).

En los países industrializados la TBb ha sido erradicada o drásticamente reducida mediante programas de control y erradicación junto con higiene adecuada y pasteurización de la leche, así como por la divulgación y concientización de la importancia económica y zoonótica de esta enfermedad (Amanfu, 2006). Algunos países han logrado el control mediante la prueba de tuberculina-segregación, con monitoreo y cuarentena de hatos infectados en las etapas tempranas y posteriormente con el protocolo de la prueba de tuberculina-sacrificio en etapas avanzadas de erradicación (CFSPH, 2007).

Agente etiológico

La familia *Mycobacteriaceae* se caracteriza por agrupar a bacilos rectos o ligeramente curvados de 0.1-0.7 X 1-10 μm , aerobios, no forman esporas, no móviles, de metabolismo oxidativo. Las patógenas son de crecimiento lento, pues tardan hasta 60 días, son ácido-alcohol resistentes debido a una elevada cantidad de lípidos en su envoltura, éstos representan 30-40 % de su peso, estos lípidos las hacen hidrófobas, impermeables a los colorantes acuosos y resistentes a los desinfectantes (Niederweis *et al.*, 2010).

Existen métodos convencionales para identificar a las micobacterias como la observación de la tasa de crecimiento, morfología de las colonias, pigmentación y perfiles bioquímicos. Cabe mencionar que requieren entre 6-8 semanas para su identificación. La clasificación de Runyon las divide en 4 grupos: fotocromógenas, escotocromógenas, no cromógenas y de rápido crecimiento (Biet *et al.*, 2005).

Algunas micobacterias son saprofitas de vida libre, otras, oportunistas y otras más, se caracterizan por ser patógenos. Dentro de éstas encontramos a las que pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, que engloba a las micobacterias causantes de la tuberculosis en diferentes especies de mamíferos. Estas micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, tiene un 99.5% de homología nucleotídica entre ellas (Abalos y Retamal, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2005), son de

lento crecimiento, para duplicarse tardan entre 18-20 horas *in vitro*, requieren de medios enriquecidos para su crecimiento como Middlebrook (7H9, 7H10, 7H11 y 7H12), Löwenstein-Jensen, Stonebrink y Petragani (OIE, 2004).

Investigadores del laboratorio regional de tuberculosis de Dulwich Inglaterra, diseñaron un sistema para diferenciar a las especies del complejo *M. tuberculosis* mediante 4 pruebas: reducción de nitratos, sensibilidad a la hidracida tiofeno-2-carboxílico, requerimiento de oxígeno y sensibilidad a la pirazinamida (Collins *et al.*, 1982).

Envoltura de las micobacterias

Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga entre C70-C80, éstos son parte importante de la envoltura protectora característica de las micobacterias. Forman un complejo: por un lado unidos al arabinogalactano (polisacárido) que está ligado covalentemente al peptidoglicano de la pared bacteriana (Niederweis *et al.*, 2010); en su otro extremo se une a glucolípidos como la trehalosa dimicolato (TDM), a este complejo se le conoce como factor de acordonamiento y está presente en las micobacterias patógenas (Gorocica *et al.*, 2005; Tamaya *et al.*, 2005).

Otros glucolípidos son los sulfolípidos de trehalosa o también llamados sulfátidos, glucolípidos con trehalosas acetiladas como los fenoglicolípidos, glicopeptidolípidos y lipooligosacáridos. Mientras que otros componentes como el fosfatidilinositolmanósido y el lipoarabinomanano (LAM) están unidos a la membrana plasmática directamente, los tiocerolones son ceras compuestas unidas a los ácidos micólicos (Gorocica *et al.*, 2005).

Esta compleja estructura formada por la pared celular y los ácidos micólicos se encarga de conferir resistencia a la micobacteria hacia sustancias químicas como desinfectantes (Best *et al.*, 1990), y a las células del sistema inmunitario del hospedador, a la vez que dicha estructura desempeña otras funciones, específicamente los anillos ciclopropano de los ácidos micólicos los cuales

proporcionan protección contra el estrés oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno (Tamaya *et al.*, 2005).

Esta envoltura hace a la micobacteria resistente al medio ambiente, incluso se menciona que puede permanecer viable por meses en las instalaciones pecuarias o en el suelo. Ciertas condiciones como: frío, humedad y oscuridad favorecen la permanencia de *M. bovis*; experimentalmente se ha observado que puede ser viable entre 18-320 días, mientras que en cadáveres puede permanecer 2-4 semanas, posteriormente la descomposición destruye al bacilo, el cual es muy sensible a la luz solar (CFSPH, 2007).

Factores de virulencia

Dentro de los factores de virulencia se considera a las estructuras que forman la envoltura de las micobacterias (ácidos micólicos, glicolípidos, TDM y LAM) ya descritas. Específicamente dentro del complejo *M. tuberculosis* y tomando el caso particular de *M. tuberculosis*, se han identificado diversos factores de patogenicidad, tanto en su superficie celular, así como en sus productos de secreción.

Se han identificado diversas proteínas, que son tanto factores de virulencia y antígenos inmunodominantes, algunas de estas proteínas han sido encontradas en los extractos proteicos de filtrados de cultivo (CFPE) de *M. tuberculosis*, entre ellas se menciona a las enzimas catalasa-peroxidasa (KatG), la cual degrada al peróxido de hidrogeno y es también de gran importancia en la resistencia al fármaco isoniacida; la superóxido dismutasa (SodA), que degrada los superóxidos, los cuales son resultado del metabolismo aerobio o del estallido respiratorio realizado por células fagocíticas, que es de gran importancia para la supervivencia intracelular; la glutamina sintetasa (GnIA) sintetiza al poli-L glutamato-glutamina, es un componente de las micobacterias patógenas; estas enzimas se encuentren presentes en los CFPE debido a la lisis de micobacterias, las cuales al romperse liberan sus enzimas (Collins, 2001; Smith, 2003).

Otras proteínas encontradas en los filtrados de cultivo son: la HspX o también conocida como la proteína de 16 kilodaltones (kDa), la cual se sintetiza bajo condiciones de anoxia y tiene que ver con la latencia o persistencia de la infección micobacteriana en el hospedero; mientras que por otro lado ESAT-6 y CFP-10 son pequeñas proteínas de secreción; la proteína de 19 kDa, aparentemente inhibe la producción de Interferón gamma (IFN- γ) y regula negativamente la presentación de antígenos por parte del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC II) (Rezwan *et al.*, 2007); el antígeno de 38 kDa el cual es un receptor y transportador de fósforo que se expresa cuando este elemento está presente en bajas cantidades (Rezwan *et al.*, 2007) y es de gran importancia para el diagnóstico; por otro lado, el complejo FbpA de la enzima micotil-transferasa formado por FbpA, FbpB y FbpC, también conocidas como los antígenos 85a, 85b y 85c o proteínas de 30-32 kDa, son utilizados por la micobacteria para unirse a la fibronectina de la célula del hospedero (Wiker y Harboe, 1992; Smith, 2003; Tamaya *et al.*, 2005).

También se han encontrado componentes unidos a la superficie celular de *M. tuberculosis* como: el complejo FbpA o antígeno 85 ya antes mencionado (Wiker y Harboe, 1992), la proteína Erp similar al antígeno 28 kDa de *M. leprae*, de la cual se desconoce la función específica pero solo está presente en la cepas patógenas, las enzimas Mas y FadD28 que son de gran importancia en la síntesis de ácidos micoceroicos, la enzima FadD26 cuya función es degradar ácidos grasos, el antígeno MmpL7 que se encarga del transporte y síntesis del tiocerol-dimicocerato, mientras que MmaA4 y PcaA son enzimas metiltransferasas que forman los residuos ciclopropano de los ácidos micólicos (Smith, 2003), la proteína OmpA, es una porina que perfora a los lisosomas (Niederweis *et al.*, 2010) y HbhA proteína tipo hemaglutinina de unión a la heparina que aparentemente interacciona con los neumocitos y es importante en la diseminación extrapulmonar (Smith, 2003). Otros factores de virulencia presentes son la proteincinasa G (PknG) la cual se encarga de bloquear la fusión del fagosoma con los lisosomas promoviendo la sobrevivencia de la micobacteria dentro de esta estructura

(Walburger *et al.*, 2004); así como el nucleósido-difosfato-quinasa (Ndk) el cual se ha observado que en estudios con macrófagos de ratón inhibe la maduración de los fagosomas, por medio de la inactivación de las GTPasas Rab5 y Rab7 (Sun *et al.*, 2010).

Factores de riesgo

Se consideran como factores de riesgo, a las condiciones que aumentan la probabilidad de infección o de enfermedad, para los seres humanos primordialmente a la cercanía y convivencia con animales infectados o enfermos con *M. bovis*, las costumbres alimenticias, como es el consumo de leche o productos lácteos sin pasteurizar, la edad, el estatus de infección con el VIH, ausencia de medidas de vigilancia y control, estatus vacunal y otros factores socio-económicos, es más común la infección en la gente con escasos recursos económicos (Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1999; Biet *et al.*, 2005; Cleveland *et al.*, 2007).

Por otra parte, en cuanto al ganado bovino, el riesgo de infección es mayor en las unidades de producción ganaderas donde las medidas para controlar la enfermedad son inadecuadas, mínimas, o inexistentes (Shitaye *et al.*, 2007). Se deben considerar las explotaciones donde se tienen animales sanos alojados con animales adultos enfermos o reactores a la prueba de tuberculina, sobre todo aquellos modelos intensivos de producción de leche en los cuales, los bovinos tienen una vida productiva larga, por lo tanto hay más exposición a *M. bovis* y están sujetos a mayor estrés debido a las exigencias de la producción; además en muchas de estas explotaciones la prevalencia llegan hasta un 50 % (O'Reilly y Daborn, 1995).

La densidad es de gran importancia, ya que se ha encontrado que favorece la transmisión de la TBb el alto número de animales por m². Así mismo, el que los animales estén en contacto con individuos infectados o enfermos introducidos al hato, favorece la diseminación de *M. bovis*; debido a esto, las prevalencias más altas de TBb se encuentran en los grandes rebaños lecheros. Un estudio sobre

análisis de la prevalencia a TBb en lecherías realizado en Ecuador (Proaño-Perez *et al.*, 2009), demostró que hatos grandes con más de 70 animales, con la mayoría de las vacas en fase de lactación, mostraron aumento en los animales positivos a la prueba de tuberculina.

En cuanto a factores individuales, las razas de bovinos europeas son más susceptibles que las cebuinas (O'Reilly y Daborn, 1995; Ameni *et al.*, 2003; Ameni *et al.*, 2007; Humblet *et al.*, 2009). Así pues, el más alto riesgo de infección para un bovino es cuando los animales comienzan su etapa de producción a partir de los 2.5 años de edad (Milián *et al.*, 2003).

Respecto al número de partos, las vacas multíparas han mostrado una actividad linfoproliferativa más débil, en comparación con las vacas primíparas, con una mayor cantidad de linfocitos T CD4⁺ y una relación substancialmente mayor de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en la sangre. Este cambio en la relación de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en la sangre de las multíparas, se debió al incremento en la proporción de linfocitos T CD4⁺ y la disminución de linfocitos T CD8⁺. Esta alteración coincide con la reducción en la capacidad proliferativa de los linfocitos T inducida por mitógenos (Mehrzad y Zhao, 2008). Estos estudios muestran por primera vez que al aumentar la edad de la vaca, se reduce su capacidad linfoproliferativa y su capacidad para producir proporciones adecuadas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Estas alteraciones pueden llevar a la vaca multípara a tener una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, pues indican una débil capacidad inmunológica mediada por células T citotóxicas (Mehrzad y Zhao, 2008).

Otros factores involucrados son las relacionadas al manejo y movimiento de ganado como en el caso del ingreso de animales infectados o enfermos, portadores de *M. bovis* (Costello *et al.*, 1998), el contacto directo entre bovinos en lugares tales como bebederos y comederos compartidos entre corrales, la carga animal por corral (Cleveland *et al.*, 2007; Humblet *et al.*, 2009), el número total de animales infectados, la cantidad de animales susceptibles (Tadayon *et al.*, 2008), las deficiencias nutricionales, la ausencia de medidas tendientes a prevenir o

controlar la diseminación de esta enfermedad (Ameni *et al.*, 2003), la alimentación de los becerros con calostro y/o leche de animales enfermos o reactores a la prueba de tuberculina (Serrano-Moreno *et al.*, 2008) y la presencia de reservorios dentro de la explotación como mascotas u otros animales (Abalos y Retamal, 2004; Humblet *et al.*, 2009).

Patogenia de la TBb

La vía aerógena es la principal ruta de transmisión de esta enfermedad (Neill *et al.*, 2001; Biet *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 2007; Liebana *et al.*, 2008), mediante gotas de aerosoles, con un tamaño de 1-10 μm , que transportan a los bacilos a través de las vías pulmonares hasta alcanzar los alveolos. En el caso de que estos aerosoles lleguen a la boca, la micobacteria puede llegar a los linfonodos retrofaríngeos y cervicales (O'Reilly y Daborn, 1995; Liébana *et al.*, 2008). La ruta oral es de gran importancia en becerros, por la ingestión de leche contaminada con *M. bovis*.

Una dosis baja es suficiente para infectar a un bovino por vía pulmonar, se han utilizado nebulizaciones a dosis 1×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) y se observaron lesiones similares a las presentes en la infección natural, a diferencia de la vía oral donde es necesario inocular dosis muy altas (Neill *et al.*, 2001) de hasta 2×10^7 UFC de bacilos (Palmer y Waters, 2006).

Los hallazgos *post mortem* de estudios llevados a cabo en rastros muestran una mayor tendencia a encontrar lesiones en uno o ambos pulmones, que se localizan en áreas dorso-caudales, así como en los linfonodos mediastínicos y traqueobronquiales (Costello *et al.*, 1998; Rodgers *et al.*, 2007). Aunque en otros estudios también se han encontrado lesiones en otros linfonodos como son: retrofaríngeos, cervicales superficiales, mesentéricos y poplíteos, incluso algunos reportes mencionan a las tonsilas, mostrando que la vía oral es una ruta de infección importante (Liébana *et al.*, 2008), y en menor proporción en órganos y tejidos linfáticos abdominales, así como en otros órganos como la glándula mamaria (Ameni *et al.*, 2003; Serrano-Moreno *et al.*, 2008). La localización de

lesiones en las meninges es más frecuente en animales jóvenes que en adultos y muy probablemente es debido a una infección congénita (O'Reilly y Daborn., 1995). La lesión típica de la tuberculosis en bovinos, es el granuloma y se forma de la siguiente manera: como inicio, se desarrolla una inflamación exudativa focal que caseifica rápidamente, experimentalmente se ha visto que lleva entre 7-8 días, y su calcificación ocurre hasta las 3 semanas, asimismo puede existir uno o más focos en pulmón, los linfonodos presentan aumento de tamaño y caseificación radiada difusa (Rodgers *et al.*, 2007).

Los granulomas presentan un diámetro de 0.1-2 mm y pueden ser mayores debido a la confluencia de lesiones. En el centro de la lesión se observa una zona de necrosis con cariólisis y puede presentarse calcificación distrófica. Adicionalmente en la zona intermedia hay macrófagos activados, dispuestos en forma contigua, conocidos como células epitelioides. La fusión de éstas da origen a las células gigantes de Langhans con núcleos periféricos en forma de herradura. La porción más externa del granuloma está formada por linfocitos, células plasmáticas y monocitos. Por último, hay una cápsula periférica de tejido conectivo (Aranaz *et al.*, 1996; Neill *et al.*, 2001).

En los bovinos se han descrito 3 formas de tuberculosis:

1) Infección primaria: las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos alveolares (VAN Crevel *et al.*, 2002; Caminero, 2003). Al sitio por donde entró la micobacteria se le conoce como infecto primario y a partir de él se diseminan las micobacterias a los linfonodos regionales, produciendo una adenopatía satélite. A esta adenopatía junto con el infecto primario, se les conoce como foco o complejo primario (VAN Crevel *et al.*, 2002; Caminero, 2003).

Este complejo primario puede evolucionar de varias formas: 1) Curación de la masa necrótica y cicatrización. 2) Pasar a una fase de latencia, donde el foco primario permanece en reposo inactivo, que puede mantenerse así por años, conteniendo bacilos vivos capaces de infectar y dar origen a tuberculosis postprimaria o una generalización tardía (VAN Crevel *et al.*, 2002; Caminero,

2003). 3) Puede ocurrir una generalización precoz, en la cual se produce una diseminación, originando nuevos focos en diversos órganos. Ésta puede presentarse de 2 maneras diferentes: tuberculosis miliar aguda y generalización precoz lenta, en esta última hay la liberación intermitente de bacilos que se van diseminando poco a poco (Aranaz *et al.*, 1996).

II) Tuberculosis postprimaria: en la cual puede haber una diseminación a través de los bronquios y expandirse hacia la pleura, originando una pleuritis caseosa difusa (Neill *et al.*, 2001). En las lesiones hay una tendencia al reblandecimiento por licuefacción de lesiones caseosas, dando origen a una tuberculosis pulmonar crónica. En este caso, las vías aéreas son erosionadas formando cavitaciones por el reblandecimiento del parénquima (O'Reilly y Daborn, 1995) y cuando afecta a las paredes de los bronquios las secreciones ascienden hacia las vías respiratorias altas (Aranaz *et al.*, 1996).

III) Generalización tardía: se presenta debido a una disminución de la inmunidad en el hospedero, hay una diseminación vía linfohematógena, son animales que están en fase anérgica a la prueba de tuberculina y se caracteriza por la tendencia de las lesiones a la caseificación sin delimitación de éstas, por lo tanto se extienden con rapidez en los pulmones mediante focos diseminados por todo el parénquima, ocurre lo mismo en los linfonodos, con la posibilidad de tuberculosis miliar en órganos como riñón, vejiga, útero, hígado y bazo (Aranaz *et al.*, 1996; Neill *et al.*, 2001).

Respuesta inmune del hospedero

La respuesta del hospedero contra la tuberculosis está cimentada en la inmunidad inespecífica (innata) y en la inmunidad específica (adquirida).

Inmunidad inespecífica

La defensa por parte del sistema inmune del hospedero inicia en el momento en que las micobacterias infectan a los macrófagos alveolares al ser fagocitadas y

también pueden infectar a otras células como son las del epitelio alveolar (Bermúdez *et al.*, 2002), mediante la unión de las proteínas de 30-31 kDa localizadas en la superficie de la micobacteria, estas proteínas tienen la capacidad de unirse a la fibronectina, al igual que la proteína de 28 kDa que se une a los glicoconjugados sulfatados (VAN Crevel *et al.*, 2002). Otra manera por la cual las micobacterias son captadas, es cuando están recubiertas con opsoninas como C3b, la cual se une a su receptor en la células fagocíticas, además de otros receptores como: los de manosa, los SR-A y los FcR en el caso de que la micobacteria esté cubierta por anticuerpos (VAN Crevel *et al.*, 2002).

Por parte del hospedero el reconocimiento del bacilo tuberculoso o sus productos de excreción, es dado por las células presentadoras de antígenos, lo cual es de suma importancia para el inicio de la respuesta inmune. El LAM es reconocido por receptores CD14 y por los receptores tipo toll (TLR) que reconocen patrones asociados a patógenos, específicamente por el TLR4. Los TLR2 se encargan de reconocer lipoproteínas micobacterianas (Raja, 2004) y los TLR9 el ácido desoxirribonucleico (ADN) micobacteriano (VAN Crevel *et al.*, 2002). Todos estos receptores son esenciales para dar pie a los eventos de activación celular y producción de citocinas.

Para poder eliminar o por lo menos limitar la infección tuberculosa es necesario el reclutamiento de macrófagos mediante citocinas proinflamatorias, éstas son producidas por los monocitos, macrófagos y las células dendríticas que han reconocido los antígenos micobacterianos, comienzan a producir el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL) como son la IL-1, IL-6 y quimiocinas (citocinas quimiotáctica) que a su vez favorecen la expresión de moléculas de adhesión como CD106 y CD62-E en las células endoteliales y leucocitos para que estos últimos alcancen el sitio de lesión.

Las quimiocinas son producidas por leucocitos, células epiteliales (Bermúdez *et al.*, 2002) y macrófagos durante la fase temprana de infección, la IL-8 es una citocina quimiotáctica que atrae a los neutrófilos para fagocitar a las micobacterias, y aunque éstos no tiene la capacidad para eliminarlas, sí limitan la

diseminación de los bacilos mientras son sustituidos por macrófagos activados (Raja, 2004).

Las quimiocinas que juegan un papel importante son: la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), RANTES y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), que dirigen la migración de monocitos y linfocitos para formación del granuloma. El factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) producido por macrófagos activados promueve el depósito de colágeno y favorece la quimiotaxis de otros macrófagos.

Estos sucesos se llevan a cabo con el fin de evitar la diseminación del bacilo tuberculoso y favorecer la migración y activación de células fagocíticas circulantes, así como la migración de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), proceso al cual se le conoce como fenómeno de hipersensibilidad tardía o hipersensibilidad tipo IV (Jiménez *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2005).

Las citocinas producidas por los macrófagos activados como IL-12, IL-15 e IL-18, favorecen la respuesta de linfocitos T CD4⁺ subpoblación Th1 (Raja, 2004) e inducen la producción de IFN- γ en células asesinas naturales (NK) (Olsen *et al.*, 2005), que favorece la eliminación de patógenos intracelulares (Jiménez *et al.*, 2001).

Por su parte las células NK no necesitan presentación de antígenos a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC I), y en su citoplasma contienen gránulos con enzimas como: granzimas, granzimas y perforinas que inducen la lisis de las células infectadas y de las micobacterias en el caso de las perforinas. Asimismo, estas células producen grandes cantidades de IFN- γ aumentando la activación de macrófagos, que junto con la producción de IL-12 e IL-18 promueven una subpoblación de linfocitos Th1 (Olsen *et al.*, 2005).

A pesar de considerar que la inmunidad contra la tuberculosis mediada por células comprende 2 mecanismos, por un lado la protección que conlleva a la eliminación de la micobacteria y por otro la hipersensibilidad tardía que implica la migración de células al sitio de infección, lo cual implica el confinamiento de las micobacterias, son 2 respuestas hasta cierto punto independientes (Orme y

Cooper, 1999), una dirigida por las citocinas y la otra por las quimiocinas, ya que en algunos estudios se han observado animales negativos a la prueba de tuberculina y positivos en la prueba de IFN- γ (Díaz *et al.*, 2003).

Inmunidad específica

Para que ocurra la activación de los linfocitos, dependerá del reconocimiento de antígenos a través de su receptor de células T (TCR) y de la activación posterior mediante la producción de citocinas (IL-2, TNF- α e IFN- γ principalmente) (Olsen *et al.*, 2005) generando de esta manera la inmunidad celular necesaria para la eliminación del bacilo (VAN Crevel *et al.*, 2002).

Los linfocitos T CD4⁺ reconocen en un principio a los antígenos micobacterianos a través de su TCR y mediante el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC II) y presentan una segunda señal de coestimulación necesaria para amplificar esta respuesta, para ello las células presentadoras de antígenos expresan moléculas como: CD40, CD80 y CD86, con la finalidad de iniciar la activación celular, por lo que los linfocitos expresan marcadores como CD25 en su membrana al estar activados (VAN Crevel *et al.*, 2002).

Es en la fase efectora donde se secreta un patrón específico de citocinas por parte de la subpoblación de linfocitos Th1 como son IL-2, TNF- α e IFN- γ , citocinas que promueven la activación de macrófagos. Estas citocinas también inducen la activación y proliferación de linfocitos $\gamma\delta$, que se han asociado al reconocimiento de antígenos micobacterianos no peptídicos presentados por moléculas CD1 (Rhind, 2001; Price y Hope, 2008). Esta cooperación resulta fundamental para la actividad microbicida de los macrófagos aumentando la producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico. El IFN- γ puede ejercer su acción estimulando a los genes de las proteínas de macrófagos asociadas a resistencia natural (*Nramp*) (Pereira *et al.*, 2006), que transportan nitritos del citosol a los compartimentos celulares ácidos (fagolisosomas), donde son

convertidos a óxido nítrico, principal radical oxidante contra las micobacterias (Jiménez *et al.*, 2001).

Diversos estudios han mostrado que en fases avanzadas o crónicas de la tuberculosis, la respuesta inmune se desvía hacia una subpoblación Th2 por parte de los linfocitos T CD4⁺, en contraste con una subpoblación Th1, la subpoblación Th2 producirá grandes cantidades de IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales favorecen la respuesta contra patógenos extracelulares o respuesta inmune humoral pues IL-4, IL-10 e IL-13, modulan negativamente la respuesta Th1, mediante una subpoblación Th2, la cual es poco eficiente en contra de los patógenos intracelulares (Raja, 2004).

Los linfocitos que se encargan de destruir células infectadas con micobacterias son los linfocitos T CD8⁺ que reconocen específicamente antígenos presentados por el MHC I y una vez activados producen IFN- γ (Smith *et al.*, 1999; Villareal-Ramos *et al.*, 2003; Liébana *et al.*, 2007), estos linfocitos realizan acciones en 2 sentidos, primero por exocitosis de sus gránulos enzimáticos ricos en granulinas que actúan degradando lípidos de la membrana, mediante su acción sobre otras enzimas membranales como glucoceramidasa y esfingomielinasa, que de igual manera conducen al incremento de ceramida, la cual está involucrada en la inducción de apoptosis o través de la interacción FasL (CD95L en el linfocito T CD8⁺) con Fas (CD95 de la célula blanco) (Smith *et al.*, 1999; Raja, 2004) e inicia la cascada de las caspasas, lo cual sólo implica la lisis de la célula y no de las micobacterias dentro de ella. Otras enzimas presentes en los linfocitos T CD8⁺ son las granzimas y perforinas de las cuales estas últimas inducen la lisis de las células infectadas y de la micobacteria.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ constituyen un 1-5 % en humanos (Jiménez *et al.*, 2001), mientras que en bovinos constituyen de un 10-50 % (Liébana *et al.*, 2007). Estos linfocitos están asociados a las mucosas, por lo cual en la infección tuberculosa aumentan hasta un 30 %. Una de sus características especiales es que pueden reconocer antígenos lipídicos unidos a CD1 (Rhind, 2001; Price y Hope, 2008), glicolípidos como el fosfatidilinositol dimanósido, glucosamonicolato y LAM.

La subpoblación $\gamma\delta$ es de gran importancia en bovinos, pues a ella corresponde la mayor población de linfocitos circulantes, que constituyen entre un 50-60 % en becerros (Rhind, 2001; Liébana *et al.*, 2007), como respuesta a la infección con *M. bovis*, además de que responden a antígenos micobacterianos *in vitro* (Liébana *et al.*, 2007), de ahí que al estimular con PPD bovino se observa proliferación de estos linfocitos en sangre y la producción de IFN- γ en respuesta a la IL-12 e IL-18 (Waters *et al.*, 2000; Price y Hope, 2008).

Pruebas utilizadas para el diagnóstico de TBb

Prueba de tuberculina

Ésta es una prueba inmunodiagnóstica recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), para el comercio internacional y de rutina en los países con programas de erradicación de la TBb. Para su realización se utiliza el derivado proteico puro (PPD) (OIE, 2004), que es una preparación obtenida a partir de productos solubles sometidos a tratamiento térmico del cultivo y lisis de la cepa AN5 de *M. bovis* (OIE, 2004; De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Bernardelli, 2007).

El PPD contiene proteínas, polipéptidos, polisacáridos (25% de ellos al utilizar ácido tricloroacético para precipitar las proteínas y 3-6% al usar sulfato de amonio) y ADN (26% al utilizar ácido tricloroacético y 1% al utilizar sulfato de amonio). Los PPDs ha sido filtrados, concentrados por precipitación, y están libres de micobacterias (De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Bernardelli, 2007), este producto es específico para el diagnóstico de la TBb, su aplicación se realiza vía intradérmica y es capaz de poner en manifiesto la hipersensibilidad tardía en animales sensibilizados por *M. bovis*.

En nuestro país existen 3 modalidades de la prueba: caudal, cervical simple y cervical comparativa (NOM, 1995). Diferentes estudios, realizados a nivel mundial, han mostrado los siguiente valores de sensibilidad y especificidad respectivamente: caudal 75-82 % y 96-99 %; cervical simple 86-96 % y 70-85 %; cervical comparativa 72-78 % y 92-99 % (Ameni *et al.*, 2008; WHO, 1994.137). Se

debe señalar que la prueba cervical comparativa se realiza en lugares donde están presentes micobacterias ambientales y del complejo *M. avium* (NOM, 1995; De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que pueden presentarse diversas causas que pueden influir en los resultados de esta prueba y originar falsos negativos, tal es el caso de un joven en Dinamarca que presentó signología clínica, además de baciloscopia y cultivo bacteriológico positivo con resultados de la prueba de tuberculina negativos (Brock *et al.*, 2004). Puede ocurrir desensibilización, debida a que la prueba se administró muy pronto, no se dejó pasar un periodo de 2 meses entre una prueba y otra. La ausencia de reactividad a la prueba, dada por un periodo prealérgico, donde aun no se ha desarrollado las hipersensibilidad tardía (Palmer y Waters, 2006). La anergia, debida a una infección generalizada o por una etapa muy avanzada de la enfermedad. La inmunosupresión, que puede ser causada por diversos factores como son: la gestación, el puerperio, virus que deprimen el sistema inmunitario, en bovinos por ejemplo el virus de diarrea viral bovina y la administración de desinflamatorios como son los corticoesteroides (De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

También se deben considerar otros eventos, para interpretar los resultados de la pruebas de tuberculina, tal es el caso del fenómeno de “Boost”, éste se da por reprobadas, sin que haya infección, es algo similar a lo que ocurre en una respuesta serológica anamnésica, y se presenta también en las personas vacunadas con BCG y en los individuos expuestos a micobacterias ambientales, se presenta entre 1-5 semanas posteriores a la aplicación de la prueba de tuberculina. La conversión es el desarrollo de una nueva hipersensibilidad tardía, es debida a la exposición a antígenos micobacterianos y ocurre entre 5-12 semanas, a este periodo se le denomina como periodo ventana. Por último la reversión, cuando hay tratamiento de la enfermedad, en el caso de humanos (Menzies, 1999).

Actualmente, se están investigando tuberculinas capaces de distinguir animales vacunados de infectados, probando mezclas de antígenos como ESAT-

6, CFP-10, MPB70 y MPB83 para mejorar la sensibilidad de la prueba de tuberculina (Whelan *et al.*, 2010).

Prueba de Interferón gamma (IFN- γ)

Esta prueba mide la producción de la citocina IFN- γ liberada por células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Esta es una prueba *in vitro*, que consta de 2 fases: primero estimular e incubar con diferentes antígenos (PPD aviar y bovino) a las PBMC, durante 24 horas a 37°C. Que en caso de haber linfocitos sensibilizados presentes en la muestra de sangre, producirán IFN- γ (Wood y Jones, 2001; Díaz *et al.*, 2003), al estimularse con el PPD. En la segunda fase se procede a cuantificar la citocina, de los plasmas obtenidos a través de la centrifugación de la sangre incubada y se procede a medir la producción de IFN- γ expresado mediante densidades ópticas (D.O.) (De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006), mediante una prueba de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) tipo “sandwich”. Esta prueba tiene una alta sensibilidad (77-94 %) y especificidad (96-98 %) (WHO, 1994.137; OIE, 2004).

El IFN- γ es el principal activador de macrófagos y es también un indicador que se ha correlacionado con la protección por parte de la respuesta inmune celular (Ginsberg, 2002).

La prueba de IFN- γ detecta individuos positivos en un lapso corto, de 2 semanas, posinfección (Wood y Jones, 2001). En ocasiones se puede apreciar un “boost” entre 3-28 días posteriores a la aplicación de la tuberculina, que puede prolongarse hasta por 63 días (Wood y Jones, 2001; Díaz *et al.*, 2003; Palmer y Waters, 2006).

Como desventaja de la prueba de IFN- γ tenemos que tampoco detecta animales con depresión de la respuesta inmune mediada por células (anérgicos) (Díaz *et al.*, 2003) y se deben de cuidar las muestras, pues al ser expuestas a temperaturas elevadas por más de 2 horas, se daña a las células, hecho que llega a ocurrir en los muestreos en campo cuando se trabajan hatos muy grandes (Waters *et al.*, 2007).

Actualmente para humanos existe un sistema llamado QuantiFERON™, útil para distinguir individuos vacunados de aquéllos con tuberculosis latente. Éste se puso a prueba en un brote de tuberculosis en Dinamarca, utilizaron como antígenos a las proteínas ESAT-6 y CFP-10, junto con el PPD aviar y bovino para distinguir a los individuos vacunados con BCG de los infectados con micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Brock *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

La prueba de ELISA consiste en absorber antígenos a una fase sólida para captar anticuerpos específicos contra las micobacterias a partir de suero sanguíneo. Esta captura se pone de manifiesto mediante el uso de un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (generalmente peroxidasa), que al reaccionar con su sustrato (peróxido de hidrógeno) en presencia de un cromógeno revela la unión antígeno-anticuerpo.

La prueba de ELISA se considera complementaria en relación a las pruebas basadas en la inmunidad celular, utilizadas para detectar TB (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007). Conforme avanza la enfermedad o bien en animales con una enfermedad generalizada se acentúa una respuesta inmune por anticuerpos, los cuales son un indicador de infección por *M. bovis* (Green *et al.*, 2009), una proporción de animales anérgicos pueden detectarse mediante serología. Lo anterior es de suma importancia ya que muchos de estos animales anérgicos son altamente infecciosos (De La Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Por lo tanto la prueba de ELISA, es de gran utilidad para identificar animales anérgicos, en cérvidos (Palmer y Waters, 2006) y en otros animales silvestres que desarrollan una respuesta inmune por anticuerpos (McNair *et al.*, 2007).

Un dato relevante observado, es que la prueba de tuberculina genera un aumento en la producción de anticuerpos a las 2 semanas de haberse aplicado en individuos infectados (Palmer y Waters, 2006), por lo tanto si se usa la prueba de

ELISA en el diagnóstico complementario de TBb, es recomendable colectar el suero entre 10-20 días posteriores a la prueba de tuberculina (WHO, 1994.137).

Entre las ventajas de la prueba de ELISA puede señalarse que es económica, sencilla, de fácil realización y no invasiva. A pesar de que su sensibilidad (40-60 %) y especificidad (60-80 %) son bajas en comparación con la prueba de tuberculina y la prueba de IFN- γ (OIE, 2004; Whelan *et al.*, 2008).

Desafortunadamente, entre las desventajas se carece de antígenos altamente específicos y sensibles, pues cuando se usan extractos totales de proteínas puede haber reacción cruzada en individuos vacunados con BCG y/o expuestos a micobacterias ambientales (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007). Para solucionar esta situación algunos investigadores trabajan en pruebas serológicas múltiples y antígenos múltiples como CFP-10, ESAT-6, HspX, MPB70, MPB83, EsxH, PPE68, etc., con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas (Whelan *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2009).

Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los avances tecnológicos en la amplificación *in vitro* de ADN y ARN han ido de la mano con el desarrollo de metodologías, que faciliten la detección de microorganismos en diferentes muestras clínicas, tal es el caso de la utilización de la técnica de PCR para lograr un diagnóstico rápido y preciso.

La prueba de PCR consta de 3 etapas: extracción del ADN de la muestra, amplificación del ADN y detección de productos, ya sea por hibridación con sondas o por medio de electroforesis en gel (OIE, 2004; Lo, 2011).

Se han utilizado diferentes cebadores para identificar micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, por ejemplo: secuencias de ácido ribonucleico 16S-23S, secuencias de inserción IS6110, IS1081, ISmyco, regiones de diferenciación como RD10 y de genes que codifican enzimas y otras proteínas tal es el caso de hupB, pncA, gyrB, oxyR, katG, MPT40, MPB64, MPB70 (Cousins *et al.*, 1992; Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2005) y la proteína de 38 kDa (OIE, 2004).

La prueba de PCR tiene varias ventajas, entre ellas destaca la rapidez (Parra *et al.*, 2008), concordancia con pruebas de oro como histopatología y aislamiento bacteriológico (Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2006), además de que se pueden utilizar diferentes tipos de muestras, ya sea frescas o en algún conservador y que a partir de pequeñas cantidades de ADN hay amplificación del mismo (Milián *et al.*, 2010).

En cuanto a sus desventajas tenemos que es una prueba costosa, requiere de personal capacitado, cuidado en puntos críticos (OIE, 2004), suele haber variabilidad en cuanto a sensibilidad y especificidad entre diferentes laboratorios, lo cual se debe a los métodos de descontaminación usados y al procedimiento para la extracción de ADN (Parra *et al.*, 2008), la presencia de inhibidores de la polimerasa, contaminaciones; y por otra parte no permite distinguir si los microorganismos están vivos o muertos y no es una prueba que se debe utilizar sola en el diagnóstico, sino que se debe acompañar de la historia clínica y otras pruebas (Lo, 2011). Con los debidos cuidados en su realización, la PCR ha demostrado ser útil en el diagnóstico rápido para la identificación de *M. bovis* de otras micobacterias a partir de muestras de tejidos con una sensibilidad que va del 61-80 % (Parra *et al.*, 2008).

Inmunógenos utilizados para el control de la tuberculosis

Mycobacterium bovis bacilo Calmette-Guérin (BCG)

La BCG es una vacuna viva atenuada, en 1908 Calmette y Guérin comenzaron a trabajar con la cepa conocida como “Lait Nocard”, una cepa virulenta de *M. bovis* aislada por Nocard, a partir de una vaca con mastitis tuberculosa. Esto lo consiguieron mediante el cultivo de este microorganismo cada 3 semanas en un medio glicerinado que contenía papa, bilis y carne. Después de 13 años y 230 sub-cultivos esta cepa perdió su virulencia (Huebner, 1996; Berh y Small, 1999). Desde entonces esta vacuna se ha administrado a más de un billón de infantes en 182 países. A partir de la cepa original del Instituto Pasteur, ubicado en Lille Francia, se produjeron varias cepas hijas (Huebner, 1996).

Los estudios realizados al genoma de la BCG han mostrado que la región de diferencia 1 (RD1), presente en *M. bovis* y *M. tuberculosis*, está ausente en todas las cepas de BCG, hecho que explica la atenuación de la vacuna (Berh y Small, 1999; Fine *et al.*, 1999; Neill *et al.*, 2005). La región RD1 codifica al sistema de secreción tipo VII conocido como ESX-1, que comprende 9 genes (*Rv3871-Rv3879c*) de los cuales *Rv3874* y *Rv3875* sintetizan a la proteína de filtrado de cultivo 10 (CFP-10) y la proteína de secreción temprana de 6 kDa (ESAT-6) respectivamente (Liu *et al.*, 2009). En el año 1927 en las cepas de BCG, ocurre la pérdida de la región RD2 que contiene al gen *Rv1980c*, el cual sintetiza a la proteína MPB64 (Murphy *et al.*, 2008). Asimismo ocurre una mutación en el gen *Sigk*, afectando la producción de proteínas como MPB70 y MPB83, las cuales sólo se expresan en pequeñas cantidades en cepas adquiridas después de esta fecha. Una mutación en *phoP* un gen encargado de regular a varios genes involucrados en la producción de proteínas inmunogénicas, las cuales contribuyen con la reactividad a la prueba de tuberculina y conllevan a una menor conversión de esta prueba en algunas cepas (Liu *et al.*, 2009).

Al ser aplicada la vacuna BCG induce una respuesta inmune mediada por células, que disminuye el grado de infección manifestándose menor tamaño de las lesiones, con una menor cantidad de UFC dentro de éstas y una menor diseminación de la infección a otros órganos (Wedlock *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la vacuna BCG da una protección significativa, pero ésta solo permanece por un periodo de tiempo limitado en humanos, pues disminuye conforme avanza el tiempo (Milián *et al.*, 2003; PHAC, 2007), además su aplicación no evita la infección y no protege a los infectados previamente a la vacunación (PHAC, 2007; Liu *et al.*, 2009). Por otra parte, en los experimentos que han utilizado modelos animales, solo se ha evaluado la protección a corto plazo con la esperanza de que la respuesta de memoria sea de larga duración (Doherty y Andersen, 2005).

La protección inducida por la vacuna se corrobora mediante la producción de IFN- γ , ya que se observa un aumento de producción entre 2 -4 semanas de

aplicada la vacuna; en cuanto a la reactividad a la prueba de tuberculina, aparece a las 2 semanas con una respuesta máxima entre 6 a 12 semanas (Huebner, 1996; Skinner *et al.*, 2001).

La eficacia de esta vacuna en humanos, se ha evaluado mediante diferentes estudios, como son estudios clínicos y estudios de casos y controles; sin embargo, ambos métodos han tenido marcadas discrepancias, con grados de protección del 0 al 80 % (Fine *et al.*, 1999; Gingsberg, 2002; Franco-Paredes *et al.*, 2006; PHAC, 2007; Liu *et al.*, 2009). Por su parte, los estudios de meta-análisis han mostrado una alta eficacia de la vacuna BCG en contra de la meningitis tuberculosa y la presentación miliar, pero solo se ha visto un 50 % en la eficacia global en humanos (Caminero, 2003; Aronson *et al.*, 2004). En cuanto al ganado bovino, estudios realizados en el Reino Unido de 1940 a 1950 en 4 hatos, mostraron a la necropsia que el 25 % de los bovinos vacunados tenían lesiones, en contra de un 50 % en los controles. De igual forma, estudios en Malawi encontraron un 16 % de animales con lesiones, en los bovinos vacunados y un 50 % en los controles (Ellwood y Waddington, 1972). Estudios realizados más recientemente en bovinos, en donde han comparado a las cepas Pasteur y Danesa a dosis 1×10^6 UFC, han encontrado diferentes cinéticas de producción de IFN- γ , pero protección similar entre las cepas usadas (Wedlock *et al.*, 2007). Así como estudios realizados bajo condiciones de campo en Etiopia, utilizando la cepa Danesa a una dosis 1×10^6 donde se reporto una eficacia vacunal del 56 % a la necropsia (Ameni *et al.*, 2010), mientras que un estudio similar realizado en Baja California México, usando la cepa Tokio a una dosis 1×10^6 , encontraron una eficacia vacunal del 59.4 % (Lopez-Valencia *et al.*, 2010).

Existen diversas razones para explicar la variabilidad en la eficacia de la vacuna BCG, podemos mencionar a la cepa de BCG utilizada (Castillo-Rodal *et al.*, 2006), la dosis administrada (se ha demostrado que las dosis bajas que van de 10^3 - 10^6 UFC son mejores) (Skinner *et al.*, 2001), el número de bacilos viables en la vacuna (Huebner, 1996), la sensibilización con otras micobacterias (Skinner *et al.*, 2001; Doherty y Andersen, 2005; Castillo-Rodal *et al.*, 2006) como *M.*

fortuitum, *M. kansasii* y/o *M. avium* (Fine *et al.*, 1999) o la infección previa a la vacunación con *M. bovis*, todo lo cual, da como resultado una protección limitada (Hope y Villareal-Ramos, 2008).

La desventaja principal del uso de la vacunación con la BCG en el ganado bovino, es que puede haber interferencia al hacer el diagnóstico mediante la prueba de tuberculina (Hope y Villareal-Ramos, 2008), la cual es la prueba oficial de diagnóstico de TBb en México (NOM, 1995), aunque se ha visto que una reacción positiva a la prueba de tuberculina, no es sinónimo de protección en individuos vacunados (Caminero, 2003). Puede haber efectos indeseados, aunque esto solo se han presentado al aplicar dosis muy altas (10^8 - 10^9) manifestándose como inflamación severa en el sitio de aplicación, fiebre, anorexia, depresión, tos, respiración aumentada, descenso en la producción láctea y linfadenitis cervical (Murphy *et al.*, 2008) y su relación costo-beneficio deberá ser evaluada (Caminero, 2003).

Un estudio realizado en México con ratones y utilizando distintas cepas de BCG, mostró que las cepas obtuvieron distintos resultados en cuanto a cantidades de UFC aisladas por órgano y una menor área de lesiones neumónicas en pulmón a la necropsia, además de una respuesta de hipersensibilidad tardía moderada en algunas de ellas. La cepa Phipps mostró buenos resultados en cuanto a la protección conferida, además no presentó una reacción fuerte a la hipersensibilidad tardía (Castillo-Rodal *et al.*, 2006).

Extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE)

Los filtrados de cultivo contienen componentes de la autólisis y son principalmente una mezcla de proteínas secretadas al medio de cultivo por las micobacterias vivas (Hope y Villareal-Ramos, 2008). Investigaciones mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), mostraron que en los CFPE hay 35 bandas en un rango de 23-80 kDa (Rennie *et al.*, 2010). Los principales antígenos de *M. bovis* presentes en los CFPE son las proteínas de choque térmico: 70 kDa o DnaK, 65 kDa o GroEL, 16 kDa y 12 kDa o

GroES o MPB57; proteínas de secreción como ESAT-6, CFP-10, 32 kDa, 30 kDa, MPB64 y MPB70; proteínas asociadas a carbohidratos (glicoproteínas): 39 kDa, 38 kDa, 25 kDa y 19 kDa (WHO, 1994.138).

Los CFPE comenzaron a estudiarse como una alternativa en la vacunación contra la TBb, pues entre sus propiedades está la de no interferir con la prueba de tuberculina y al parecer no se ven afectados por la exposición previa a micobacterias ambientales, que resultan ser factores positivos en comparación con la vacuna BCG, además que contienen antígenos altamente estimulantes (Wedlock *et al.*, 2000).

Los resultados de investigaciones en donde se ha utilizado a los CFPE, han mostrado diferentes resultados. Por una parte, estudios en modelos con ratones y cobayos revelaron que estos antígenos son capaces de inducir protección en modelos de infección vía aerógena contra *M. bovis* y *M. tuberculosis*, donde hubo una menor presencia de lesiones tuberculosas en pulmón, sin reactividad a la prueba de tuberculina (Wedlock *et al.*, 2000; Buddle *et al.*, 2003), pero hay que mencionar que requieren de una fuerte inducción de la respuesta inmune celular, dada por un buen adyuvante, como es el bromuro dimetil dioctadecil amonio (DDA), evaluado en modelos murinos experimentales, bajo condiciones controladas, manifestando una respuesta similar a la BCG, con una menor cantidad de micobacterias presentes en pulmón y bazo, con una alta expresión de IFN- γ (Andersen, 1994).

Por otra parte, hay estudios en que estas vacunas de subunidades protéicas, han mostrado menor o ninguna protección contra la tuberculosis, obteniendo mejores resultados con la aplicación de la BCG (Hope y Villareal-Ramos, 2008).

Sin embargo, en animales vacunados, se ha encontrado una tendencia a formar lesiones extra torácicas de tuberculosis. A pesar de todo, se tiene la confianza de que este tipo de vacuna funcionará mejor al ser aplicarlas junto con vacunas de ADN (Wedlock *et al.*, 2000).

Mycobacterium vaccae

M. vaccae es una micobacteria de rápido crecimiento, no patógena, que se encuentra en el medio ambiente. Se ha recomendado como inmunoproláctico contra la tuberculosis junto con antibióticos en humanos (Kaufmann *et al.*, 2010).

Se ha experimentado con *M. vaccae* como una bacterina inactivada por calor, sumamente segura a diferencia de las vacunas vivas atenuadas, para aplicarse en individuos VIH positivos (Ginsberg, 2002). Es importante notar que se desconocen sus mecanismos de efecto, aunque se ha propuesto que hay reconocimiento inmune de los antígenos comunes de las micobacterias, que inducirán una respuesta inmune mediada por células (Skinner *et al.*, 2001).

Se han reportado resultados distintos en diferentes estudios, en ratones, con *M. vaccae* inactivada a dosis 1×10^4 , indujo una activación de la subpoblación Th1 y se presentó un control eficiente de la enfermedad acompañada de una respuesta alta a la hipersensibilidad tardía, mientras que administrada a dosis más altas como 1×10^5 , indujo una respuesta de rápida progresión de la enfermedad y muerte al desafiar a los ratones con *M. tuberculosis* H37Rv (Hernández *et al.*, 2004).

Otros estudios realizados en becerros utilizando a *M. vaccae* inactivada por calor y administrada vía subcutánea, mostraron que no hubo protección al momento de retar a los animales y comparar con los controles (WHO, 1994.138; Buddle *et al.*, 2003). Investigaciones realizadas en tejones y zarigüeyas tampoco mostraron buenos resultados, no obstante, al aplicar a *M. vaccae* en combinación con la BCG se obtuvieron buenos resultados (Skinner *et al.*, 2001).

Vacunas de ADN

Este tipo de vacunas parte del principio de aplicar ADN de micobacterias que codifique antígenos de éstas y es insertado en vectores como son los plásmidos. Posteriormente, este ADN es incorporado a las células musculares de un hospedador inmunocompetente, al cual se ha inoculado y sintetizarán las

proteínas micobacterianas que inducirán una respuesta inmune, por medio de la presentación de estos antígenos a los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ (Fine *et al.*, 1999; Huygen, 2003).

Estas vacunas ha mostrado potencial contra la tuberculosis en modelos murinos, pues estimulan la respuesta de IFN- γ , por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y de células de memoria. Las vacunas de ADN que expresan a las proteínas MPB70 y MPB83 han mostrado una marcada respuesta por parte de linfocitos T CD4⁺, inmunidad humoral hacia la IgG1 y una ligera respuesta de IFN- γ al PPD, sin mostrar reacción a la prueba de tuberculina (Buddle *et al.*, 2003).

Ya se está trabajando en modelos que aplican una vacuna ADN y posteriormente se aplica un refuerzo con una vacuna viva atenuada (Franco-Paredes *et al.*, 2006). Como ejemplo de este protocolo se han llevado a cabo estudios, con buenos resultados, donde se aplicó una vacuna que expresa a las proteínas Hsp65, Hsp70 y Apa, posteriormente vacunaron con BCG, esta investigación se realizó en becerros previamente sensibilizados por micobacterias ambientales, en los cuales la vacunación con BCG no llega a dar una protección completa, de esta manera se han observado resultados superiores que con la aplicación de la vacuna de ADN sola (Skinner *et al.*, 2003).

Este esquema ADN/BCG ofreció buenos resultados al comparar al grupo vacunado con el grupo control, manifestándose como una reducción en el número de animales con lesiones pulmonares, menor número de animales con lesiones en linfonodos y menor grado de lesiones en linfonodos por animal (Skinner *et al.*, 2003).

Vacunas recombinantes

Este tipo de vacunas se dividen en 2 grupos: las compuestas por subunidades proteicas de uno o más componentes micobacterianos, las cuales inducen inmunidad protectora y que son actualmente los candidatos más probados, algunas pocas también utilizan lípidos o subunidades de carbohidratos, y por otra

parte, aquellas que utilizan vectores como el virus vaccinia, poxvirus y micobacterias atenuadas (Ginsberg, 2002).

Ejemplos de estas vacunas son la 72f que es una fusión de 2 proteínas de la familia PPE (Rv1196 y Rv0125), desarrolladas por Corixa y GSK, otra es la Ag85B-ESAT-6 (H1-CAF01) que contiene al adyuvante IC31 desarrollado por el “Statens Serum Institute” (Kaufmann *et al.*, 2010), de la cual hay una presentación para administrarse intranasalmente LTK63, la cual utiliza una enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (Doherty y Andersen, 2005).

Existen otras vacunas basadas en vectores recombinantes vivos como la BCG, modificándola o inactivando genes para reducir su reactividad a la prueba de tuberculina, o bien, para sobreexpresar proteínas inmunodominantes; o también hay cepas atenuadas de *M. bovis*, a las que se les han retirado genes relacionados con la virulencia o que codifican enzimas de vías metabólicas esenciales (Buddle *et al.*, 2003).

Otras vacunas de este tipo que han partido de mejorar a la BCG son: rBCG30, que sobre expresa el antígeno 85B (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Kaufmann *et al.*, 2010); BCG::RD1 una BCG a la que se le ha reintroducido el locus RD1; las rBCG:: Δ ureC-Ilo⁺ y rBCG Δ ureC:Hly, mutantes deficientes en ureasa que expresan el gen de listeriolisina O, la cual es menos virulenta incluso que la BCG, estimulará a la subpoblación celular Th17 (Kaufmann *et al.*, 2010).

Así pues, se prueban vacunas de *M. tuberculosis* carentes del locus RD1 bajo la hipótesis de atenuarla y que persistirá por más tiempo en el organismo, estimulando la respuesta inmune protectora en cierta forma de un modo más fuerte que la BCG (Ginsberg, 2002).

También esta es una mutante de *M. tuberculosis* Δ phoP/R (MTBVAC01) la cual han sido atenuada; la MVA-85A, una vacuna en la cual se ha utilizando el virus vaccinia para que exprese el antígeno 85A (Franco-Paredes *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2009); la Ad85A utilizando un adenovirus que expresa al antígeno 85 ha dado buenos resultados en protocolos de primo vacunación-

refuerzo, al utilizarla junto con la BCG en bovinos (Vordermeier *et al.*, 2009); FP9, un poxvirus que también expresa el antígeno 85A (Doherty y Andersen, 2005).

Estudios epidemiológicos para evaluar la eficacia de vacunas

La epidemiología utiliza los métodos estadísticos para cuantificar la ocurrencia de eventos relacionados con la salud. En otras palabras, las medidas de la frecuencia de enfermedad en una población son utilizadas para describir la incidencia y la prevalencia. Las medidas de riesgo son requeridas para predecir la probabilidad de riesgo de algún evento, por ejemplo de enfermedad, como son el riesgo relativo y la razón de momios. El riesgo relativo es la proporción de la incidencia del resultado de interés entre los expuestos y los no expuestos (Schmidt y Kohlmann, 2008).

El estudio ideal para evaluar vacunas es un estudio clínico con individuos susceptibles a enfermarse, aleatorio y doble ciego, en el cual la mitad de los individuos reciben la vacunación y a la otra mitad recibe un placebo. Se realiza un seguimiento prospectivo para determinar las tasas de ataque en vacunados y no vacunados. Deben considerarse 4 factores que afectan la eficacia vacunal en los estudios epidemiológicos: definición de un caso, la detección correcta de casos, determinación del estatus vacunal e igualdad de exposición a la enfermedad (Orenstein, *et al.*, 1985).

Por definición, la eficacia es la habilidad de una vacuna para prevenir la enfermedad, y así, la efectividad, mide la capacidad de un programa de vacunación para prevenir una enfermedad. Esta última está dada por la eficacia vacunal y por el tipo de riesgo existente dentro de la población; es decir, si el riesgo es bajo o alto (Comstock, 2000).

La eficacia de una vacuna depende de su potencia, una administración adecuada de la misma y que el individuo sea capaz de responder; puede ser calculada mediante medidas epidemiológicas utilizando la tasa de ataque de la

enfermedad en la población vacunada y no vacunada mediante la siguiente fórmula (Orenstein *et al.*, 1985):

$$EV = \left(\frac{TANV - TAV}{TANV} \right) \times 100$$

EV= Eficacia vacunal.

TANV= Tasa de ataque en no vacunados.

TAV= Tasa de ataque en vacunados.

En cuanto a la BCG, se han propuesto 3 tipos de estudio para evaluar su eficacia vacunal: estudios aleatorizados, no aleatorizados y estudios observacionales (Comstock, 2000). De estos, el mejor es el aleatorizado debido a que la exposición está controlada por el investigador y la aleatorización provee similitud entre los grupos de tratamiento, proporcionando estimaciones válidas para los métodos de inferencia estadística (Kuehl, 2001), además de la inclusión de un grupo control. Los ensayos no aleatorios son los menos aceptables pues no se conoce qué factores son diferentes dentro de las poblaciones.

Por último los estudios de casos y controles son los más recomendados en sustitución de los estudios aleatorizados (Comstock, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

La salud animal tiene una relación estrecha con la salud de los humanos, debido a que el consumo de productos y subproductos lácteos o cárnicos derivados de animales infectados con TBb, representa un factor de riesgo para la población humana.

Por lo que es indispensable mantener la salud animal, con la finalidad de evitar la transmisión de enfermedades como la TB, por vía directa o de productos de origen animal a la población.

Sin embargo, el costo económico que implica la eliminación de reactores mediante los protocolos de la NOM-031-ZOO-1995, los cuales consisten en aplicar la prueba de tuberculina y el posterior sacrificio de los reactores, no es del todo viable dentro de los hatos lecheros con alta prevalencia de esta enfermedad, lo mismo que en el caso de hatos que no pueden reponer animales con su recría, pues se verían en la necesidad de repoblar con animales provenientes de otros hatos, de los cuales se desconoce su situación de TBb, además de sumar el gasto que implica adquirir reemplazos. Pues el valor de una vaquilla próxima a parto implica un aproximado de 2,000 dólares, además que en algunas explotaciones se llega a presentar hasta un 50% de reactores a la prueba de tuberculina, sin considerar a los animales anérgicos que pueden escapar de esta prueba, lo cual mantiene la enfermedad dentro de la explotación, presentándose a la siguiente prueba nuevos casos de animales reactores, lo cual conlleva a una despoblación del hato a causa de eliminar a los individuos reactores y la inversión para reponer a estos animales.

Por lo tanto, evaluar diferentes inmunógenos contra la TBb en hatos de alta prevalencia, es de gran importancia con el fin de conocer qué tan útiles pueden ser en el control de la TBb, bajo condiciones de campo.

3. HIPÓTESIS

Al evaluar los diferentes inmunógenos, los animales inmunizados, mostraran una menor frecuencias de casos a TBb y menor grado de diseminación de lesiones compatibles a TBb, en comparación con los animales no inmunizados y en los grupos de becerras vacunadas, se presentará una respuesta inmune debida a la vacunación.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar diferentes inmunógenos en el control de la TBb en un hato con alta prevalencia de esta enfermedad.

Objetivos particulares

Primera parte: estudio retrospectivo

- 1) Determinar la prevalencia de TBb en el hato de estudio, al inicio y durante la realización del programa de control con inmunización, buscando si se presentó una disminución en la prevalencia debido a esta medida.
- 2) Comparar la frecuencia de casos de TBb, en los animales inmunizados (BCG, CFPE y *M. vaccae*) y los no inmunizados del hato, determinando si hubo menos casos de TBb.
- 3) Con los resultados de las frecuencias de casos de la prueba de tuberculina y a la necropsia se obtendrá y se evaluará la eficacia vacunal de cada inmunógeno.
- 4) Comparar el grado de diseminación de lesiones compatibles a TBb en los diferentes grupos de estudio.
- 5) Utilizar el inmunógeno con mejores resultados en la segunda etapa del estudio.

Segunda parte: estudio prospectivo

- 1) Determinar si se presenta una respuesta inmune generada por la aplicación de la BCG Phipps a 2 diferentes dosis aplicadas, con respecto al grupo control, midiendo la producción de la citocina IFN- γ , anticuerpos e hipersensibilidad tardía.
- 2) Diferenciar si el tipo de respuesta inmune observada se atribuye a infección o a la inmunización.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del lugar de trabajo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias (CENID) en Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La parte correspondiente al trabajo de campo se realizó en el Complejo Agro-Industrial Tizayuca (CAIT), ubicado en el municipio de Tizayuca, estado de Hidalgo, México, a 52 km de distancia del D.F., con coordenadas geográficas 19° 50' latitud norte y 98° 59' de longitud oeste, a una altura de 2,260 metros sobre el nivel del mar, con un clima BS1k, según la clasificación de Köppen, que corresponde predominante a un clima semi-seco templado con lluvias de Junio a Septiembre.

El CAIT cuenta con hatos especializados en la producción intensiva de leche principalmente de la raza Holstein-Friesian. Sus instalaciones son de tipo semi-tecnificadas y con un rango de prevalencia a TBb del 2 al 50 %.

Metodología primera parte del estudio: evaluación retrospectiva de 3 diferentes inmunógenos

En la primera parte se realizó un estudio observacional, retrospectivo, longitudinal y descriptivo, que corresponde a una revisión de casos, en un hato con alta prevalencia de TBb (28 %), en donde se había establecido previamente un programa de inmunización en las nacencias utilizando 3 tipos diferentes de inmunógenos (BCG Phipps, CFPE y *M.vaccae*).

El estudio se condujo mediante la revisión documental de resultados de la prueba de tuberculina y los expedientes de necropsias, que fueron realizados durante 4 años en el hato de estudio, con la finalidad de evaluar la prevalencia, la frecuencia de casos a TBb y se determinó la eficacia vacunal, así como el grado de lesiones compatibles a la necropsia con ésta enfermedad, entre los 3 grupos inmunizados y los animales no inmunizados.

Descripción del hato y medidas de control realizadas durante el programa de inmunización

En esta unidad de producción se implementó un programa para el control de la TBb, aplicando las siguientes medidas: inmunización de las becerras nacidas en el establo, segregación de animales reactivos a la prueba de tuberculina a una unidad destinada para tal fin, el calostro provenía de vacas negativas a la prueba de tuberculina con el que se alimentaban las becerras y su alimentación posterior era con sustituto de leche.

El programa de control con inmunización comenzó en mayo del 2005 y tuvo continuidad hasta diciembre del 2008, con una prevalencia al inicio en los animales en producción del 28 %, mientras que en las becerras de recría fue de un 5.3 % de TBb, calculadas mediante la prueba de tuberculina cervical comparativa.

Flujo de los animales dentro del hato

Las becerras se mantenían en el establo donde se alimentaban con sustituto de leche hasta su destete (10 a 12 semanas de edad) y posteriormente eran enviadas a las instalaciones de recría. En ese lugar se les realizaba la prueba de tuberculina a una edad de 6 a 12 meses, en esta área permanecían hasta el momento del parto (24 meses de edad) y posteriormente se enviaban de regreso al establo para su ordeño.

Una vez en el establo los animales se monitoreaban mediante la prueba de tuberculina cada 6 meses y los que resultaban reactivos a la prueba eran separados de los animales sanos y enviados a una unidad destinada para segregación.

Inmunógenos utilizados

La *M. bovis* BCG cepa Phipps a dosis de 1×10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) en 1.5 ml de solución buffer de fosfatos (PBS) estéril, fue cedida por la

Doctora Clara Inés Espitia Pinzón del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (IIBm-UNAM).

El CPFE de *M. bovis* cepa AN5 a una concentración de 300 µg de proteína, donado por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), suministrado en 1.5 ml de PBS estéril, obtenido de acuerdo a la metodología descrita por Díaz *et al.* (2003).

La recombinante *M. vaccae*, que tiene insertado el gen *psts-1* de *M. tuberculosis*, que expresa el antígeno de 38 kDa, utilizada a una dosis de 1×10^4 UFC en 1.5 ml de PBS estéril, donada por la Doctora Clara Inés Espitia Pinzón del IIBm-UNAM.

Animales

Un total de 306 becerras raza Holstein-Friesian nacidas de noviembre de 2004 a enero de 2007, inmunizadas entre 1 y 5 meses de edad aplicando 3 tipos diferentes de inmunógenos vía subcutánea en el cuello, distribuidas de la siguiente forma: 98 con BCG cepa Phipps, 106 con CFPE, 102 con *M. vaccae*; mientras que 48 becerras nacidas en el establo no inmunizadas y 143 becerras negativas a la prueba de tuberculina, compradas por el propietario, componen al grupo no inmunizado.

Pruebas y cálculos estadísticos utilizados

La determinación de la prevalencia mediante la prueba de tuberculina cervical comparativa, al inicio de la inmunización fue necesaria, con el fin de establecer un punto de referencia, y considerar a partir de allí el impacto del programa de control que incluyó a la inmunización en la prevalencia dentro del hato. La determinación de las frecuencias de casos positivos de cada prueba de tuberculina fue realizada en el establo y en el centro de recría, con la finalidad de observar el comportamiento a lo largo del programa de inmunización y para determinar si hubo diferencias entre las frecuencias de casos positivos de TBb en los grupos de estudio.

Con la información de los expedientes de necropsias, se evaluaron las frecuencias de animales con lesiones compatibles a TBb, del establo en programa de control y del establo de segregación, a partir de la fecha en que comenzó la inmunización.

Una vez obtenidas y ordenadas las frecuencias de casos de TBb de la prueba de tuberculina y de las necropsias de cada grupo de estudio, se calcularon las proporciones y porcentajes de animales con TBb de cada grupo, y se procedió a realizar la prueba Chi² de homogeneidad con la finalidad de determinar si hubo diferencia entre los grupos de estudio.

La eficacia vacunal se obtuvo a partir de las proporciones de animales reactivos a TBb y con lesiones sugerentes de esta enfermedad, calculando las tasas de ataque mediante la fórmula descrita por Orenstein *et al.* (1985), en los grupos de estudio.

$$EV = \left(\frac{TANV - TAV}{TANV} \right) \times 100$$

EV= Eficacia vacunal

TANV= Tasa de ataque en no vacunados

TAV= Tasa de ataque en vacunados

Programas estadísticos utilizados

Los programas JMP versión 5.0.1 y Epi Info, fueron utilizados para la realización de las pruebas Chi² de homogeneidad a partir de los datos obtenidos de los expedientes de las pruebas de tuberculina y de necropsias.

Metodología segunda parte del estudio: inmunización con BCG cepa Phipps a diferentes dosis y evaluación de la inmunidad celular y humoral

Descripción del hato

El estudio prospectivo se llevó a cabo en otro hato de alta prevalencia de TBb, propiedad de otro ganadero, con un 40 % en animales en producción y 5 % en

becerras de recría, ubicado en el CAIT. Se aplicó solamente la vacuna BCG cepa Phipps, la cual obtuvo los mejores resultados, en cuanto a una menor frecuencia de casos positivos a TBb y a la mejor eficacia vacunal medida con la prueba de tuberculina y a la necropsia, determinada en el estudio previo; en 3 grupos de becerras alojadas en un establo de segregación, junto a los animales positivos a TBb, por lo tanto existía una alta probabilidad de que las becerras se infecten y se logre un desafío natural a la infección.

Vacuna y dosis utilizadas

La *M. bovis* BCG cepa Phipps se aplicó en dosis 1×10^4 UFC y 1×10^6 UFC en 1 ml, las cuales fueron preparadas en el laboratorio de inmunología del CENID-Microbiología del INIFAP, a partir de la cepa donada por la Doctora Clara Inés Espitia Pinzón del IIBm-UNAM.

Animales

Se utilizaron becerras Holstein-Friesian, las cuales fueron inmunizadas entre los 8 a 15 días de edad. La vacuna se aplicó vía subcutánea en la tabla del cuello.

Determinación del tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de muestra, se empleó el programa Win Episcope para 2 diferentes proporciones, utilizando las proporciones de la prevalencia de TBb dentro del hato en producción (0.40) y la proporción de la prevalencia a TBb en becerras (0.05), con una confianza del 90 % y una potencia del 80 %, obteniéndose como resultado 11 animales por grupo con la decisión de dejar un animal más, para reponer a los individuos que pudieran perderse durante el estudio.

Grupos de estudio

Se realizó la aplicación de un diseño completamente aleatorizado, mediante el uso de una tabla de números aleatorios, asignando a las becerras a los grupos conformados de la siguiente manera:

Grupo 1: 12 becerras vacunadas con BCG cepa Phipps a una dosis de 1×10^4 UFC

Grupo 2: 12 becerras vacunadas con BCG cepa Phipps a una dosis de 1×10^6 UFC

Grupo 3: 12 becerras inoculadas con solución salina de fosfatos estéril (PBS) como control

Pruebas de laboratorio

Prueba de IFN- γ

Se empleó el kit comercial BOVIGAM™ de Prionics y se aplicó de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante. (Consultar el anexo 10.3: reactivos y soluciones utilizadas en las pruebas de laboratorio).

- La muestra de sangre completa, se obtuvo de la vena yugular en tubos vacutainer con heparina (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA).
- Los siguientes antígenos fueron usados para la prueba de detección de IFN- γ : PPD bovino, PPD aviar, la proteína recombinante CFP-10 (P. Andersen, Staten Serum Institut) y el mitógeno *Phytolacca americana* (pokeweed) (Sigma St Louis, MO USA).
- Se tomaron alícuotas de 1,000 μ l de sangre completa con heparina, agregadas en 5 pozos por animal, en placas de cultivo de 48 pozos (Nunclon, Roskilde Danmark).
- En el primer pozo se agregaron 67 μ l de PPD bovino (3,250 UI/ml), en el segundo pozo 67 μ l de PPD aviar (3,250 UI/ml), en el tercer pozo 4 μ l de

CFP-10 (4 µg/ml), en el cuarto pozo 10 µl de pokeweed (10 µg/ml) y el quinto pozo quedó como control sin estimular. Tras estimular los cultivos de sangre bajo condiciones de esterilidad, se incubaron a 37 °C, en una atmosfera de 5 % de CO₂ durante 24 horas.

- Los plasmas, se colectaron y se congelaron a -70 °C.
- Se procedió a descongelar los plasmas y se agregaron a las placas ya sensibilizadas para la detección de IFN-γ suministradas por el kit, del mismo modo los controles positivo y negativo, colocando 50 µl de diluyente para plasma al 0.01 % por pozo y la misma cantidad de plasma, se homogeneizó por una hora.
- Posteriormente se decantó y se dieron 5 lavados con solución para lavado.
- Después, se agregaron 100 µl de conjugado (concentración 100X Horseradish peroxidase labelled anti-bovine IFN-γ), a 10 ml de buffer para conjugado por placa. De esta solución se agregaron 100 µl por cada pozo y se procedió a homogeneizar por 1 hora. Posteriormente se decantó y de nueva cuenta se lavó la placa 5 veces.
- Se agregaron 10 ml de buffer enzima-sustrato, añadiéndose además 100 µl de cromógeno (100X tetrametil bencidina en DMSO). De ésta solución se añadieron 100 µl por pozo y se incubó sin luz por 10 minutos. Pasado este tiempo se agregó un volumen de 50 µl de solución de paro (H₂SO₄ 0.5 M) por pozo.
- Las absorbancias de las muestras se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (BIO RAD, Hercules, CA USA).
- Se procedió a evaluar las D.O. obtenidas. Una becerra fue considerada positiva cuando el valor de D.O., obtenido del promedio del PPD bovino – el promedio del control no estimulado fue ≥ 0.1 y además el promedio del PPD bovino – el promedio de PPD aviar fue ≥ 0.1 de acuerdo a lo estipulado en el kit. Para el antígeno CFP-10 se tomo el criterio de acuerdo a lo realizado por López-Valencia *et al.*, (2010).

Prueba de ELISA

Para la prueba de ELISA se emplearon como antígeno los CFPE de *M. bovis* cepa AN5 y de *M. avium* cepa D4, donados por PRONABIVE, obtenidos de acuerdo a la metodología descrita por Díaz *et al.* (2003). (Consultar el anexo 10.3: reactivos y soluciones utilizadas en las pruebas de laboratorio).

- El primer paso fue sensibilizar las placas (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp) de 96 pozos, con los antígenos a una concentración de 1.5 µg de CFPE/100 µl por pozo, en solución de pegado (buffer de carbonatos 0.06 M pH 9.6).
- Se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación las placas se lavaron 3 veces con solución de lavado (buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4 con NaCl y 0.1 % de Tween 20) y se bloquearon los sitios no ocupados con la solución de bloqueo (1.5 % de leche descremada en buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4 y 0.1 % de Tween 20) durante 1 hora a una temperatura de 37 °C (Díaz *et al.*, 2003).
- Las placas se lavaron 5 veces y se añadieron 100 µl de sueros diluidos 1:100 en buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4 y 0.01 % de Tween 20 y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se volvió a lavar por 5 veces con solución de lavado.
- A continuación en cada pozo se agregaron 100 µl de anti-IgG bovino y proteína G 1:10,000, P-8170, recombinant protein conjugated with peroxidase (Sigma St Louis, MO USA), en solución buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.4 con Tween 20 0.1 %, se incubó por 1 hora a 37 °C, y posteriormente se lavaron 5 veces.
- Se agregó a cada pozo 100 µl de solución de revelado (buffer de citratos con pH 4.5, ortofenildiamida 4 µg y peróxido de hidrogeno 3 %).
- Las placas se incubaron por 4 minutos a 37 °C. Se aplicó la solución de paro (H₂SO₄ 2 M), 50 µl por pozo y se colocaron en el lector de densidades ópticas para ELISA (BIO RAD Hercules, CA USA) a 492 nm (Díaz *et al.*, 2003).

Prueba de tuberculina cervical comparativa

Esta se realizó de acuerdo a lo señalado en la NOM-031-ZOO-1995.

Prueba de PCR

La búsqueda de *M. bovis* fue mediante la prueba de PCR con muestras de moco nasal de los grupos de becerras en estudio. (Consultar el anexo 10.3: reactivos y soluciones utilizadas en las pruebas de laboratorio).

Extracción de ADN:

- Se colectó una muestra de exudado de la cavidad nasal de las becerras en estudio, utilizando hisopos estériles, que fueron sumergidos en 5 ml de PBS estéril (buffer de fosfatos 0.01 M, pH 7.4). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.
- La extracción de ADN se realizó de la siguiente manera: primero se centrifugó 1 ml del sedimento de la muestra de exudado nasal a 12,875 g por 5 minutos; se decantó el sobrenadante y se agregaron 400 µl de TE (100 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM EDTA) y 50 µl de lisozima (Sigma St Louis, MO USA) (100 mg/ml de agua destilada) por una hora a 37 °C.
- Se añadieron 70 µl de SDS al 10 % y 5 µl de proteinasa K (Carlshad CA USA) (10 mg/ml) por 20 minutos a una temperatura de 65 °C.
- Posteriormente, se añadieron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB/NaCl (4.1 g de NaCl, 10 g de CTAB y 80 ml de agua destilada), precalentado a 65 °C, se incubó por 10 minutos a 65 °C.
- Se utilizaron después 750 µl de cloroformo-alcohol isoamílico en un volumen 24:1 y se volvió a centrifugar a 12,875 g por 5 minutos. En seguida, se recuperó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo (600 µl).
- Acto seguido, se adicionaron 0.6 del volumen (360 µl) de alcohol isopropílico absoluto y se dejó por 30 minutos a -20 °C.

- Se centrifugó a 12,875 g durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol 70 % frío (-20 °C).
- Nuevamente se centrifugó a 12,875 g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para finalizar, se suspendió el ADN en 50 µl de agua inyectable y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

El análisis de integridad del ADN, se efectuó descongelando las muestras y se dejaron durante 10 minutos a baño maría serológico, a una temperatura de 56 °C. Una vez hecho esto, se preparó un gel de agarosa al 1 % añadiendo bromuro de etidio y usando el TE como buffer de electroforesis. Se cargaron 5 µl de las muestras por pozo y el ADN migró durante 1 hora a 90 volts. El ADN se observó con un transiluminador de geles Epi Chemi II Darkroom (BioImaging Systems Upland, CA USA).

La cuantificación del ADN, se realizó, primero al descongelar las muestras, que se colocaron a baño maría serológico durante 10 minutos a 56 °C. Se tomó 1.5 µl de cada muestra y se analizó la concentración de ADN y su pureza con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher, Wilmington, DE USA).

La PCR se realizó de la siguiente forma:

- Se descongelaron las muestras y colocándolas por 10 minutos a baño maría serológico a una temperatura de 56 °C.
- Se utilizaron los iniciadores TB1-F, del cual su secuencia es 5'GAACAATCCGGAGTTGACAA3' y TB1-R con secuencia 5'AGCACGCTGTCAATCATGTA3', que amplifican una región de 372 pb del gen que codifica la proteína de secreción MPB70 del complejo *M. tuberculosis* (Cousins *et al.*, 1992; Estrada-Chávez *et al.*, 2004).
- La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 25 µl empleando 0.5 µl de cada iniciador (0.4 µM), 13.25 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer

10X, 0.5 µl de dNTP (250 µM), 2.5 µl de MgCl₂, 0.25 µl de la enzima Taq polimerasa (Applied Biosystems, Qiagen, GmbH Hilden) (0.5 U) y 5 µl de muestra. En cuanto al control positivo se utilizó el ADN de *M. bovis* de la cepa AN5 y como control negativo agua inyectable.

- Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: precalentamiento a 96°C por 15 minutos, seguido de una fase de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos y fase de alineación e hibridación a 58 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Después de 35 ciclos de amplificación, sigue una fase de extensión final a 72 °C que duró 5 minutos y la fase de enfriamiento a 4 °C que se llevó a cabo en un sistema Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA USA).
- Los productos del PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5 %, y se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), utilizando 10 µl por pozo de cada producto de amplificación, un pozo conteniendo 2.5 µl de peso molecular (Amresco K180-250 UL, 100 pb), y se visualizaron haciendo uso de un transiluminador de geles Epi Chemi II Darkroom (BioImaging Systems Upland, CA USA).

Pruebas estadísticas utilizadas

En los grupos de becerras se determinó la inducción de inmunidad por parte de la vacuna, mediante la cuantificación de los niveles de IFN-γ y de anticuerpos, por medio de la prueba de ELISA midiendo las densidades ópticas (D.O.) a los 0, 15, 30, 60, 90, 150, y 210 días de aplicada la vacuna, con los resultados fue posible conformar una cinética del comportamiento de cada grupo a lo largo de los muestreos.

Además con los resultados obtenidos de la prueba de IFN-γ y ELISA de cada muestreo independientemente, se realizó un análisis estadístico con la prueba de Kruskal-Wallis, en busca de diferencia entre las medianas de los

grupos. Cuando se encontró diferencia, se recurrió a la prueba de Dunn para buscar entre que grupos se dio esta diferencia.

Con las frecuencias obtenidas de los reactores a la prueba de IFN- γ , se comparó entre los diferentes grupos mediante la prueba de χ^2 de homogeneidad, buscando si se presentó diferencia en reactividad dentro de los grupos.

La prueba de tuberculina cervical comparativa fue aplicada a los 90 y 210 días en los 3 grupos de estudio, para evaluar si la vacunación indujo una respuesta de hipersensibilidad tardía y si hubo diferencia entre las frecuencias de reactores a la prueba en los diferentes grupos mediante la prueba de χ^2 de homogeneidad.

En cuanto al diagnóstico de infección en las becerras con *M. bovis*, se buscó determinar si la reacción positiva a la prueba IFN- γ , fue debida a la vacunación o infección, para ello, se incluyó el antígeno CFP-10, que está ausente en la BCG y presente en *M. bovis* para tal fin.

Por otro lado se efectuó la prueba de PCR en muestreos programados a 0, 1, 2, 3, 5, y 7 meses con el fin de determinar si los animales estuvieron en contacto o eliminando a *M. bovis* vía nasal, mediante muestras de moco nasal. Se llevó a cabo la prueba χ^2 de homogeneidad con los resultados de la PCR con el fin de buscar diferencia entre los grupos.

Programas estadísticos utilizados

Se utilizaron los programas JMP versión 5.0.1, para la realización de las pruebas Kruskal-Wallis y prueba de Dunn; Win Episcopa para el cálculo del tamaño de muestra y el programa, Statistica para realizar las graficas de caja y Epi Info en la realización de las pruebas χ^2 .

6. RESULTADOS

Primera parte: evaluación retrospectiva de 3 diferentes inmunógenos: BCG cepa Phipps, CFPE de *M.bovis* y *M. vaccae*

Prevalencia de TBb calculada mediante la prueba de tuberculina

El programa de control de TBb por inmunización de animales inicio en 2005; en los animales alojados en el centro de recría, se observó una prevalencia de 5.3 % en el año 2005, antes del inicio del programa de control de la TBb. En 2008, la prevalencia disminuyó a 3.5 % (Fig. 1).

Mientras que en el hato en producción se alcanzó una prevalencia máxima de 28 % al inicio del programa de control, en 2007, dos años después de la inmunización de los animales, se observó una prevalencia de 3.77 %. Sin embargo, en 2008, la prevalencia subió a 16 %, posterior a la introducción de animales comprados (Fig. 2).

Frecuencias de animales reactivos calculadas mediante la prueba de tuberculina realizada en el centro de recría, en los diferentes grupos de estudio

La frecuencia de reactivos en el grupo inmunizado con *M. vaccae* fue significativamente más alta, en comparación con los otros grupos, con 9.78% de animales positivos, ($p < 0.05$). Cabe mencionar que esta frecuencia fue más alta que la del grupo control, en el cual se observó 4.25 % de animales positivos. Las frecuencias más bajas se encontraron en los grupos inmunizados con CFPE de *M. bovis* y BCG cepa Phipps, con 2.56 % y 2.47 % respectivamente (cuadro 1).

Eficacia vacunal obtenida mediante los resultados de las pruebas de tuberculina realizadas en el centro de recría

A partir de los resultados obtenidos de la frecuencia de reactivos (cuadro 1), se determinó la eficacia vacunal de cada grupo (cuadro 2). El inmunógeno BCG cepa

Phipps mostró la mejor eficacia vacunal con 41.9%, seguida del CFPE de *M. bovis* con 39.7%, mientras que *M. vaccae* obtuvo un valor negativo de -130.1%.

Frecuencias de reactores mediante la prueba de tuberculina en los grupos inmunizados de animales en producción

Las frecuencias de reactores más altas obtenidas a partir de la prueba de tuberculina en animales en producción se observó en animales vacunados, durante el periodo de marzo del 2007 a agosto del 2009, las cuales fueron 14.41 % y 12.29 % para el CFPE de *M. bovis* y *M. vaccae* respectivamente. En el grupo inmunizado con BCG cepa Phipps se observó un 6.1 %, mientras que en el grupo control fue de 9.7 %. Al realizar la prueba de χ^2 , no fue diferente el CFPE de *M. bovis* y *M. vaccae* del grupo control ($p > 0.05$), estos 2 inmunógenos tuvieron un mayor número de reactores en comparación con la BCG cepa Phipps, que fue diferente de ambos inmunógenos ($p < 0.05$) como se observa en el cuadro 3. No se encontró diferencia significativa entre la frecuencia de reactores entre el grupo inmunizado con BGC y los controles ($p > 0.05$).

Eficacia vacunal con las pruebas de tuberculina en los animales en producción

Mediante los resultados de las frecuencias de reactores y sus porcentajes, obtenidos de los animales en producción, se procedió a determinar la eficacia vacunal, mediante los porcentajes (cuadro 3), en el grupo inmunizado con BCG se presentó una eficacia vacunal de 37.11 %, mientras que los grupos inmunizados con CFPE de *M. bovis* y *M. vaccae* obtuvieron resultados negativos del -48.55 % y del -26.7 % respectivamente (cuadro 4).

Frecuencia de lesiones compatibles con TBb presentes en los diferentes grupos de estudio

El número de individuos con lesiones fue mayor en los animales inmunizados con *M. vaccae* con 23.07 %, mientras que los animales inmunizados con BCG tuvieron

una menor frecuencia de lesiones con un 9.09 % y los inmunizados con CFPE de *M. bovis* obtuvieron un 12.5 %. En el grupo control se observó un 12.75 % (cuadro 5). Al realizar la prueba de Chi² no se encontró diferencia entre los grupos de estudio ($p > 0.05$).

Eficacia vacunal obtenida mediante las frecuencias de animales con lesiones compatibles con TBb a la necropsia

Con los porcentajes obtenidos a partir de las frecuencias de lesiones, se calculó la eficacia vacunal. Encontrándose que la más alta eficacia vacunal fue para la BCG cepa Phipps con un 28.7 %. Le siguió el CFPE de *M. bovis* con 1.96% y finalmente *M. vaccae* obtuvo resultados negativos -80.94 % (cuadro 6).

Diseminación de lesiones

Dentro de los resultados obtenidos a partir de los expedientes de necropsias, en los 3 grupos de animales vacunados, se presentó una menor diseminación de lesiones, limitada únicamente a linfadenopatía granulomatosa en 5 casos, distribuidos de la siguiente manera en los grupos de estudio: 1/11 animales inmunizados con BCG cepa Phipps, 1/8 animales inmunizados con CFPE de *M. bovis* y 3/13 animales inmunizados con *M. vaccae*. Mientras en los animales no inmunizados hubo 25/196 casos distribuidos de la siguiente manera: 17 casos de linfadenopatía granulomatosa, 1 caso de mastitis crónica granulomatosa, 3 casos de bronconeumonía crónica granulomatosa y 4 casos de tuberculosis miliar generalizada (cuadro 7).

Segunda parte del estudio: Seguimiento y evaluación de la inmunidad, en
becerras inmunizadas con BCG cepa Phipps a diferentes dosis

Evaluación de la respuesta inmune celular mediante la prueba de IFN- γ

Para determinar la capacidad de proliferación y producción de IFN- γ en los grupos en estudio, se estimuló a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en presencia del mitógeno fitolaca americana (pokeweed), con el objetivo de conocer el estado inmunológico de los individuos y a su vez cómo fue madurando el sistema inmune en cuanto a la producción de IFN- γ . Los resultados obtenidos a lo largo de los muestreos mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p > 0.05$), mostraron una tendencia similar en los 3 grupos de estudio (Fig. 3a).

En el caso de las muestras sin estimular, se comprobó que no hubiese alguna producción de IFN- γ debida a otra fuente de estímulo, los resultados también fueron homogéneos ($p > 0.05$), en los 3 grupos de estudio (Fig. 3b).

El estímulo de las PBMC con los antígenos: PPD aviar, PPD bovino y CFP-10 en el muestreo del día 0, la producción de IFN- γ no mostró diferencia entre los grupos de estudio ($p > 0.05$) (Fig. 4a).

A los 15 días de haber inmunizado a las becerras, hubo un incremento en la producción de IFN- γ para los antígenos PPD aviar y PPD bovino en los grupos inmunizados, siendo significativo ($p < 0.05$) en el grupo 2 (dosis 1×10^6). Mientras que la producción de IFN- γ , usando el antígeno CFP -10 se mantuvo homogénea en los grupos de estudio ($p > 0.05$) (Fig. 4b).

En el muestreo del día 30 se observa la mayor producción de IFN- γ en el grupo 2 al estimular con los antígenos PPD bovino y PPD aviar ($p < 0.05$) (Fig. 4c).

Al muestreo del día 60, el grupo 2 presenta una mayor producción de IFN- γ significativa ($p < 0.05$). Un individuo del grupo 1 (vacunado con dosis 1×10^4) presenta un valor elevado de producción de IFN- γ al estimular con el antígeno CFP-10 (Fig. 4d).

La producción de IFN- γ disminuye en los grupos 1 y 2, acercándose al valor del grupo 3 (control), al muestreo del día 90, para los antígenos PPD aviar y PPD bovino ($p > 0.05$) (Fig. 5a).

Se aprecia un ligero aumento en el grupo 2, al estimular con los antígenos PPD aviar y PPD bovino a los 150 días, que concuerda con la aplicación previa de tuberculina a los 82 días ($p < 0.05$) (Fig. 5b).

En el último muestreo, a los 210 días, los valores de producción de IFN- γ en los grupos de estudio son similares ($p > 0.05$), pero se observa un aumento al estimular con el antígeno PPD aviar en todos los grupos. Es más notable en el grupo 2 (Fig. 5c).

La prueba de Kruskal-Wallis se realizó, en cada muestreo con la finalidad de buscar diferencia entre los grupos, esta diferencia se encontró en los muestreos de los días 15, 30 y 150 para el antígeno PPD aviar y 15, 30, 60 y 150 para el PPD bovino (cuadro 8). Para encontrar entre que grupos de estudio se dio esa diferencia, se realizó la prueba de Dunn, encontrándose que las diferencias sólo fueron entre el grupo 2 y el grupo 3 (cuadro 9).

Se obtuvieron las frecuencias del número de animales positivos a la prueba de IFN- γ , los resultados mostraron que pocos individuos de los grupos 1 (2 animales en el muestreo a los 30 días) y 2 (5 animales en el muestreo a los 30 días) resultaron positivos a la prueba, en comparación con el grupo 3, mediante la prueba de χ^2 se encontró que los grupos fueron homogéneos ($p > 0.05$) (cuadro 11).

Se utilizó el antígeno CFP-10 para distinguir entre los animales positivos a la prueba de IFN- γ , si la producción de esta citocina se debía a la vacunación o a infección de los animales por *M. bovis*, se encontró que un individuo del grupo 2 era positivo. Esto se confirmó posteriormente también con la prueba de tuberculina. De igual manera, otro individuo del grupo 1, también resulto positivo a este antígeno a los 60 días y a la prueba de tuberculina; por último, dos individuos del grupo control resultaron positivos a este antígeno a los 90 días y uno de ellos

fue positivo a la tuberculina, mostrando un mayor número de animales positivos en el grupo no vacunado con el antígeno CFP-10 (cuadro 10).

Reactividad a la prueba de tuberculina

Las frecuencias del número de animales reactivos a la prueba de tuberculina, muestran que se presentó mayor reactividad en los individuos vacunados de los grupos 1 y 2 (2/11 y 3/11 respectivamente), en comparación con el grupo 3 (0/12) en la prueba de tuberculina realizada a los 90 días; sin embargo, posteriormente la reactividad fue disminuyendo en el muestreo de los 210 días en los grupos 1 y 2 (1/11 y 1/9). Aunque no se encontró diferencia ($p > 0.05$) (cuadro 11).

Evaluación de la respuesta inmune humoral

Los valores de producción de anticuerpos, contra los componentes del CFPE de *M. bovis* y de *M. avium*, fueron similares en los 3 grupos de estudio ($p > 0.05$), durante el muestreo del día 0 (Fig. 6a).

Al día 15, la producción de anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis* aumentó en todos los grupos sin diferencia en alguno de ellos ($p > 0.05$) (Fig. 6b).

Esta tendencia de aumento de producción de anticuerpos contra *M. bovis* se prolongó hasta el día 30 en los 3 grupos de estudio sin diferencia entre ellos ($p > 0.05$) (Fig. 6c).

Posteriormente, en el muestreo del día 60 en todos los grupos de estudio se presentó una disminución en los anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis* ($p > 0.05$) (Fig. 6d).

Al día 90 los grupos presentaron un ligero aumento similar en la producción de anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis* ($p > 0.05$), posterior a la aplicación de la prueba de tuberculina (Fig. 7a).

Se presentó una disminución paulatina de la producción de anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis*, en los 3 grupos y un aumento en la producción de anticuerpos contra el CFPE de *M. avium* al día 150 ($p > 0.05$) (Fig. 7b).

Esta tendencia de producción de anticuerpos contra el CFPE de *M. avium* continuó hasta los 210 días en todos los grupos de forma similar ($p > 0.05$) (Fig. 7c). No se encontró diferencia entre alguno de los grupos en estudio, en ninguno de los muestreos realizados ($p > 0.05$).

Resultados de la prueba de PCR

Para la evaluación de las muestras de exudado nasal de las becerras, se realizó una prueba de PCR, con la finalidad de determinar si alguna becerro estaba eliminando micobacterias por esta vía, pero no se encontró evidencia de genoma de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en los animales en estudio, en ninguno de los muestreos realizados a los 0, 30, 60, 90, 150 y 210 días. Las frecuencias entre los grupos de estudio fueron iguales ($p > 0.05$) (cuadro 12).

7. DISCUSIÓN

Primera parte: estudio retrospectivo

La prevalencia de TBb, tanto en los animales del centro de recría y en producción, disminuye después de que inicia el programa de control con vacunación, aunque después hay un incremento en la prevalencia, que concuerda con la introducción de animales adquiridos de los estados de Jalisco, Guanajuato y del propio CAIT.

Este efecto de disminución en la prevalencia puede estar también influenciado por las diversas medidas sanitarias de control, realizadas como la segregación de reactores, esta medida se ha documentado por estudios en Etiopia (Ameni *et al.*, 2007) cuyos resultados mostraron una disminución en la incidencia de TBb de un 48 % a 1 % en un periodo de casi 2 años, sin embargo la población disminuyó de 500 animales a solo 200 de ellos, lo cual en granjas de producción de leche es inaceptable y además que no siempre se cuenta con los reemplazos suficientes. Otras medidas de prevención como alimentar a las becerras con calostro de animales negativos a la prueba de tuberculina y dar sustituto de leche como alimento, así como el establecimiento de tapetes sanitarios, han mostrado que la prevalencia a TBb es menor en granjas donde se implementan dichas medidas sanitarias (Ameni *et al.*, 2003).

Existe evidencia acerca del aumento en la prevalencia a TBb se debe a la introducción de casos por compra (Proaño-Perez *et al.*, 2009; Tsegaye *et al.*, 2010; Probst *et al.*, 2011), como ocurrió y se comprobó mediante una investigación epidemiológica en lugares de baja prevalencia en Inglaterra, donde debido a la despoblación para controlar otra enfermedad (fiebre aftosa), se adquirieron cabezas para repoblar las lecherías, pero algunos de estos animales introdujeron la TBb a los hatos (Gopal *et al.*, 2006; Ramírez-Villaescusa *et al.*, 2010).

Se debe considerar que entre más avanzada es la edad de un animal, hay mayor riesgo de exposición a la enfermedad, así como mayor posibilidad de infección (Ameni *et al.*, 2003; Cleveland *et al.*, 2007; Humblet *et al.*, 2009; Tsegaye *et al.*, 2010), estudios realizados en Ecuador por Proaño-Perez *et al.* (2009) en

hatos lecheros, muestran que en vacas en lactación, conforme aumenta su edad, hay una mayor probabilidad de volverse reactor a la prueba de tuberculina (Tsegaye *et al.*, 2010). Siendo que para la última fecha de prueba los animales vacunados estarían en un rango de edad entre 2.5 a 4.5 años por lo que aumenta la probabilidad de un mayor número de reactores en ellos, pues la vacunación no protege al 100 % (Milián *et al.*, 2003).

En el presente estudio, se encontró diferencia numérica (sin diferencia estadística con la prueba Chi^2), entre la frecuencia de animales positivos a la prueba de tuberculina y en la revisión de expedientes de las necropsias, entre los grupos vacunados con 3 diferentes inmunógenos y el grupo testigo.

Se observó un mayor porcentaje de reactores a la prueba de tuberculina, para la vacuna de *M. vaccae*, relacionándose con lo reportado por Buddle *et al.* (2003), en cuanto a la escasa o nula protección conferida por *M. vaccae*, debido a que se observó una mayor frecuencia de lesiones a la necropsia, respecto al grupo control, por lo tanto la vacunación con *M. vaccae* no resultó ser eficiente.

Mientras que el grupo inoculado con el inmunógeno CFPE, mostró una reactividad a la prueba de tuberculina y a la necropsia más alta que la observada en el grupo vacunado con la BCG cepa Phipps. Estos resultados concuerdan con lo descrito, por Hope y Villareal-Ramos (2008), acerca de una menor protección por parte del CFPE en comparación con la BCG.

La eficacia vacunal reportada en el presente estudio, con la prueba de tuberculina, en el centro de cría para los inmunógenos BCG y CFPE fue similar, mientras que *M. vaccae* tuvo resultados negativos. En el hato en producción la BCG obtuvo la mejor eficacia vacunal, mientras que el CFPE y *M. vaccae* obtuvieron resultados negativos. En cuanto a lesiones compatibles con TBb a la necropsia, la eficacia vacunal fue más alta con la BCG, el CFPE y *M. vaccae* obtuvieron resultados pobres.

Es difícil comparar los resultados en la presente investigación con los estudios también realizados en campo, pues nuestros indicadores fueron la reactividad a la prueba de tuberculina y los expedientes de lesiones compatibles

con TBb a la necropsia, los cuales no son los mejores, pero eran los únicos disponibles durante el estudio retrospectivo; en cuanto a los casos de lesiones compatibles a TBb, estudios realizados por Milián *et al.* (2000) en Querétaro México, encontraron que de 1,201 canales revisadas en rastro, el 17 % mostro lesiones compatibles con TBb y de estas el 95 % fue positiva a la histopatología y el 79 % al aislamiento bacteriológico, estas cifras nos dan pauta hasta cierto punto de poder considerar los resultados observados a partir de los expedientes a la necropsia para calcular la eficacia vacunal. Estudios realizados por López-Valencia *et al.* (2010) en Baja California México, (utilizaron 3 pruebas como un caso positivo a TBb: IFN- γ PPDB, IFN- γ ESAT6/CFP10 y tuberculina) en los que encontraron una eficacia vacunal del 59.4 % para la BCG cepa Tokio y por Ameni *et al.* (2010) en Etiopia para la BCG cepa Danesa, donde la eficacia vacunal fue del 56 % a la necropsia (con muestras para el cultivo de *M. bovis* a partir de lesiones), estudios realizados por Aronson *et al.* (2004) (con diferentes pruebas diagnosticas y mediante la historia clínica) en poblaciones de seres humanos en los EE.UU., reportaron una eficacia vacunal del 52 % (para la BCG Pasteur, una eficacia vacunal del 59% y para la BCG Phipps una eficacia vacunal del 44%) y estudios de meta-análisis (donde analizaron estudios prospectivos y estudios de casos y controles) llevados a cabo por Colditz *et al.*, (1994) encuentran una eficacia global del 50%. Así pues, se observó una menor eficacia vacunal en el presente estudio, aunque se deben considerar factores como los diferentes parámetros que pueden estar involucrados y que pudieron afectar la eficacia vacunal. Como son: infección con *M. bovis*, la presencia de micobacterias saprófitas, que pueden desviar o enmascarar una respuesta por linfocitos Th1 hacia una subpoblación Th2, la cual es menos eficiente en contra de patógenos intracelulares (Hernández *et al.*, 2004), el tipo de cepa de BCG utilizada, pues las distintas cepas difieren unas de otras en cuanto algunos antígenos presentes y la preparación de la vacuna (Fine *et al.*, 1999).

Estudios epidemiológicos en humanos sugieren que la escasa eficacia de la vacuna BCG en algunos países, puede ser debido al efecto inmunomodulador que

manifiestan la exposición a las micobacterias ambientales, sin embargo este mecanismo aun no es claro y ha sido poco estudiado. Para esto se han tratado de probar la hipótesis de que la sensibilización con micobacterias ambientales por ejemplo *M. chelonae*, que regulan la actividad de células CD4⁺ y de células citotóxicas. El modelo en ratones (Balb/c) ha sido empleado para dar solides ha este planteamiento. Han mostrado que en el ratón sensibilizado y vacunado con la BCG, se presenta un efecto inmunomodulador por la exposición a micobacterias ambientales. Esto sugiere la supresión funcional de las respuestas locales a la BCG por linfocitos CD4⁺ y células T reguladoras de individuos sensibilizados con *M. chelonae* (Ho *et al.*, 2010).

La información obtenida de los expedientes de necropsia muestra que únicamente se presentó diseminación de lesiones en los linfonodos, en los grupos vacunados, siendo que en los no vacunados se presentó mayor diseminación de lesiones en diferentes órganos. Lo anterior coincide con lo observado por Wedlock *et al.* (2007) en un estudio experimental donde comparó el grado de protección entre 2 cepas de BCG (Danesa y Pasteur), encontró que los grupos vacunados mostraron una menor diseminación de lesiones en linfonodos y pulmones, mientras que en el grupo control se observó una mayor proporción de animales con diseminación de lesiones tanto en pulmón como en los linfonodos.

Segunda parte: estudio prospectivo

Al estimular la sangre colectada, con el mitógeno pokeweed, se observó la producción de IFN- γ de un modo homogéneo en los 3 grupos a lo largo del estudio, mostrando posteriormente niveles similares a los vistos en adultos (Barrington y Parish, 2004). Mientras que la producción de IFN- γ fue mínima y homogénea en los 3 grupos de estudio al medir sin estímulo antigénico.

Una característica del perfil inmunológico de los animales vacunados con BCG, es la producción de altos niveles de IFN- γ , por parte de los linfocitos de sangre periférica estimulados con PPD bovino, entre 2-4 semanas posvacunación (Buddle *et al.*, 2005; Weddlock *et al.*, 2007; Buza *et al.*, 2009). Un estudio

realizado por Skinner *et al.* (2001), describe que en experimentos en campo con grupos de animales vacunados con BCG cepa Pasteur, la mayor producción de IFN- γ es durante la segunda semana posvacunación, que correlaciona con una buena protección contra la infección, mientras que si se presenta una cinética donde la producción de IFN- γ se retrasa, hasta las 4 semanas y con una producción muy pequeña del mismo, los animales no están adecuadamente protegidos. En el estudio realizado en esta tesis, se observó una producción de IFN- γ discreta, pero en este estudio se utilizó a la BCG cepa Phipps.

En otros experimentos se ha observado que diferentes cepas de la BCG presentan diferencia en la producción de IFN- γ en becerras, por ejemplo Weddlock *et al.* (2007) y Hope *et al.* (2011), mostraron que las distintas cepas de BCG al ser comparadas entre sí, tienen diferencias en cuanto a la producción de IFN- γ , con una mayor producción al utilizar la cepa Pasteur y una menor producción de esta citocina con la cepa Danesa, la cual alcanza su máximo valor de producción a las 6 semanas de haber vacunado, resultado observado también en un estudio realizado por Milián-Suazo *et al.*, (2011) en vaquillas en Querétaro México, en el cual se observa una producción mayor de esta citocina a los 30 días al utilizar la BCG cepa Phipps, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, mientras que un estudio de seguimiento realizado por Anderson *et al.* (2012) en Uganda en niños vacunados con diferentes cepas de BCG (Dinamarca, Rusia y Bulgaria) también mostraron diferencia en la producción de IFN- γ , presentándose una mayor producción con la cepa Dinamarca.

En los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a la producción de IFN- γ , al estimular a los 15 días con el PPD aviar, se observó una mayor producción con éste, que con el PPD bovino, lo cual podría sugerir una exposición a micobacterias no tuberculosas; es posible que la exposición a micobacterias del complejo *M. avium* aumentara la producción de IFN- γ al estimular con el PPD aviar en las PBMC de los grupos vacunados, Thom *et al.* (2008), mostró que la exposición a *M. avium* tiene influencia sobre la respuesta a IFN- γ en animales vacunados con BCG.

Respecto a la prueba de tuberculina, se encontró una menor reactividad en los animales vacunados en comparación con otros estudios, solo 22.72% a los 3 meses posvacunación; mientras que a los 7 meses posvacunación se observó que un 10% fueron reactivos a esta prueba. En el estudio de Ameni *et al.* (2010) de los individuos vacunados, el 92.3 % de ellos se hizo reactor a la prueba de tuberculina a las 6 semanas después de su vacunación. Mientras que Whelan *et al.* (2011) encontraron que becerras vacunadas con BCG cepa Danesa, a los 6 meses posvacunación, tenían una reactividad a la tuberculina en el 80 % de sus individuos vacunados, y a los 9 meses esta disminuyó hasta un 8 %. Del mismo modo se observó en el presente estudio, que la reactividad a la prueba de tuberculina fue disminuyendo en los animales vacunados.

En relación a la poca reactividad observada en este estudio, un factor importante puede ser el hecho de que se ha encontrado que las proteínas MPB70 y MPB83 son de gran importancia para el diagnóstico con las pruebas de IFN- γ y la prueba de tuberculina (Wiker, 2009). MPB70 y MPB83 son proteínas sumamente estables y están presentes en los filtrados de cultivo de *M. bovis* y son de las pocas proteínas que pueden encontrarse en el PPD bovino sin estar alteradas (Palmer *et al.*, 2006). Es probable que se observaran pocos reactivos en la prueba de tuberculina, debido a que la BCG cepa Phipps produce mínima expresión de las proteínas MPB70 y MPB83 debido a una mutación en el factor sigma K (*Sigk* o *Rv0445c*), en esta cepa a diferencia de otras cepas más reactivas a la prueba de tuberculina como por ejemplo la cepa Tokio. Estudios realizados por Charlet *et al.* (2005), mediante pruebas de inmunoblot, no encontraron a MPB70 en los filtrados de cultivo de la BCG cepa Phipps. De estos resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que hay una menor reactividad a la prueba de tuberculina, en los animales vacunados con la cepa Phipps en comparación con otras cepas de BCG.

Por otro lado, la sensibilidad y especificidad de la prueba de tuberculina se puede ver afectada por la sensibilización con micobacterias no tuberculosas (Cooney *et al.*, 1997), algo que pudo ocurrir en el presente estudio debido a lo

observado en cuanto a la producción de IFN- γ al estimular con el PPD aviar aunque en nuestros resultados no se encontraron medidas altas al PPD aviar en la prueba de tuberculina, solo en los animales infectados.

Con respecto a la respuesta inmune humoral, las cinéticas de anticuerpos mostraron un incremento a los 15 días posteriores a la vacunación con BCG, contra el CFPE de *M. bovis*, en todos los grupos de estudio considerando al grupo control, sin una diferencia estadística entre ellos, lo cual denota la homogeneidad en el fenómeno. Este comportamiento, nos puede hacer pensar en la infección de las becerras con *M. bovis* al momento de nacer, estudios realizados por Waters *et al.* (2006), utilizando un modelo de infección por aerosoles mostraron la presencia de una respuesta serológica a los antígenos MPB83, MPB70, ESAT-6 y CFP-10 a las 4 semanas posinfección, (el cual concordaría en tiempo con el muestreo de los 15 días si los animales se hubiesen infectado al nacimiento). En los resultados obtenidos en el estudio, a pesar del aumento en las cinéticas de anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis*, no se encontró una respuesta a IFN- γ , en el grupo 3 (control) que también tuvo una respuesta de anticuerpos y no fue vacunado.

En caso de que nuestros animales estuviesen infectados esperaríamos encontrar una cinética de anticuerpos similar a la observada en los animales infectados del estudio de Palmer *et al.* (2006), pero la cinética presente en nuestros animales es similar a la de sus controles (no infectados). Estimulando con el antígeno recombinante CFP-10, no observamos un efecto de incremento en la producción de IFN- γ entre los muestreos de 0-30 días, solamente se observó en 2 becerras que se consideraron infectadas y que además resultaron posteriormente positivas a la prueba de tuberculina.

En cuanto a la sensibilización con micobacterias ambientales, Buddle *et al.* (2002) reportaron que animales expuestos a micobacterias ambientales, al nacimiento muestran anticuerpos al PPD aviar dentro de las primeras 6 semanas, en el presente estudio se observó un ligero incremento en los anticuerpos contra el CFPE de *M. avium*. Un estudio realizado por Waters *et al.* (2010), encontró que los animales infectados con *M. bovis* tiene una respuesta más fuerte a anticuerpos

de la clase IgG hasta las 12 semanas posinfección. En su estudio diseñaron 3 escenarios al infectar becerros con *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. kansasii*. Con respecto a los resultados obtenidos en el estudio, la cinética de anticuerpos observada es similar a la presentada por Waters *et al.* (2010) en el tercer escenario de sensibilización con *M. kansasii* que induce una respuesta de anticuerpos que va desapareciendo con el tiempo y sin embargo, se presenta un incremento en la producción de anticuerpos cuando hay una reexposición a antígenos micobacterianos como es el caso del PPD bovino utilizado en la prueba de tuberculina o por las micobacterias ambientales.

En el presente estudio en todos nuestros grupos se observó un aumento de los anticuerpos contra el CFPE de *M. bovis* a los 15 días posvacunación. Por lo tanto, existe la posibilidad de sensibilización con micobacterias ambientales.

Finalmente durante el seguimiento realizado con la prueba PCR para detectar el gen que codifica a MPB70 en los animales de estudio, no se encontró la presencia de ADN del gen que codifica a esta proteína, ni siquiera en los animales reactivos a las pruebas de tuberculina e IFN- γ , lo que nos lleva a la conclusión de que son animales infectados pero que aun no está presente en ellos la enfermedad o en todo caso si hubo eliminación intermitente de bacilos no fue detectado por la PCR debido a esa causa. Los animales en etapas tempranas de infección diseminan la micobacteria, pero esta eliminación puede ser de forma intermitente (Romero *et al.*, 2006).

Considerando los resultados obtenidos en este estudio y llegando a la conclusión del posible uso de la vacuna BCG para el control de la TBb, se deben tomar en cuenta, los análisis de costo-beneficio y costo-efectividad, en los cuales se comparan las consecuencias negativas (costos) y las positivas (beneficios económicos y de salud) de los posibles programas alternativos, además de plantear pruebas diagnósticas precisas que permitan distinguir animales vacunados de infectados mediante antígenos específicos, de cepas de campo de *M. bovis* como son ESAT-6 y CFP-10. Se debe de continuar investigando con mayor profundidad y sobre todo con mucho cuidado, haciendo el seguimiento de

los animales a la necropsia y con otras pruebas de diagnóstico, ya sea midiendo otros perfiles de citocinas u otros indicadores de protección, que nos guíen hacia conclusiones objetivas y sustentadas, pues entre un modelo murino o un modelo bovino bajo condiciones controladas, a un modelo bovino bajo condiciones naturales y de desafío, en un hato con alta prevalencia en donde están presentes una gran cantidad de variables, siempre habrá una diferencia de resultados entre los distintos escenarios descritos.

8. CONCLUSIONES

- Se encontró que hubo una disminución en la prevalencia, mediante un programa de control que incluyo a la vacunación y otras medidas de bioseguridad.
- El inmunógeno con la mejor eficacia vacunal fue la BCG cepa Phipps.
- La eficacia vacunal con la BCG cepa Phipps fue menor a la observada en otros estudios realizados bajo condiciones de campo.
- Se presentó un menor grado de diseminación de lesiones en los individuos vacunados que en los no vacunados.
- Se encontró únicamente diferencia en la producción de IFN- γ entre el grupo vacunado con la BCG cepa Phipps dosis 10^6 UFC y el grupo control, con una producción moderada de dicha citocina en los animales vacunados.
- La reactividad a la prueba de tuberculina fue moderada en comparación con otros estudios y disminuyo conforme paso el tiempo en los individuos vacunados con la BCG cepa Phipps.
- Se encontró una producción homogénea de anticuerpos entre los distintos grupos de estudio, debida posiblemente a una sensibilización con micobacterias no tuberculosas.
- No se encontró que algún animal eliminara a *M. bovis* vía nasal por la PCR.

9. REFERENCIAS

Abalos P., Retamal P., Tuberculosis: ¿Una zoonosis re-emergente? Rev Sci Tech 2004; Vol. 23 (2): 583-594.

Aguirre A., Fernández O., Ferreyra M., Savini A., Poggio G. Tuberculosis humana producida por *Mycobacterium bovis*. Rev torác 2007; Vol. 8(15): 39-43.

Amanfu W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. Tuberculosis 2006; Vol. 86: 330-335.

Ameni G., Bonnet P., Tibbo P. A cross-sectional study of bovine tuberculosis in selected dairy farms in Ethiopia. Int J of Appl Res Vet Med 2003; [28/12/2011 03:02:57p.m.]

Vol. 1(4). Available from: <http://www.jarvm.com/articles/Vol1Iss4/Tibbo.htm>

Ameni G., Aseffa A., Engers H., Young D., Gordon S., Hewinson G., Vordermeier M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to Zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. Clin Vaccine Immunol 2007; Vol. 14(10): 1356-1361.

Ameni G., Aseffa A., Sirak A., Engers H., Young D.B., Hewinson G.R., Vordermeier M.H., Gordon S.V. Effect of skin testing and segregation on the incidence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis* in Ethiopia. Vet Rec 2007; 161(23): 782-786.

Ameni G., Hewinson G., Aseffa A., Young D., Vordermeier M. Appraisal of interpretation criteria for the comparative intradermal tuberculin test for diagnosis of tuberculosis in cattle in central Ethiopia. Clin Vaccine Immunol 2008; Vol. 15(8): 1272-1276.

Ameni G., Vordermeier M., Aseffa A., Young D.B., Hewinson R.G. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against bovine

tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. Clin Vaccine Immunol 2010; Vol. 17(10): 1533-1538.

Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. Infect Immun 1994; Vol. 62(6): 2536-2544.

Anderson E.J., Webb E.L., Mawa P.A., Kizza M., Lyadda N., Nampijja M., Elliot A.M. The influence of BCG vaccine strain on mycobacteria-specific and non-specific immune responses in a prospective cohort of infants in Uganda. Vaccine 2012. 30: 2083-2089.

Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Novoa C., Pickering X., García P., Sánchez B. Tuberculosis respiratoria en bóvidos. Formación Continuada en Veterinaria. 1996; Vol. 1(4): 3-13.

Aronson N.E., Santosham M., Comstock G.W., Howard R.S., Moulton L.H., Rhoades E., Harrison L.H. Long-term efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska natives a 60-years follow-up study. JAMA 2004; 291: 2086-2091.

Ayele W.Y., Neill S.D., Zinsstag J. Weiss M.G., Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8(8): 924-937.

Baker M.G., Lopez L.D., Cannon M.C., De Lisle G.W., Collins D.M. Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to human in New Zealand. Epidemiol Infect 2006; 134: 1068-1073.

Barnes A.I., Rojo S., Moretto H. Prevalencia de micobacteriosis y de tuberculosis en pacientes de un hospital de referencia de la provincia de Córdoba. Rev Argent Microbiol 2004; 36: 170-173.

Barrington G.M., Parish S.M. Inmunología neonatal bovina. Clínicas Veterinarias de Norteamérica. Inmunología Buenos Aires, Argentina Ed. Inter-Medica. 2004; 1-15.

Behr M.A., Small P.M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17: 915-922.

Bermúdez L.E., Sangari F.J., Kolonoski P., Petrofsky M. Goodman J. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2002; Vol. 70(1): 140-146.

Bernardelli A. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Producción y control de tuberculina bovina y aviar Derivado Proteico Purificado (DPP). Ciudad de Buenos Aires Abril de 2007. www.senasa.gov.ar

Best M., Sattar S.A., Springthorpe V.S., Kennedy M.E. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; Vol. 23 (10): 2234-2239.

Biet F., Boschioli M.L., Thorel M.F., Guilloteau L.A. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* - intracellulare complex (MAC). *Vet Res* 2005; 36:411-436.

Briones V., de Juan L., Sánchez C., Vela A.I., Galka M., Montero N., Goyache J., Aranaz A., Mateos A., Domínguez L. Bovine Tuberculosis and the endangered Iberian Linx. *Emerg Infect Dis* 2000; Vol. 6(2): 189-191.

Brock I., Lillebaek T., Follmann F., Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(1): 65-69.

Buddle B.M., Wards B.J., Aldwell F.E., Collins D.M., De Lisle G.W. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002. 20: 1126-1133.

Buddle B.M., Pollock J.M., Skinner M.A., Wedlock D.N. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int J Parasitol* 2003; 33: 555-566.

Buddle B.M., Wedlock D.N., Denis M., Skinner M.A. Identification of immune response correlates for protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108: 45-51.

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 $\gamma\delta$ T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 130(3-4): 251-255.

Cadmus S.I., Adesokan H.K., Jenkins H.O., van Soolingen D. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(12): 2066-2067.

Caminero L.J.A. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. Unión internacional contra la tuberculosis y enfermedades respiratorias (UICTER) 68 boulevard Saint Michel, 75006 París-Francia 2003; 52-57.

Castillo-Rodal A.I., Castañón-Arreola M., Hernández-Pando R., Calva J.J., Sada-Díaz E., López-Vidal Y. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2006; Vol. 74(3): 1718-1724.

CFSPH The Center for Food Security and Public Health. Bovine Tuberculosis. 2007 College of Veterinary Medicine Iowa State University. Cited: 02-09-2011
Available from: URL:
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf

Charlet D., Mostowy S., Alexander D., Sit L., Wiker H.G., Berh M.A. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in *Mycobacterium bovis* BCG strains due to a start codon mutation in *sigK*. *Mol Microbiol* 2005; 56(5): 1302-1313.

Chen Y., Chao Y., Deng Q., Liu T., Xiang J., Chen J., Zhou J., Zhan Z., Kuang Y., Cai H., Chen H., Guo A. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China: cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis* 2009; 89: 95-100.

Cicero R., Olivera H., Hernández-Solis A., Ramírez-Casanova E., Escobar-Gutiérrez A. Frequency of *Mycobacterium bovis* as an etiologic agent in extrapulmonary tuberculosis in HIV -positive and – negative Mexican patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 455-460.

Cleveland S., Shaw D.J., Mfinanga S.G., Shirima G., Kazwala R.R., Eblate E., Sharp M. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis* 2007; 87: 30-43.

Colditz G.A., Brewer T.F., Berkey C.S., Wilson M.E., Burdick E., Fineberg H.V., Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271: 698-702.

Collins C.H., Yates M.D., Grange J.M. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* in to five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J Hyg* 1982; 89: 235-242.

Collins D.M. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* 2001; 81(1/2): 97-102.

Comstock G.W. Simple, practical ways to assess the protective efficacy of a new tuberculosis vaccine. *Clin Infect Dis* 2000; 30(3): 250-253.

Cooney R., Kazda J., Cook B., Muller K., Monaghan M. Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitization to tuberculin. *Ir Vet J* 1997; 41: 363-366.

Corner L.A. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol* 2006; 112: 303-312.

Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., Kantor I., Meslin F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998; Vol. 4 (1): 59-70.

Costello E., Doherty M.L., Monaghan M.L., Quigley F.C., O'Reilly P.F. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 1998; 155: 245-250.

Cousins D.V., Wilton S.D., Francis B.R., Gow B.L. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; Vol. 30(1): 255-258.

Cousins D.V., Dawson D.J. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(8): 715-721.

Crawshaw T., Daniel R., Clifton-Hadley R., Clark J., Evans H., Rolfe S., de la Rúa-Domenech R. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 2008; 163:127

VAN Crevel R., Ottenhoff T.H.M., VAN DER Meer J.W.M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; Vol. 15 (2): 294-309.

Díaz O.F., Banda R.V., Jaramillo M.L., Arriaga D.C., González S.D., Estrada-Chávez C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Méx* 2003; 34(1): 13-26.

Doherty T.M., Andersen P. Vaccines for tuberculosis: Novel concepts and recent progress. Clin Microbiol Rev 2005; Vol. 18(4): 687-702.

Dunlap N.E., Bass J., Fujirawa P., Hopewell P., Horsburgh C.R. Jr., Salfinger M., Simone P.M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; Vol. 161: 1376-1365.

Ellis M.D., Davies S., Mc Canlish J.A.P., Monies R., Jahans K., De La Rua-Domenech R. *Mycobacterium bovis* infection in a dog. Vet Rec 2006; 159: 46-48.

Ellwood D.C., Waddington F.G. A second experiment to challenge the resistance to tuberculosis in BCG vaccinated cattle in Malawi. Br Vet J 1972; 128: 619-626.

Estrada-Chávez C., Díaz O.F., Arriaga D.C., Villegas-Sepúlveda N., Pérez G.R., González S.D., Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet Méx 2004; 35(3): 225-236.

Fine P.E., Carneiro I.A.M., Milstien J.B., Clements C.J. Issues relatives to the use of BCG in immunization programmes. World Health Organization WHO/VPcB/99.23 Geneva 1999.

Franco-Paredes C., Roupheal N., del Rio C., Santos-Preciado J.I. Vaccination strategies to prevent tuberculosis in the new millenium: From BCG to new vaccine candidates. Int J Infect Dis 2006; 10: 93-102.

Ginsberg A.M. What's new in tuberculosis vaccines? Bull World Health Organ 2002; 80(6): 483-488.

González S.D., Díaz O.F., Jaramillo Meza L., Santillán F.M.A., Erazo G.R., Díaz A.C. Detección y descripción anatomopatológica de tuberculosis en una colonia de Ankole-Watusi. Téc Pecu Méx 2007; 45(1): 101-109.

Gopal R., Goodchild A., Hewinson R., de la Rua D.R., Clifton H. R. Introduction of bovine tuberculosis to north-east England by boughth-in cattle. Vet Rec 2006; 159: 265-271.

Gorocica P., Jiménez-Martínez M.C., Garfias 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 Mex 2005; Vol. 18(2): 142-153.

Grange J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis 2001; Vol. 81 (1/2): 71-77.

Green L.R., Jones C.C., Sherwood A.L., Garvaki I.V., Cangelosi C.A., Thacker T.C., Palmer M.V., Waters W.R., Rathe C.V. Single-antigen serological testing for bovine tuberculosis. Clin Vaccine Immunol 2009; Vol. 16(9): 1309-1313.

Gutierrez M.G., Brisse S., Brosch R., Fabre M., Omais B., Marmiesse M., Supply P., Vincent V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog 2005; Vol.1 (1): 55-61.

Hardie R.M., Watson J.M. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. Epidemiol Infect 1992; Vol. 109: 23-33.

Harris B.N., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodríguez-Lainz A., Cernek-Hoskins S., Rast R., Ginsberg M., Kinde H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. Appl Environ Microbiol 2007; Vol. 73(3): 1025-1028.

Hlavsa M.C., Moonon P.K., Lauren S.C., Navin T.R., Kammer J.S., Morlock G.P., Crawford J.T., LoPue P.A. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. Clin Infect Dis 2008; 47:168-175.

Hernández P.R., Orozco E.H., Aguilar L.D., López C.F., Rook G. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. Mensaje Bioquímico. 2004; Vol. XXVIII : 129-153.

Ho P., Wei X., Seah G.T. Regulatory T cells induced by *Mycobacterium chelonae* sensitization influence murine responses to bacille Calmette-Guérin. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 1073-1080.

Hope J.C., Villareal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008; 31: 77-100.

Hope J.C, Thom M.L., McAulay M., Mead E., Vordermeier H.M., Clifford D., Hewinson R.G., 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; Vol.18 (3): 373-379.

Huebner R.E. BCG vaccination in the control of tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215: 263-282.

Humblet M.F., Boschioli M.L., Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: A stratified approach. *Vet Res* 2009; 40:50.

Huygen K. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of micobacterial diseases. *Infect Immun* 2003; Vol. 71(4): 1613-1621.

Jha V.C., Morita Y., Dhakal M., Besnet B., Sato T., Nagai A., Kato M., Kozawa K., Yamamoto S., Kimura H. Isolation of *Mycobacterium spp.* from milking buffaloes and cattle in Nepal. *J Vet Med Sci* 2007; 69(8): 819-825.

Jiménez M.M.C., Báez S.R., Linares C.M., Lascurain L.R., Zenteno G.E. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001; Vol. 14(1): 39-48.

Kantor I.N., Ambroggi M., Poggi S., Morcillo N., Da Silva T.M.A., Osorio R.M., Garzón T.M.C., Llerena P.C., Ribón W., García V., Kuffo D., Asencios L., Vásquez C.L.M., Rivas C., de Waard J.H. Human *Mycoabcterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* 2008; Vol. 88(4): 358-365.

Kaufmann S.H.E., Hussey G., Lambert P. H. New vaccines for tuberculosis. *Lancet* 2010; 375: 2110-2119.

Kuehl R.O. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Segunda edición Thomson Editores S.A. de C.V. México D.F. 2001; 39-40.

Lantos A., Niemann S., Mezos L., Sós E., Erdélyi K., David S., Parsons L.M., Kubica T., Rüsç-Gerdes S., Somoskövi A. Pulmonary Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis* 2003; Vol.9(11): 1462-1464.

Liébana E., Marsh S., Gough J., Nunez A., Vordermeier H.M., Whelan A., Spencer Y., Clifton-Hadley R., Hewinson G., Johnson L. Distribution and activation of T-lymphocyte subsets in tuberculous bovine lymph-node granulomas. *Vet Pathol* 2007; 44: 366-372.

Liébana E., Johnson L., Gough J., Durr P., Jahans K., Clifton-Hadley R., Spencer Y., Hewinson R.G., Downs S.H. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *Vet J* 2008; 176: 354-360.

Liu J., Tran V., Leung A.S., Alexander D.C., Zhu B. BCG vaccines their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum Vaccin* 2009; Vol.5 (2): 70-78.

Lo Y.M.D. Clinical applications of PCR. *Methods in molecular medicine* Vol. 16 Human Press Inc. Totowa N.J. 2011.

LoBue P.A., Betacourt W., Peter C., Moser K.S. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego county, 1994-2000. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7(2): 180-185.

López-Valencia G., Rentarúa-Evangelista T., Williams J.J., Licea-Navarro A., se la Mora-Valle A., Medina-Basulto G. Field evaluation of the protective efficacy of

Mycobacterium bovis BCG vaccine against bovine tuberculosis. Res Vet Sci 2010; 88: 44-49.

Marianelli C., Cifani M., Capucchio M.T., Fiascorano M., Russo M., La Mancusa F., Pasquali P., Di Marco V. A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. J Vet Diagn Invest 2010; 22: 445-448.

McNair J., Welsh M.D., Pollock J.M. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. Vaccine 2007; 25: 5504-5511.

Mehrzad J., Zhao X. T lymphocyte proliferative capacity and CD4⁺/CD8⁺ ratio in primiparous and pluriparous lactating cows. J Dairy Res 2008; 75: 457-465.

Meikle V., Bianco M.V., Blanco F.C., Gioffré A., Garbaccio S., Vagnoni L., Di Rienzo J., Canal A., Bigi F., Cataldi A. Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a *Mycobacterium bovis* strain isolated from wild boar. BMC Vet Res 2011; 7:37 <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/37>.

Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests boosting, conversion, and reversion. Am J Respir Crit Care Med 1999; Vol. 159: 15-21.

Milián S.F., Sánchez L.M., Toledo P., Ramírez C., Santillán M.A. Descriptive Study of Human and Bovine Tuberculosis in Querétaro, México. Rev Latinoam Microbiol 2000; 42: 13-19.

Milián S.F., Anaya E.A.M., Gallegos T.R.M. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. Prev Vet Med 2003; 58: 1-13.

Milián S.F., Harris B., Arriaga D.C., Thomsen B., Stuber T., González S.D., Álvarez O.G., Santillán F.M.A., Morales L.A., Estrada C.C. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Rev Méx Cienc Pecu 2010; 1(4): 403-415.

Milián-Suazo F., Gutiérrez-Pabello J.A., Bojorquez-Narváez L., Anaya-Escalera A.M., Cantón-Alarcón G.J., González-Enríquez J.L., Campos-Guillén J. IFN-g response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. *Res Vet Sci* 2011; 90: 419-424.

Mishra A., Singhal A., Chauhan D.S., Katoch V.M., Srivastava K., Thakral S.S., Bharadwaj S.S., Sreenivas V., Prasad H.K. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (11): 5670-5678.

Murphy D., Corner L.A.L., Gormley E. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis* 2008; 88: 344-357.

Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 2008; 127: 1-9.

Neill S.D., Bryson D.G., Pollock J.M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001; 81(1/2): 79-86.

Neill S.D., Skuce R.A., Pollock J.M. Tuberculosis-new light from and old window. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1261-1269.

Niederweis M., Danilchanka O., Huff J., Hoffman C., Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol* 2010; 18(3): 109-116.

Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).

OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004 Capitulo 2.3.3. Tuberculosis bovina 489-502.

Oloya J., Opuda A.J., Kazwala R., Demelash A.B., Skjerve E., Lund A., Johansen T.B., Djonje B. Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol Infect* 2008; Vol. 136: 636-643.

Olsen I., Boysen P., Kulberg S., Hope J.C., Jungersen G., Storset A.K. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect Immun* 2005; Vol. 73(9): 5628-5635.

O'Reilly L.M., Daborn C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 1995; Vol. 76(1): 1-46.

Orenstein W.A., Bernier R.H., Dondero T.J., Hinman A.R., Marks J.S., Bart K.J., Sirotkin B. Field evaluation of vaccine efficacy. *Bull World Health Organ* 1985; 63(6): 1055-1068.

Orme I.M., Cooper A.M. Cytokine / chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999; 20(7): 307-312.

Palma-Nicolás J.P., Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol* 2007; 43(4): 225-232.

Palmer M.V., Waters W.R. Advance in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know? *Vet Microbiol* 2006; 112: 181-190.

Palmer M.V., Waters W.R., Thacker T.C., Greenwald R., Esfandiari J., Lyashchenko K.P. Effects of different tuberculin skin testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol* 2006; Vol. 13(3): 387-394.

Palmer M.V., *Mycobacterium bovis* Shuttles between domestic animals and wildlife. *Microbe* 2008; Vol. 3(1): 27-34.

Parra A., Larrasa J., García A., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza J. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol* 2005; 110:293-300.

Parra A., García N., García A., Lacombe A., Moreno F., Freire F., Moran J., Hermoso de Mendoza J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 2008; 127: 315-324.

Pereira S.A.L., Estrada C.C., Arriaga D.C., Espinoza C., Mancilla R. Coexpression of NRAMP1, iNOS, and nitrotyrosine in bovine tuberculosis. *Vet Pathol* 2006; 43: 709-717.

PHAC Public Health Agency of Canada. Canadian tuberculosis standards 6TH Edition 2007; 348-352.

Porphyre T., Stevenson M.A., Mc Kenzie J. Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle farms and their relationship with possum control strategies. *Prev Vet Med* 2008; 86:93-106.

Price S.J., Hope J.C. Enhanced secretion of interferon- γ by bovine $\gamma\delta$ T cells induced by coculture with *Mycobacterium bovis*-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology* 2008; 126: 201-208.

Proaño-Perez F., Benítez-Ortiz W., Celi-Eraza M., Ron-Garrido L., Benítez-Capristros R., Portaels F., Rigouts L., Linden A. Am. Comparative intradermal tuberculin test in dairy cattle in the north of Ecuador and risk factors associated with bovine tuberculosis. *J Trop Med Hyg* 2009; 81(6): 1103-1109.

Probst C., Freuling C., Moser I., Geve L., Köhler H., Conraths F.J., Hotzel H., Liebler-Tenorio E.M., Kramer M. Bovine tuberculosis: making a case for effective surveillance. *Epidemiol Infect* 2011; 139: 105-112.

Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 213-232.

Ramírez-Villaescusa A.M., Medley G.F., Mason S., Green L.E. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. *Prev Vet Med* 2010. 95 (3-4): 224-230.

Rasolofo-Razanamparany V., Ménard D., Rasolonavalona T., Ramarokoto H., Rakotomanana F., Aurégan G., Vincent V., Chanteau S. Prevalence of *Mycobacterium bovis* in human pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; Vol. 3(7): 632-634.

Rennie B., Filion L.G., Smart N. Antibody response to a sterile filtered PPD tuberculin in *M. bovis* infected and *M. bovis* sensitized cattle. *BMC Vet Res* 2010; 6:50.

Rezwan M., Grau T., Tschumi A., Sander P. Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 2007; 153 (3):652-658.

Rhind S.M. CD1-The pathology perspective. *Vet Pathol* 2001; 38: 611-619.

Robert J., Boulahbal F., Trystram D., Truffot-Pernot C., Benoist A.C., Vincent V., Jarlier V., Grosset J. A national survey of human *Mycobacterium bovis* infection in France. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; Vol. 3(8): 711-714.

Rodgers J.D., Connery N.L., McNair J., Welsh M.D., Skuce R.A., Bryson D.G., McMurray D.N., Pollock J.M. Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: A novel model to study bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2007; 87: 405-414.

Romero T.A., Arriaga D.C., Guevara V.J., García S.J.A., Torres L.R.A., Estrada-Chávez C. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. *Vet Méx* 2006; 37(1): 137-143.

De La Rúa-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2006; 86: 77-109.

De La Rúa-Domenech R., Goodchild A.T., Vordemeier H.M., Hewinson R.G., Christiansen K.H., Clifton-Hadley R.S. Antemortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin test, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 2006; 81: 190-210.

SAGARPA SENASICA 2011 <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>

Schmidt C.O., Kohlmann T. Risk quantification in epidemiologic studies. *Int J Public Health* 2008; 53: 118-119.

Serrano-Moreno B.A., Romero T.A., Arriaga C., Torres R.A., Pereira-Suárez A.L., García-Salazar J.A., Estrada-Chávez C. High frequency of *Mycobacterium bovis* DNA in colostrum from tuberculous cattle detected by nested PCR. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 258-266.

Shitaye J.E, Tsegaye W., Pavlik I. Bovine tuberculosis infection in animals and human populations in Ethiopia: a review. *Vet Med* 2007; Vol. 52(8): 317-332.

Skinner M.A., Wedlock D.N., Buddle B.M. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev Sci Tech* 2001; 20(1): 2536-2544.

Skinner M.A., Buddle B.M., Wedlock D.N., Keen D., DE Lisle G.W., Tascon R.E., Ferraz J.C., Lowrie D.B., Cockle P.J., Vordermeier H.M., Hewinson R.G.A. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2003; Vol. 71(9): 4901-4907.

Smith S.M., Malin A.S., Lukey P.T., Atkinson S.E., Content J., Huygen K., Dockrell H.M. Characterization of human *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin-reactive CD8⁺ T cells. *Infect Immun* 1999; Vol. 67(10): 5223-5230.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; Vol. 16(3): 463-496.

Sun J., Wang X., Lau A., Liao A., Bucci C., Hmama Z. Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine Raw 264.7 macrophages. *PLoS ONE* 2010; Vol. 5 (1) e8769 www.plosone.org

Tadayon K., Mosaravi N., Sadeghi F., Forbes K.J. *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian cattle, Iran. *Emerg Infect Dis* 2008; Vol. 14(12): 1919-1921.

Tamaya K., Wang C., Besra G.S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2005; Vol. 18(1): 81-101.

Thom M., Howard C., Villareal-Ramos B., Mead E., Vordermeier M., Hope J. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis* 2008; Vol. 88(4): 324-334.

Toledo O.P., Milián S.F., Santillan F.M.A., Ramírez C.I.C. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Vet Méx* 1999; Vol. 30(3): 227-229.

Tsegaye W., Aseffa A., Mache A., Mengistu Y., Berg S., Ameni G. Conventional and molecular epidemiology of bovine tuberculosis in dairy farms in Addis Ababa city, the capital of Ethiopia. *Intern J Appl Res Vet Med* 2010; Vol 8(2): 143-151.

Une Y., Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30: 415-425.

Villareal-Ramos B., Mc Aulay M., Chance V., Martin M., Morgan J., Howard C.J. Investigation of the role of CD8⁺ T cells in bovine tuberculosis in vivo. *Infect Immun* 2003; Vol. 71(8): 4297-4303.

Vordermeier H.M., Villareal-Ramos B., Cockle P.J., Mc Auley M., Rhodes S.G., Thacker T., Gilbert S.C., Mc Shane H., Hill A.V.S., Xing Z., Hewinson R.G. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG – induced protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2009; Vol. 77(8): 3364-3373.

Walburger A., Koul A., Ferrari G., Nguyen L., Prescianotto-Baschong C., Huygen K., Klebl B., Thompson C., Bacher G., Pieters J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 2004; 304: 1800-1804.

Waters W.R, Palmer M.V., Pesch B.A., Olsen S.C., Wannemuehler M.J., Whipple D.L. Lymphocyte subset proliferative responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 77: 257-273.

Waters W.R., Palmer M.V., Thacker T.C., Bamantine J.P., Vordermeier H.M., Hewinson R.G., Greenwald R., Esfandiari J., McNair J., Pollock J.M., Andersen P., Lyashchenko K.P. Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13(6): 648-654.

Waters W.R., Palmer M.V., Thacker T.C., Payeur J.B., Harris N.B., Minion F.C., Greenwald R., Esfandiari J., Andersen P., McNair J., Pollock J.M., Lyaschenko K.P. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clin Vaccine Immunol* 2006; Vol. 13(6): 611-619.

Waters W.R., Nonnecke B.J., Olsen S.C., Palmer M.V. Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon- γ responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Vet Microbiol* 2007; 119: 277-282.

Waters W.R., Whelan A.O., Lyashchenko K.P., Greenwald R., Palmer M.V., Harris B.N., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. Immune responses in cattle inoculated with *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, or *Mycobacterium kansasii*. Clin Vaccine Immunol 2010; 17(2): 247-252.

Wedlock D.N., Vesosky B., Skinner M.A., De Lisle G.W., Orme I.M., Buddle B.M. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. Infect Immun 2000; Vol. 68(10): 5809-5815.

Wedlock D.N., Denis M., Vordermeier M.H., Hewinson R.G., Buddle B. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. Vet Immunol Immunopathol 2007; 118: 50-58.

Welsh M.D., Cunningham R.T., Corbett D.M., Girvin R.M., McNair J., Skuce R.A., Bryson D.G., Pollock J.M. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology 2005; 114: 101-111.

Whelan C., Shuralev E., O'Keeffe G., Hyland P., Kwok H.F., Snoddy P., O'Brien A., Conolly M., Quinn P., Groll M., Watterson P., Call S., Kenny K., Duignan A., Hamilton M.J., Buddle B.M., Johnston J.A., Davis W.C., Olwill S.A., Clarke J. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Clin Vaccine Immunol 2008; Vol. 15(12): 1834-1838.

Whelan A.O., Clifford D., Upadhyay B., Breandon E.L., McNair J., Hewinson G.R., Vordermeier M.H. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. J Clin Microbiol 2010; Vol. 48(9): 3176-3181.

Whelan A.O., Coad M., Upadhyay B.L., Clifford D.J., Hewinson R.G., Vordermeier H.M. Lack of correlation between BCG induced tuberculin skin test sensitization and protective immunity in cattle. *Vaccine* 2011. 29: 5453-5458.

Wilkins M.J., Meyersson J., Bartlett P.C., Spieldenner S.L., Berry D.E., Mosher L.B., Kaneene J.B., Robinson-Dunn B., Stobierski M.G., Boulton M.L. Human *Mycobacterium bovis* infection and bovine tuberculosis outbreak Michigan, 1994-2007. *Emerg Infect Dis* 2008; Vol. 14 (4): 657-660.

Wiker H.G., Harboe M. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992; Vol. 56 (4): 648-661.

Wiker H.G. MPB70 and MPB83 – Major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol* 2009; 69: 492-499.

Wood P.R., Jones S.L. BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2001; 81(1/2): 147-155.

World Health Organization. Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), with the participation of FAO. 1994 WHO/CDS/VPH/94.137

World Health Organization. Report of a WHO/FAO/OIE consultation on animal tuberculosis vaccines. WHO/CDS/VPH/94.138

10. ANEXOS

Cuadro 1. Frecuencias de reactores a la prueba de tuberculina de los grupos inmunizados alojados en el centro de recría. CAIT Hgo. México

Prueba	BCG		CFPE		<i>M. vaccae</i>		Controles		Totales	
	+	total	+	total	+	total	+	total	+	total
1	2	37	2	47	7	37	3	70	14	191
2	1	84	1	70	2	55	1	24	5	233
Totales	3	121†	3	117†	9	92†	4	94†	19	424†
Proporciones	0.0247		0.0256		0.0978		0.0425		0.0448	
Porcentajes	2.47 _a		2.56 _a		9.78 _b		4.25 _a		4.48	

† Cabe aclarar que el numero de los totales es la suma de dos pruebas independientes, pero individuos vacunados no reactores pueden estar tanto en la primera como en la segunda prueba.

^{a,b}Los subíndices iguales son homogéneos con la prueba Chi² ($p > 0.05$).

Fechas de pruebas 1: 31/07/2006; 2: 28/05/2007

Cuadro 2. Porcentaje de la eficacia vacunal de 3 diferentes inmunógenos utilizados para el control de la TBb en el centro de recría. CAIT Hgo. México

Grupo	TANV	TAV	EV %
No vacunado	4.25	-----	-----
BCG Phipps	-----	2.47	41.9
CFPE	-----	2.56	39.7
<i>M. vaccae</i>	-----	9.78	-130.1

EV= Eficacia vacunal

TANV= Tasa de ataque en no vacunados

TAV= Tasa de ataque en vacunados

Cuadro 3. Frecuencias de reactores a las pruebas de tuberculina realizadas en el hato en fase de producción, desglosadas por muestreo y por grupo inmunizado. CAIT Hgo. México

Prueba	BCG		CFPE		<i>M. vaccae</i>		Controles		Totales	
	+	total	+	total	+	total	+	total	+	total
1	0	0	0	7	0	6	5	72	5	85
2	0	4	0	30	0	26	3	90	3	150
3	1	34	5	43	4	26	12	109	22	212
4	3	47	14	49	7	38	18	94	42	228
5	2	48	9	42	4	33	7	98	22	221
6	2	43	3	32	6	32	5	75	16	182
7	5	37	2	26	2	26	9	70	18	159
Totales	13	213†	33	229†	23	187†	59	608†	128	1237†
Proporciones	0.0610		0.1441		0.1229		0.0970		0.1034	
Porcentajes	6.1 _a		14.41 _b		12.29 _b		9.7 _{a b}		10.34	

† Cabe aclarar que el número de los totales es la suma de 7 pruebas independientes, pero los individuos vacunados no reactores pueden estar en varias pruebas. ^{a b}Los subíndices iguales son homogéneos con la prueba Chi² ($p > 0.05$).

Fechas de pruebas: 1: 06/03/2007; 2: 31/07/2007; 3: 22/01/2008; 4: 09/06/2008; 5: 11/11/2008; 6: 31/03/2009; 7: 30/08/2009.

Cuadro 4. Eficacia vacunal de 3 diferentes inmunógenos, calculada con resultados de la prueba de tuberculina de bovinos en producción de un hato lechero de alta prevalencia. CAIT Hgo. México

Grupo	TANV	TAV	EV %
No vacunado	9.7	-----	-----
BCG Phipps	-----	6.1	37.11
CFPE	-----	14.41	-48.55
<i>M. vaccae</i>	-----	12.29	-26.7

EV= Eficacia vacunal

TANV= Tasa de ataque en no vacunados

TAV= Tasa de ataque en vacunados

Cuadro 5. Frecuencias obtenidas mediante los expedientes de necropsias, de animales con lesiones compatibles a TBb por grupo inmunizado. CAIT Hgo. México

Grupos	BCG		CFPE		<i>M. vaccae</i>		Controles	
	+	total	+	total	+	total	+	total
Frecuencias	1	11	1	8	3	13	25	196
Proporciones	0.0909		0.1250		0.2307		0.1275	
Porcentajes	9.09 _a		12.5 _a		23.07 _a		12.75 _a	

^{a,b} Los subíndices iguales son homogéneos con la prueba Chi² ($p > 0.05$).

Cuadro 6. Porcentajes de eficacia vacunal determinada mediante los resultados de las frecuencias de animales con lesiones compatibles a TBb a partir de los registros de necropsias. CAIT Hgo. México

Grupo	TANV	TAV	EV %
No vacunado	12.75	-----	-----
BCG phipps	-----	9.09	28.7
CFPE	-----	12.5	1.96
<i>M. vaccae</i>	-----	23.07	-80.94

EV= Eficacia vacunal

TANV= Tasa de ataque en no vacunados

TAV= Tasa de ataque en vacunados

Cuadro 7. Frecuencias en los grados de diseminación de la enfermedad presentes dentro de los grupos de estudio

Grupos	Grados de lesión			
	1	2	3	4
Vacunados	5	0	0	0
No vacunados	17	1	3	4

1 = Linfadenopatía granulomatosa. 2 = Mastitis crónica granulomatosa.

3 = Bronconeumonía granulomatosa. 4 = Tuberculosis miliar generalizada.

Cuadro 8. Pruebas Kruskal-Wallis que fueron significativas en los diferentes antígenos y muestreos

Antígeno	PPD avium	PPD bovis	CFP-10
Muestreo			
0	NS	NS	NS
15	$p < 0.05$ *	$p < 0.05$ *	NS
30	$p < 0.05$ *	$p < 0.05$ *	NS
60	NS	$p < 0.05$ *	NS
90	NS	NS	NS
150	$p < 0.05$ *	$p < 0.05$ *	NS
210	NS	NS	NS

* Fueron significativas. NS= No fueron significativas ($p > 0.05$).

Cuadro 9. Resultados de la prueba de Dunn

Antígeno	Avium			Bovis		
	Control	10^4	10^6	Control	10^4	10^6
Muestreo al día						
15	_____	_____	_____	_____	_____	_____
30	_____	_____	_____	_____	_____	_____
60	_____	_____	_____	_____	_____	_____
150	_____	_____	_____	_____	_____	_____

La continuidad en la línea muestra que hubo igualdad estadística entre grupos con la prueba de Dunn, los grupos en donde no hay continuidad son diferentes.

Cuadro 10. Frecuencias de becerras positivas a la prueba de IFN- γ y significancias de la prueba χ^2 de homogeneidad

Muestreo al día	Dosis 10^4			Dosis 10^6			Control			χ^2
	PPDB	CFP-10	Total	PPDB	CFP-10	Total	PPDB	CFP-10	Total	
0	0	0	12	0	1	12	0	0	12	NS
15	0	0	12	2	0	12	0	0	12	NS
30	2	0	11	5	1	12	1	0	12	NS
60	1	1	11	2	0	11	1	0	12	NS
90	1	0	11	0	0	10	2	2	12	NS
150	0	0	11	0	0	10	0	0	12	NS
210	0	0	11	0	0	9	1	1	12	NS

NS= No fueron significativos ($p > 0.05$).

Cuadro 11. Frecuencias de animales reactivos a la prueba de tuberculina por grupos vacunados

Prueba.	Control		10 ⁴		10 ⁶	
	+	Total	+	Total	+	Total
3 meses posvacunación	0 _a	12	2 _a	11	3 _a	11
7 meses posvacunación	1 _a	12	1 _a	11	1 _a	9

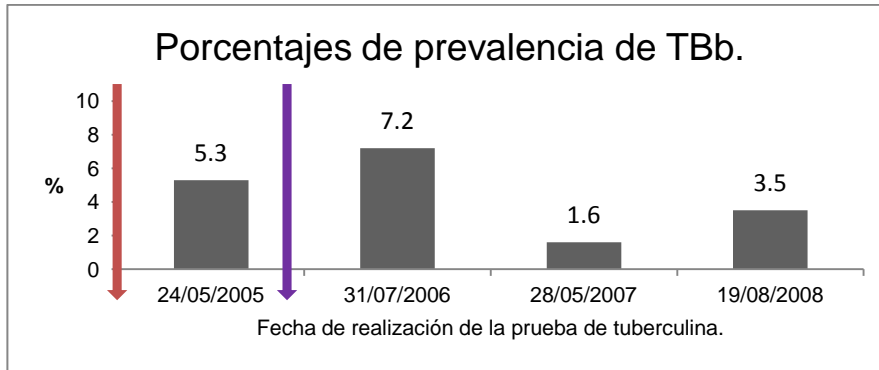
^a Los subíndices iguales son homogéneos con la prueba Chi² ($p > 0.05$).

Cuadro 12. Resultados de las frecuencias de animales a la prueba PCR

Muestreo	0		30		60		90		150		210	
Grupo	+	Total	+	Total	+	Total	+	Total	+	Total	+	Total
10 ⁴	0 _a	12	0 _a	11	0 _a	11	0 _a	11	0 _a	11	0 _a	11
10 ⁶	0 _a	12	0 _a	12	0 _a	11	0 _a	10	0 _a	10	0 _a	9
Control	0 _a	12	0 _a	12	0 _a	12	0 _a	12	0 _a	12	0 _a	12

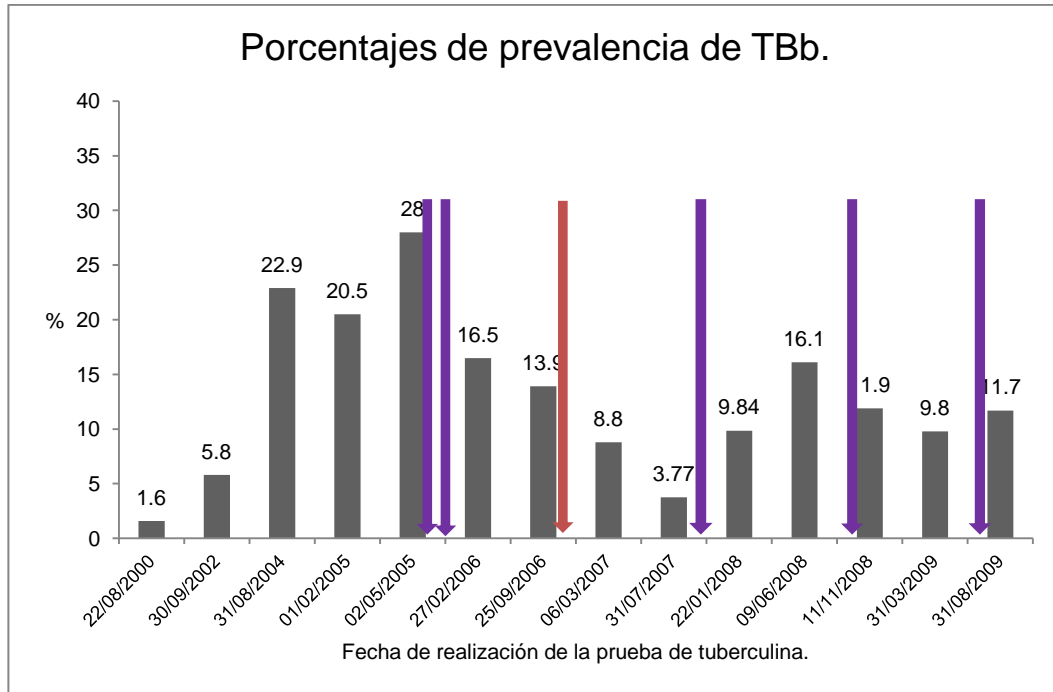
^a Los subíndices iguales son homogéneos con la prueba Chi² ($p > 0.05$).

Figura 1. Comportamiento de la prevalencia a TBb en el centro de recría CAIT Hgo. México en un periodo de 2005-2008



- ↓ Inicio de vacunación de la recría 05-05-2005
- ↓ Introducción de ganado por compra. 17-09-2005

Figura 2. Comportamiento de la prevalencia a TBb en el hato en producción CAIT, Hgo. México en un periodo del año 2000 – 2009

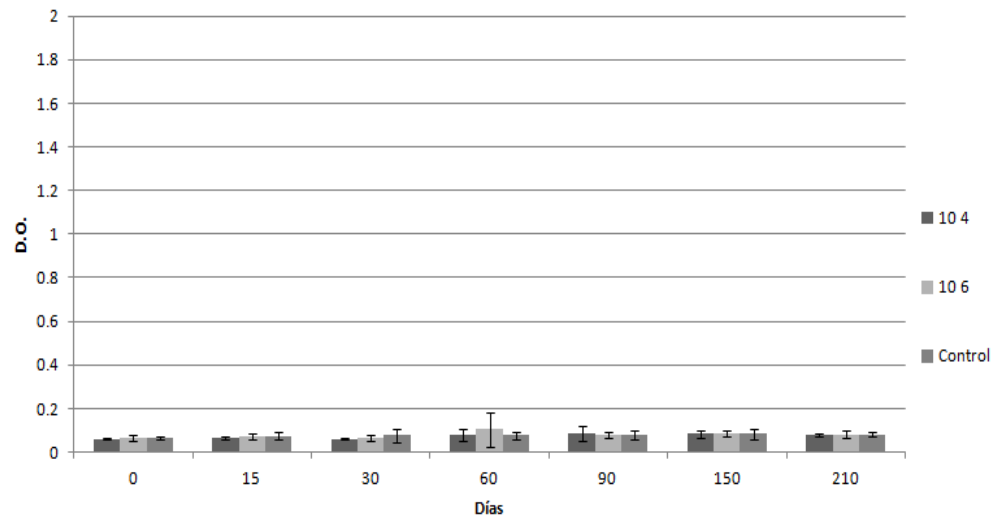
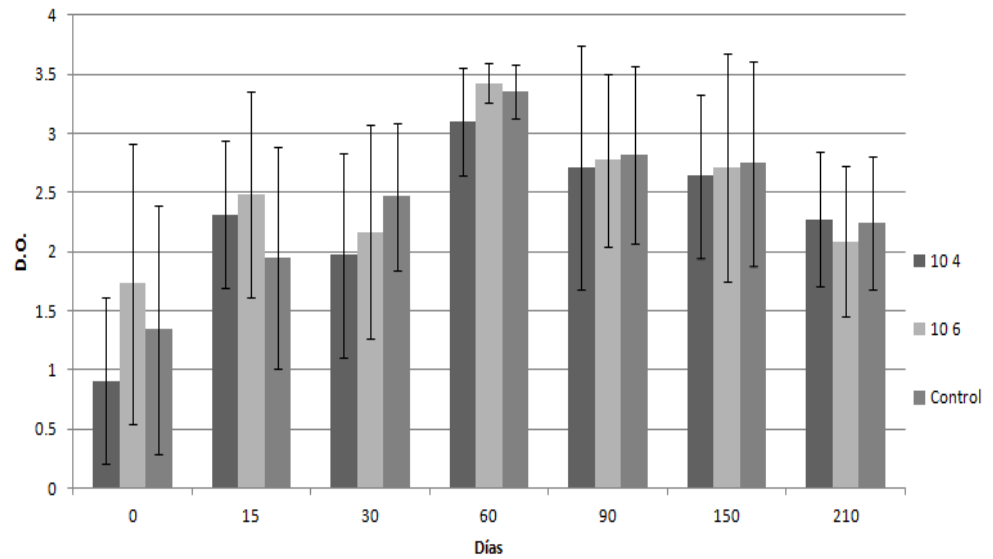


↓ Introducción de los animales vacunados al hato en producción

↓ Introducción de ganado por compra fechas: 17-09-2005, 04-02-2006, 07-12-2007, 10-11-2008, y 16-07-2009

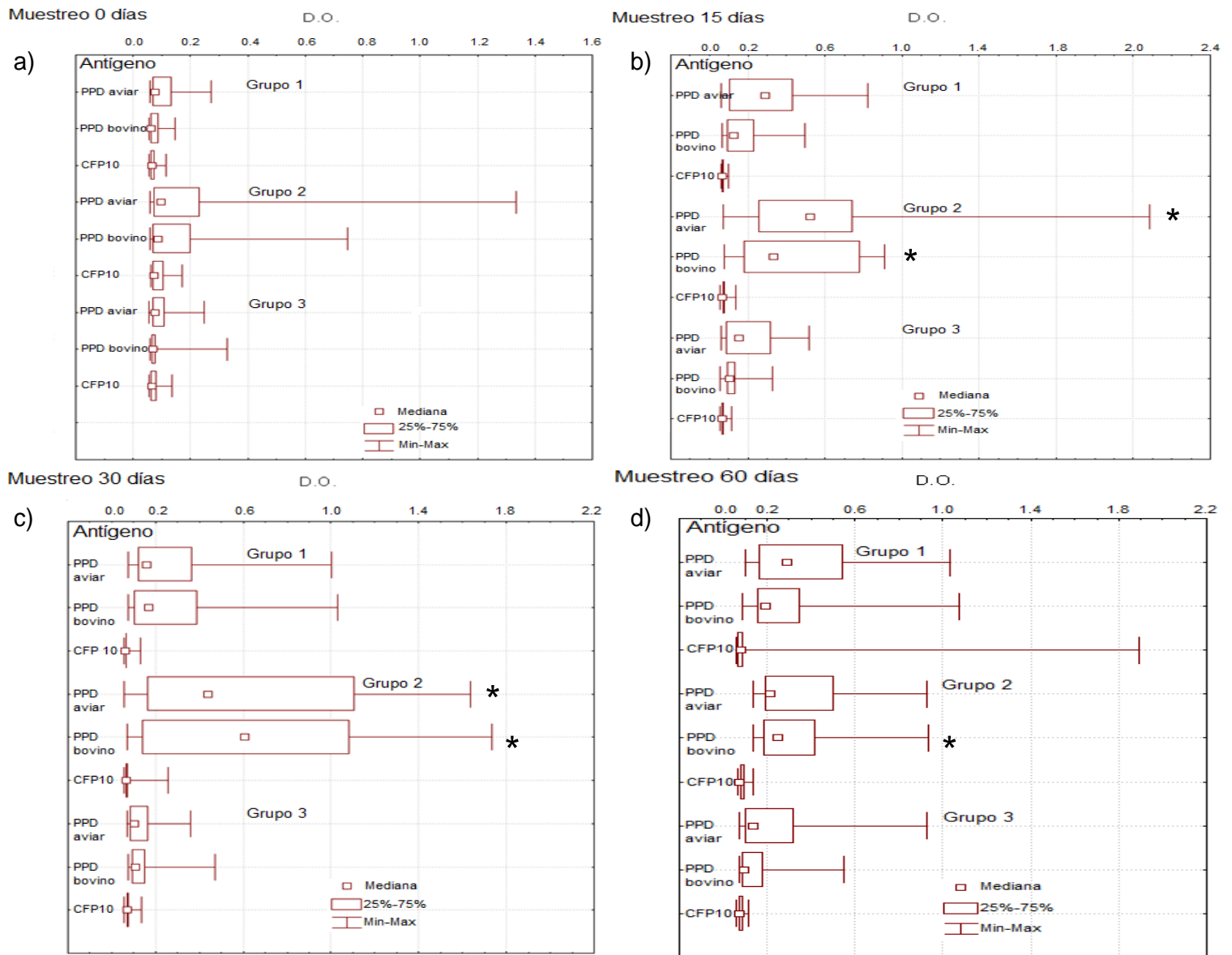
Figuras 3a y 3b. Cinéticas de producción de la citocina IFN- γ medida en D.O. expresada como valor promedio y desviación estándar, del mitógeno (pokeweed) y del control sin estímulo en los 3 diferentes grupos

a)



b)

Figuras 4a, 4b, 4c y 4d. Graficas de caja de las cinéticas de producción de IFN- γ , medidas en D.O. como valor de la mediana, en los muestreos 0, 15, 30 y 60 días respectivamente, en 3 grupos de becerras con 3 diferentes antígenos



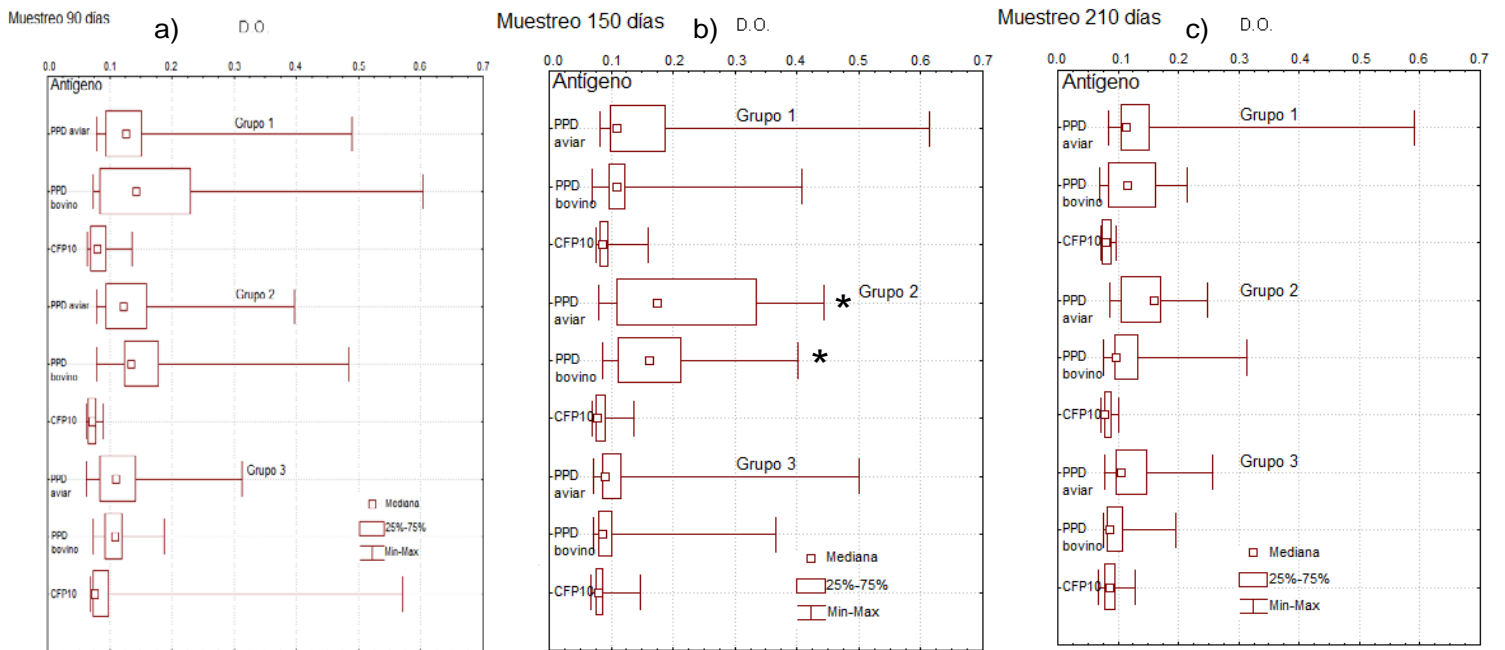
* $p < 0.05$ con la prueba de Dunn.

Grupo 1: Vacunado con dosis 1×10^4 .

Grupo 2: Vacunado con dosis 1×10^6 .

Grupo 3: Control.

Figuras 5a, 5b y 5c. Graficas de caja de las cinéticas de producción de IFN- γ medida como valor de la mediana en D.O., de los muestreos 90, 150 y 210 días respectivamente, en los 3 grupos de becerras, estimulando con 3 diferentes antígenos



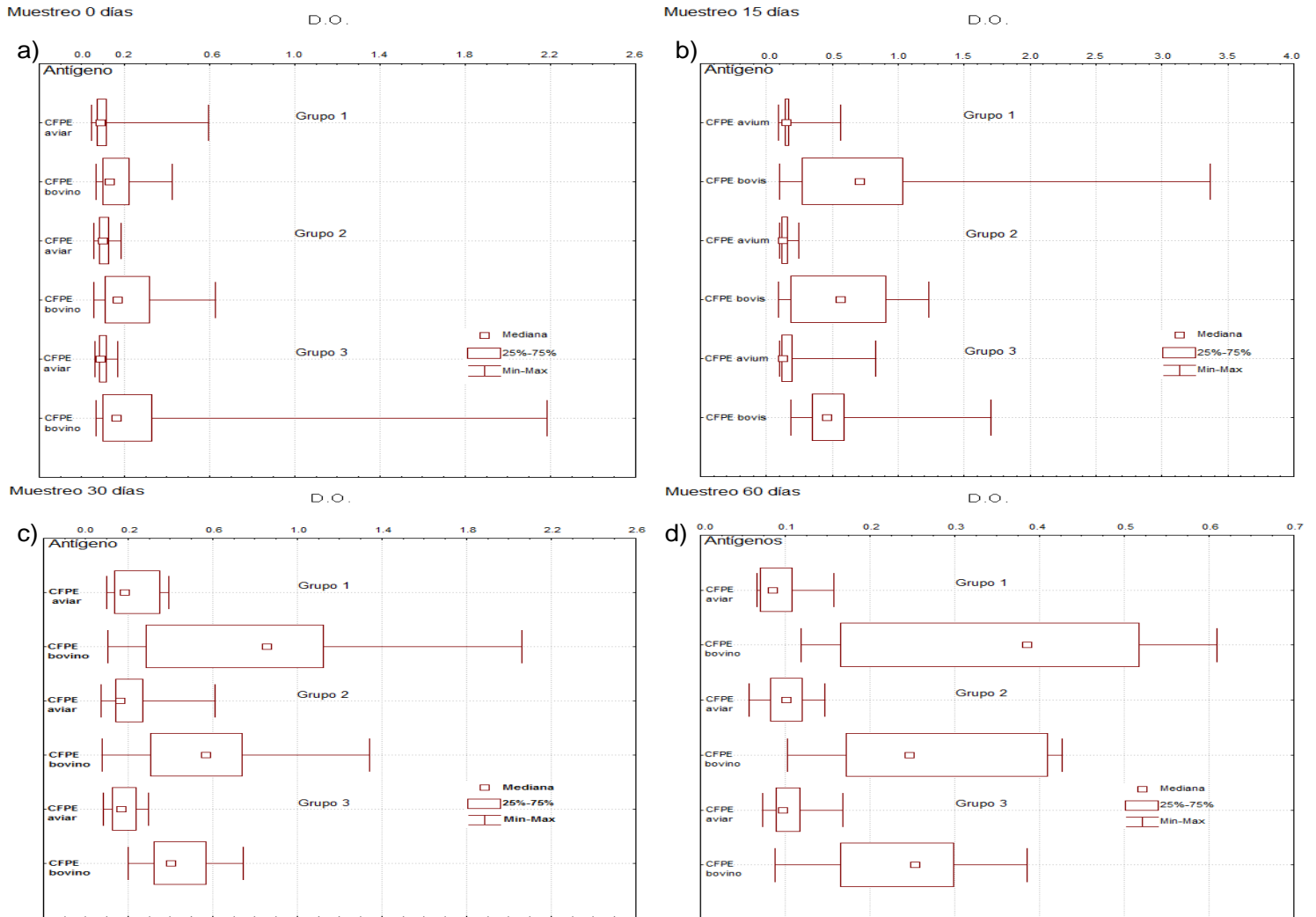
* $p < 0.05$ con la prueba de Dunn.

Grupo 1: Vacunado con dosis 1×10^4 .

Grupo 2: Vacunado con dosis 1×10^6 .

Grupo 3: Control.

Figura 6a, 6b, 6c y 6d. Graficas de caja de las cinéticas de producción de anticuerpos mediante la prueba de ELISA expresadas como el valor de la mediana, en D.O. de los muestreos 0, 15, 30 y 60 días respectivamente, en 3 grupos de becerras, utilizando 2 diferentes antígenos

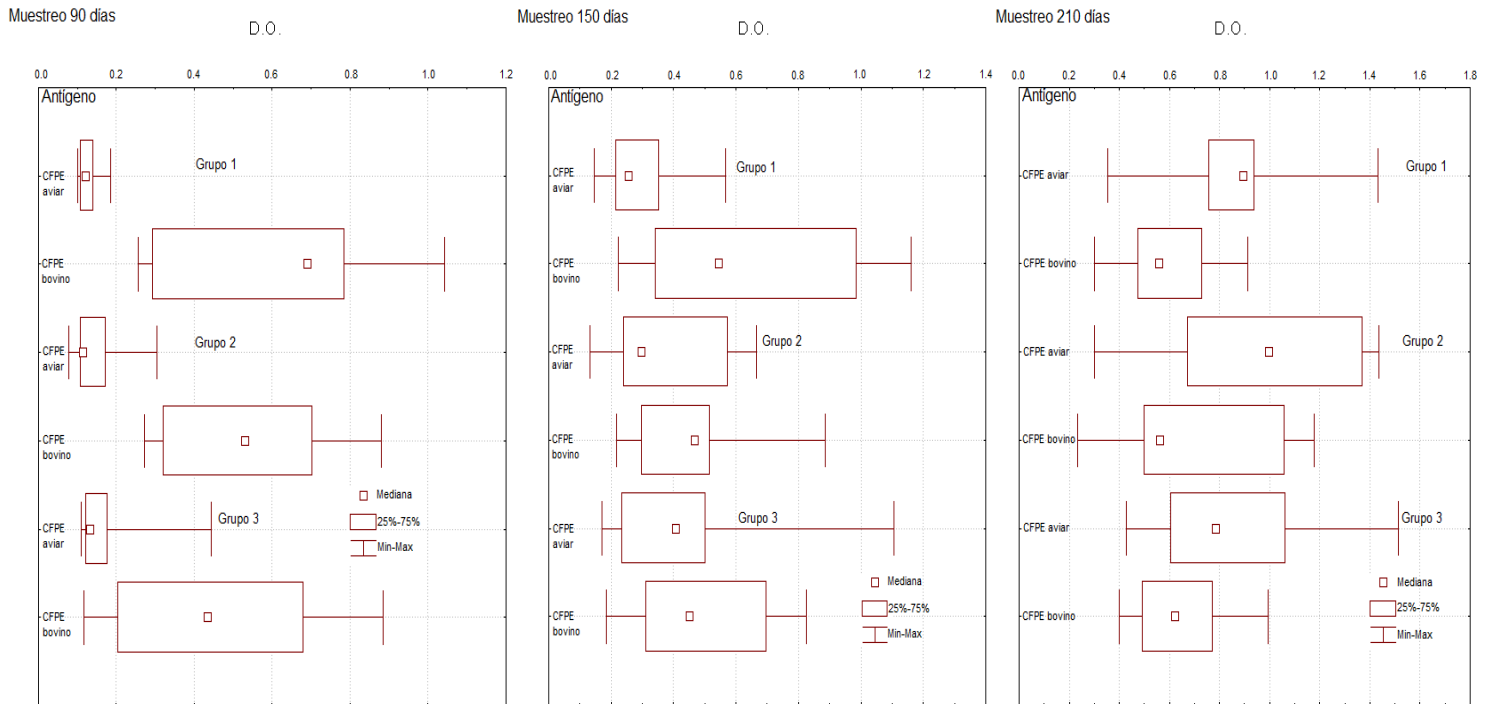


Grupo 1: Vacunado con dosis 1×10^4 .

Grupo 2: Vacunado con dosis 1×10^6 .

Grupo 3: Control.

Figura 7a, 7b y 7c. Graficas de caja de las cinéticas de producción de anticuerpos mediante la prueba de ELISA expresadas como el valor de la mediana, en D.O. de los muestreos 90, 150 y 210 días respectivamente, en 3 grupos de becerras utilizando 2 diferentes antígenos



Grupo 1: Vacunado con dosis 1×10^4 .

Grupo 2: Vacunado con dosis 1×10^6 .

Grupo 3: Control.

Reactivos y soluciones utilizadas en las pruebas de laboratorio

Prueba de ELISA

Solución de pegado: Buffer de Carbonatos 0.06 M pH 9.6

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 3.8gr/l

Carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1.93gr/l

Agua destilada 1l

Solución de lavado: Buffer Fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.4 con NaCl y 0.1 % de Tween 20

Fosfato disódico hidrogenado (Na₂HPO₄) 1.1gr/l

Fosfato sódico dihidrogenado (NaH₂PO₄) 0.32gr/l

Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l

Tween 20 0.5ml/l

Agua destilada 1l

Solución bloqueadora: 1.5% de leche descremada en PBS y 0.1% de Tween 20

Fosfato disódico hidrogenado (Na₂HPO₄) 1.1gr/l

Fosfato sódico dihidrogenado (NaH₂PO₄) 0.32gr/l

Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l

Tween 20 0.5ml/l

Leche descremada en polvo 1.5 gr/100ml

Agua destilada 1l

Solución de revelado: Buffer citratos pH 4.5

Acido cítrico (C₆H₈O₇) 4.6 gr/l

Citrato trisódico (Na₃C₆H₅O₇) 7.4 gr/l

Agua destilada 1l

Agregar al momento de su empleo: ortofenildiamina 4µg/10ml y agua oxigenada (H₂O₂) al 3%, 4µl/10ml

Prueba de IFN- γ

PPD bovino: 3,250 UI/ml

PPD aviar: 5,000 UI/ml

Control positivo bovino: del IFN- γ contiene 0.01 % p/v thimerosal

Control negativo bovino: del IFN- γ contiene 0.01 % p/v thimerosal

Diluyente verde: diluyente para plasma contiene 0.01 % p/v thimerosal

Búfer de lavado: concentración 20 X contiene 0.01 % p/v thimerosal

Conjugado: concentración 100 X Horseradish peroxidase labeled antibovine IFN- γ contiene 0.01 % p/v thimerosal

Diluyente azul: diluyente para el conjugado concentración 5 X, 0.05 % p/v thimerosal

Búfer enzima-sustrato: H₂O₂

Cromógeno: solución en concentración 100 X contiene Tetrametil bencidina (TMB) en DMSO

Solución de paro: H₂SO₄ 0.5 M

Extracción de ADN

TE 10X: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA

Solución de lisozima: disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de agua destilada

SDS al 10%: disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada

Proteinasa K: disolver 10 mg en 1 ml de agua destilada

NaCl 5M: disolver 29.2 g de NaCl en 100 ml de agua destilada

CTAB (N-Cetyl-N,N,N,-trimethyl ammonium bromide)/NaCl: disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada y adicionar 10 g de CTAB