



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON BCG EN VACAS REACTORAS Y NO
REACTORAS A LA TUBERCULINA, MEDIDO CON LAS PRUEBAS
DIAGNOSTICAS DE RUTINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

LYSETT CORONA GÓMEZ

ASESOR: MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ

CO ASESORES: DR. FERNANDO DÍAZ OTERO

M. EN C. LAURA JARAMILLO MEZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

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

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

EFFECTO DE LA VACUNACIÓN CON BCG EN VACAS REACTORAS Y NO REACTORAS
 A LA TUBERCULINA, MEDIDO CON LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE RUTINA.

Que presenta la pasante: Lysett Corona Gómez
 Con número de cuenta: 40406347-4 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 7 de Marzo de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. José Antonio Licea Vega	
VOCAL	MVZ. Rafael Pérez González	
SECRETARIO	Dr. Antonio Gómez Alcántara	
1er SUPLENTE	MVZ. José Alfredo García Salazar	
2do SUPLENTE	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	

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

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres.

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento de mi capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mis hermanos y amigos por sus consejos y apoyo.

**LA INVESTIGACIÓN SE EFECTUÓ EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES EN
MICROBIOLOGÍA ANIMAL (CENID-MICROBIOLOGÍA-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

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esto agradezco a mis asesores, Dr. Fernando Díaz Otero, MVZ. Rafael Pérez González, M. en C. Laura Jaramillo Meza y Dr. Fernando Osnaya Gallardo quienes a lo largo de este tiempo me han transmitido sus conocimientos y experiencias además de su confianza para el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros y amigos de proyecto Lic. Eve-lyne Quevillon Cardinal, MVZ. Felipe Ángel Castañeda Cuevas, M. en C. Xochitl Eva González, MVZ. Gabriela Vega Munguia, MVZ. Brenda Argelia V. Gil Centeno, gracias por las experiencias y el apoyo brindado.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Generalidades de <i>Mycobacterium bovis</i>	4
1.2. Importancia de la tuberculosis bovina en salud pública	5
1.3. Impacto económico de la tuberculosis bovina	6
1.4. Patogenia y respuesta inmune de la tuberculosis bovina	6
1.5. Métodos de diagnóstico para tuberculosis bovina	10
1.5.1 Prueba de intradermorreacción (ID)	11
1.5.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ)	12
1.5.3. Prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	13
1.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	14
1.5.5. Aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica	14
1.6. Medidas de bioseguridad en explotaciones lecheras	15
1.6.1 Segregación	16
1.6.2 Agentes Químicos	18
1.6.3 Manejo del Calostro	18
1.7. Vacuna BCG empleada contra tuberculosis bovina	20
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos Particulares	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1. Animales de estudio	22
4.2. Diseño experimental	23
4.3. Establecimiento de medidas de bioseguridad en el hato lechero	24
4.4. Elaboración de BCG	24
4.5. Prueba de tuberculina doble comparativa (IDD)	26
4.6. ELISA doble comparativa	26

4.7.	Aplicación de otras pruebas diagnosticas a 20 vacas en producción con diferentes patrones inmunológicos.	27
4.8.	Prueba para la detección de IFN- γ	27
4.9.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
4.10.	Aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica	29
4.11.	Análisis estadístico	29
5.	RESULTADOS	29
5.1.	Resultados de ID	29
5.2.	Resultados de ELISA	31
5.3.	Resultados de otros métodos de diagnostico en 20 animales con diferentes patrones inmunológicos (ELISA, ID, PCR, IFN- γ , cultivo bacteriológico)	33
5.4.	Resultados del cultivo bacteriológico	37
5.	DISCUSIÓN	37
6.	CONCLUSIONES	41
7.	ANEXO 1 REACTIVOS	42
8.	ANEXO 2 ABREVIATURAS	43
9.	BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecciosa, crónica y zoonótica de origen bacteriano causada por el agente infeccioso *Mycobacterium bovis*, el cual se caracteriza por formar granulomas principalmente en nódulos linfáticos y pulmones; es una de las enfermedades que más pérdidas causa en los sistemas de producción de ganado lechero, en los últimos años la incidencia de esta enfermedad ha ido en aumento alrededor del mundo, debido a ello es necesario la aplicación de estrategias más efectivas de control que el método de prueba y sacrificio el cual llega a ser incosteable. Desde hace más de diez años, se ha evaluado la vacunación como un método más de control, conjuntamente con el establecimiento de pruebas de diagnóstico que permitan diferenciar animales vacunados de infectados.

El objetivo del presente estudio fue conocer la respuesta a las pruebas de ID y ELISA posvacunación con BCG cepa *Phipps* en vacas adultas en producción, reactoras y no reactoras a la prueba de tuberculina, en un hato el cual fue evaluado bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95, donde cronológicamente se presentó un porcentaje de animales reactivos a la prueba de tuberculina del 5.2% en el año 2008, de 5.4% en el 2009 y en el 2010 el porcentaje se incrementó hasta 49.39%. Motivo por el cual, fue necesaria la implementación de medidas urgentes en el control de la TBB. La respuesta inmune fue evaluada con la prueba de tuberculina doble comparativa (IDR) y la prueba de ELISA, las cuales fueron realizadas antes y después de la vacunación con BCG cepa *Phipps* a una dosis de 1×10^4 UFC; en este estudio se pudo observar que la inmunización no alteró de manera significativa los resultados de la prueba de tuberculina, a diferencia de la prueba de ELISA que se obtuvo una diferencia significativa ($P < 0.05$) a los 6 meses después de la vacunación, lo que nos indica la presencia de anticuerpos probablemente al PPD.

En la prueba de ID se observó que un 87.2% de los animales negativos siguieron siendo negativos a los 6 meses, mientras que un 12.8 % (16/125) reaccionaron a la tuberculina. La prueba de ELISA resultó ser una herramienta importante para detectar

animales anérgicos los cuales son un foco importante de diseminación de la enfermedad.

Por otro lado, simultáneamente dentro del estudio se seleccionaron 20 vacas con diferentes patrones inmunológicos, conformando 4 grupos de 5 animales cada uno, en los cuales se aplicaron pruebas complementarias de diagnóstico a los 3 y 6 meses después de la inmunización, como son la prueba de IFN- γ , empleando como antígeno ESAT-6, el cual resultó ser una valiosa herramienta en este trabajo para diferenciar animales vacunados de infectados, conjuntamente se realizaron pruebas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde los resultados fueron variables, por la misma naturaleza de la enfermedad y factores relacionados con el estado inmune de los animales, así como factores ambientales.

Por último se estableció el cultivo bacteriológico que no resultó ser una prueba práctica para el diagnóstico de TBB, con muestras de exudado nasal ya que no se logró el crecimiento de las micobacterias. Sin embargo, se requieren de más estudios para poder considerar la vacunación de ganado como una de las medidas de control para la TBB, así como establecer pruebas de diagnóstico más específicas y sensibles.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico en la cual el organismo responde principalmente con la formación de granulomas. La enfermedad es producida principalmente por *Mycobacterium bovis*, especie miembro del complejo *M. tuberculosis*; se considera una zoonosis por lo que representa un problema importante de salud pública, además de ser una de las principales causas de pérdidas económicas en ganado por disminución de la producción láctea y de carne. En México, el inventario nacional bovino es al alrededor de 30 millones de cabezas, donde el 90% se dedica a la producción de carne y doble propósito y el 10%, representa ganado especializado en la producción de leche.¹

Dado que la distribución de la TBB no es homogénea, la movilización y comercialización de ganado es restringida. Para reducir los efectos de la enfermedad en México se creó la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95.¹

Algunos de los factores de riesgo que predisponen la manifestación de la TBB son el hacinamiento, el tamaño del hato, y la presencia de enfermedades inmunosupresoras como diarrea viral bovina (DVB) y leucosis bovina, entre otras.^{2,3}

En México, como en gran parte del mundo, los programas gubernamentales para controlar y erradicar la TBB utilizan un esquema de aplicación intradérmica de la tuberculina (PPD) y el sacrificio de los animales reactivos. Sin embargo, se estima que hasta un 19% del ganado tuberculoso no reacciona a la tuberculina por lo que la reincidencia de hatos previamente saneados genera problemas socioeconómicos y de credibilidad en las campañas de erradicación. La evaluación *in vitro* de la respuesta inmune por medio de la prueba de interferon-gamma (IFN- γ), es actualmente un campo que brinda buenas alternativas para complementar el diagnóstico de TBB.⁴

Estudios experimentales recientes en ganado bovino han demostrado que la vacunación con BCG ofrece una gran expectativa en el control de la TBB, ya reduce

significativamente la severidad de las lesiones y la patología; ⁵ actualmente se ha demostrado que la protección inducida por la vacunación desde el nacimiento y hasta las 6 semanas de edad es más eficiente en ganado lechero.⁶

La vacunación aunada a medidas de bioseguridad adecuadas como la eliminación de fuentes de infección, el diagnóstico temprano, la cuarentena y el control de movimiento del ganado, tendría un impacto positivo para el control y la erradicación de la TBB.⁷

1.1. Generalidades de *Mycobacterium bovis*

La tuberculosis es ocasionada por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, compuesto por *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y más recientemente ha sido descritas *M. canetti* y *M. mungi* como parte del complejo.^{8,9}

Las micobacterias se han clasificado en diversos grupos de acuerdo a diferentes características; con base en pruebas bioquímicas y en la secuenciación de la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr) se dividen en dos grupos: el complejo *M. tuberculosis* (CMT) y micobacterias no tuberculosas (MNT); las especies del CMT producen tuberculosis en diferentes huéspedes. El grupo de las MNTs está integrado por al menos 154 especies. Con la aparición de la pandemia del SIDA y la introducción de terapias inmunosupresoras, la incidencia de las MNTs se ha incrementado de manera dramática hasta el punto de que actualmente son consideradas importantes patógenos para el ser humano. Las MNTs afectan a personas tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidas causando un amplio espectro de enfermedades, cuyas manifestaciones dependen de la interacción de la especie micobacteriana y la respuesta del hospedero.⁹

Con base en su velocidad de crecimiento se clasifican como micobacterias de crecimiento rápido o micobacterias de crecimiento lento, esto, dado el tiempo que tardan en aparecer las colonias en los medios sólidos: 5 días para las de crecimiento rápido y más de 5 días para las de crecimiento lento.¹⁰

El agente etiológico principal de la TBB, es *M. bovis*, es un organismo de morfología bacilar (2 a 4 µm de largo por 0.2 a 0.5 µm de ancho), aeróbico facultativo, no

esporulado, inmóvil, de crecimiento lento y se considera como una bacteria Gram positiva (aunque su tinción por esta técnica es difícil). Su ADN contiene un elevado porcentaje de guanina + citosina.¹¹

Su pared celular contiene más de 60% de lípidos, responsables de su resistencia a la decoloración con ácido/alcohol, que se evidencia mediante la tinción de Ziehl Neelsen.^{11,12} Los lípidos de la pared permiten a las micobacterias ser impermeables a agentes hidrofílicos; de este modo puede resistir a la desecación, pudiendo mantenerse viables en tierra o heces por muchos meses; protegerse contra de la acción de anticuerpos y desinfectantes.¹³ El centro de la pared celular esta compuesto de peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos y lipoarabinomanano (LAM);¹⁴⁻¹⁶ esta última es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática formando residuos de D – arabinosa y D – manosa.¹⁷⁻²⁰ Un grupo importante de componentes de la pared celular son los acil trealosa 2' sulfatos; estos sulfátidos parecen promover la supervivencia del bacilo tuberculoso virulento dentro de los macrófagos, inhibiendo la formación del fagolisosoma y evitando la exposición a enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas.^{17,18}

1.2. Importancia de la tuberculosis bovina en salud pública

En México de los 9.5 mil millones de litros de leche que se producen, equivalen a 3,516 millones de dólares, el 72% de la producción se pasteuriza y el 28% se consume cruda o se transforma en derivados lácteos sin proceso térmico, lo que implica un riesgo zoonosario y de salud pública.^{1,21}

El riesgo del consumo de carne de animales con lesiones tuberculosas localizadas siempre es menor por lo infrecuente de las localizaciones musculares, aunque puede ocurrir a veces la invasión de bacilos por vía hematogena en determinadas etapas de la evolución patogénica. En humanos, actualmente el pulmón es el órgano más frecuentemente afectado, y el tracto genitourinario es la localización extrapulmonar más usual de la enfermedad producida por *M. bovis*. La bacteria puede transmitirse a través de aerosoles producidos por el animal enfermo, manejo de carcasas o infección

de heridas. Es por lo tanto una infección ocupacional, que afecta principalmente a veterinarios, trabajadores de mataderos y población rural.^{21, 22}

Debido a que la tuberculosis no ha sido erradicada y la existencia de un reservorio de la micobacteria que favorece la infección en la población humana, continuara existiendo casos de tuberculosis producida por *M. bovis*. Por lo tanto, el riesgo para el humano y el ganado, persiste, indicando que es necesaria una continua vigilancia y control.²³

1.3. Impacto económico de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina tiene severas implicaciones en el bienestar animal tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, ya que se sufren grandes pérdidas económicas por la baja producción y el sacrificio prematuro de animales enfermos.²⁴

El impacto económico se refleja sobre todo en el ganado lechero donde las infecciones disminuyen la producción de leche, el valor comercial de la carne y la fertilidad en las hembras; asimismo, ocasiona pérdidas indirectas en los costos de programas de control, que generalmente se convierten en la eliminación de los animales reactivos; las pérdidas económicas a nivel mundial se calculan que sobrepasan los 3 mil millones de dólares anualmente.^{25, 26}

En México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo. Se estima además que la TBB disminuye la producción de leche en un 17%, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta en 15%, y la fertilidad en un 6%. Por otra parte, la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas de 450 millones de dólares anuales.²⁷

1.4. Patogenia y respuesta inmune de la tuberculosis bovina

La infección por *M. bovis* en los bovinos susceptibles se puede producir ya sea por inhalación o por ingestión de los microorganismos. Se cree que la inhalación es la

principal vía de infección en las vacas adultas, estabuladas, e incluso en aquellas que se encuentran en pastoreo; mientras que los animales más jóvenes pueden ser infectados por la ingestión, especialmente de leche infectada. Estas fuentes de infección son consideradas primarias. Las fuentes secundarias son los objetos del medio que han sido contaminados por los animales enfermos y portadores, como el suelo, el alimento, el agua común de bebida y los comederos.^{28, 29}

Los microorganismos se eliminan en el aire con el esputo, heces, leche, orina, secreciones vaginales, uterinas y de ganglios linfáticos periféricos abiertos. El animal enfermo expele el bacilo en el esputo expulsado por la tos, estornudo y con las descargas salivales y nasales o al mugir. El animal adquiere la infección por inhalación de aerosoles contaminados y/o por las secreciones antes mencionadas.^{29, 30}

El bacilo una vez dentro del organismo se propaga en dos etapas. La del complejo primario y la de diseminación posprimaria. El complejo primario consta de la lesión en la puerta de entrada y el ganglio linfático local correspondiente.^{29 30} La calcificación de las lesiones se inicia, aproximadamente, dos semanas después, los focos necróticos en desarrollo se rodean pronto de tejido de granulación y linfocitos formando el granuloma, luego migran hacia los ganglios linfáticos regionales, donde se producen lesiones semejantes.³¹

Estas lesiones pueden permanecer latentes o progresar, de acuerdo con la relación del binomio agente infeccioso – huésped. Si se quiebra la resistencia del animal frente al bacilo tuberculoso, la infección puede difundirse por vía linfohemática, o por los conductos naturales con una generalización precoz. Si el sistema inmune es incapaz de destruir los bacilos, estos formaran granulomas muy grandes y caseificados conocidos como “tubérculos” en los órganos donde se detengan. Esta generalización es la que se conoce como diseminación post primaria, pudiendo dar lugar, también a la tuberculosis miliar aguda.³²

Los tubérculos se forman debido a un factor de virulencia propio de la micobacteria, esto corresponde a que los glucolípidos causan una respuesta granulomatosa y permite la sobrevivencia de la bacteria fagocitada. El factor cordonal dimicolil trealosa, es un glucolípidos de la superficie que hace que la bacteria crezca *in vitro* en cordones con

configuraciones de serpentina y solo lo presentan las cepas virulentas; este factor inhibe la migración de los leucocitos, inmoviliza neutrófilos, actúa como un adyuvante e induce la aparición del granuloma.³³

Una vez instaurada esta respuesta inmunitaria específica, también lo hace la reacción de hipersensibilidad tardía. Ambos fenómenos están estrechamente relacionados entre sí ya que se presentan como resultado de la activación de los linfocitos T. Sin embargo la hipersensibilidad tardía, responsable de la reacción intradérmica positiva frente a la tuberculina, también es la causa de muchos efectos adversos de la tuberculosis como la caseificación y la cavitación, especialmente cuando el antígeno está presente de forma excesiva.^{32,34}

La respuesta inmunológica en la TBB, así como en otras infecciones producidas por bacterias intracelulares, es fundamentalmente de tipo celular en donde los linfocitos T juegan un papel central siendo los responsables de la protección y de la respuesta inflamatoria que causa la patología. Las células del sistema fagocítico mononuclear, los linfocitos T y las células citotóxicas naturales (células NK) son las responsables de erradicar el agente causal, lo cual no siempre es posible. Esta micobacteria al invadir los macrófagos desencadena un proceso inflamatorio donde participan activamente los macrófagos mismos, los linfocitos y los polimorfonucleares (PMN), siendo estos últimos una de las primeras células en migrar desde sangre al sitio de infección, algunos estudios sugieren que los PMN pueden constituir una primera línea de defensa contra el agente causal de la tuberculosis, aunque más adelante otros mecanismos inmunes adquieren más relevancia.³⁵ *M. bovis* utiliza diferentes vías de entrada a los macrófagos, ya que promueve su propia fagocitosis a través de diferentes receptores presentes en la superficie de los macrófagos como, 1) receptores para Fc, 2) receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) receptores carroñeros (scavenger) y 5) receptores para la proteína surfactante A.³⁶

Se ha propuesto que la vía de entrada de la micobacteria, determina su destino dentro de los macrófagos; por ejemplo, la internalización a través de los receptores Fc de la micobacteria opsonizada induce la producción de intermediarios de oxígeno y favorece la fusión fagosoma-lisosoma, mientras que su entrada a través de CR3 inhibe el

estallido respiratorio y no hay maduración de los fagosomas. Posterior a la fagocitosis, *M. bovis* es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos con la consecuente generación de péptidos y otros antígenos.³⁷ Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados por los macrófagos a linfocitos T CD8+, o bien, acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4+, mientras que los antígenos de naturaleza glicolipídica (fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1- fofoisoprenoides), son acoplados con moléculas CD1 y presentados a los linfocitos CD8+ y dobles negativos (CD4-CD8-). El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas.³⁸ El control inmunológico de la infección con *M. bovis* está basado en una respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como: IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-8. La respuesta no protectora en TBB se caracteriza por la producción de citocinas como: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β que antagonizan la respuesta inmune celular y, como consecuencia, no hay control de la infección y se desarrolla la enfermedad. Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participa en el control de esta enfermedad.³⁹

Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) contribuyen a la resistencia y los linfocitos T cooperadores (CD4+/CD45RO+) contribuyen a evitar la diseminación; puesta en marcha la respuesta celular y la producción de citocinas específicas, dan paso a la formación de granulomas (Figura 1); el centro del granuloma en formación está constituido de células epitelioides y gigantes, tipo Langhans, ambas derivadas de macrófagos, seguido de una zona de linfocitos, células plasmáticas y monocitos. Con la progresión de la lesión, se desarrolla una zona formada por fibroblastos, que rodean a la lesión mediante la síntesis de colágeno y una región de necrosis caseosa central con

mineralización. Este proceso es generalmente un medio eficaz para contener la propagación de las bacterias; dentro de las citocinas que participan en este proceso se destacan el interferón gamma (IFN- γ), la IL-6, IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).^{40, 41}

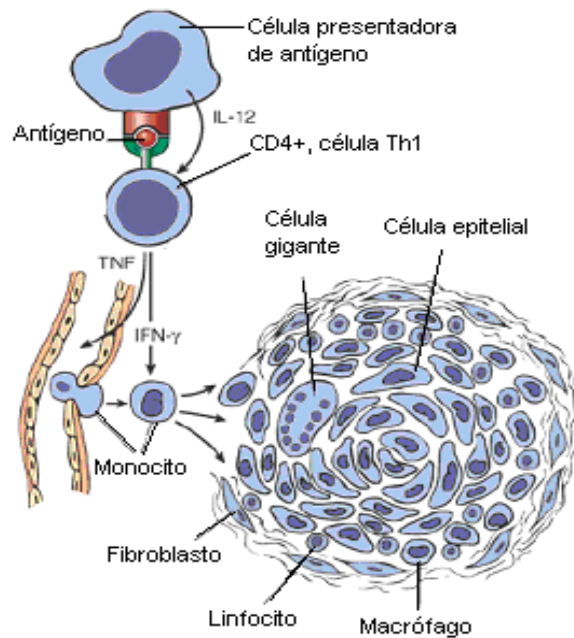


Figura 1. Células involucradas en la formación del granuloma, interacciones celulares y citocinas que participan en la inmunidad adaptativa en presencia de antígenos micobacterianos.³⁰

1.5. Métodos de diagnóstico para tuberculosis bovina

No existe un método diagnóstico estándar de oro, para el análisis de la infección de la TBB, como infecciones de tuberculosis latente, como un estado asintomático, sin evidencias clínicas de la enfermedad activa, pero en ocasiones con presencia de *M. bovis* viables a partir de biopsias de tejidos de animales vivos o en su caso de muestras de secreciones como leche o moco. Sin embargo, el desarrollo de métodos inmunodiagnósticos nuevos, tales como los ensayos de liberación de interferón-gamma (IFN- γ), ha mejorado nuestra comprensión sobre todo en la TBB. Aunque bien documentado, se ha demostrado que una proporción importante (tal vez hasta un 50%) de los contactos cercanos de individuos confirmados bacteriológicamente, incluso en

muchos (aunque no todos) la ratificación de alta carga, no tienen inmunodiagnóstico positivo de la prueba cutánea a la tuberculina evidencia de LTB. Esta falta de respuesta inmune (hipersensibilidad tardía), puede ser explicada por varios criterios, existen ejemplo donde personas trabajan en las salas hospitalarias de tuberculosos, y la cual no presentan la respuesta inmune adaptativa, tratando de explicar la ausencia de la prueba cutánea al PPD bovino y conjuntamente la negatividad al IFN- γ , por un lado es que la inmunidad innata tiene la capacidad de proteger sin presencia de la inmunidad adaptativa y por otro lado es que las pruebas les falta o carecen de sensibilidad para detectar la infección.

1.5.1. Prueba de intradermorreacción (ID).

La prueba de ID ha sido aceptada universalmente y se utiliza como método de diagnóstico en programas de control y erradicación de la tuberculosis en el humano y en los animales desde hace casi un siglo; entra en el grupo de las pruebas que se realizan *in vivo*. Robert Koch fue el primer científico que describió la reacción de tuberculina, como un ensayo para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis en humanos en el año 1891.⁴²

La prueba de ID ano caudal simple consiste en la inyección intradérmica de 0.1 ml (3 250 unidades internacionales (UI)) del derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis* cepa AN5. Después de 72 horas, se mide el grosor de la piel para la determinación de cualquier inflamación en el sitio de la inyección.⁴³

La prueba intradérmica doble comparativa (IDD), se realiza con PPD bovino y PPD aviar, esta se utiliza para diferenciar los animales infectados con *M. bovis* de los animales sensibilizados a micobacterias ambientales (no tuberculosas); mide la hipersensibilidad retardada de tipo IV con una sensibilidad entre el 70-95 % y una especificidad del 90%.^{40, 41}

La elección la doble comparativa se hace efectiva cuando la prevalencia de la enfermedad es alta ya que es más sensible que la prueba ano caudal y permite reducir las reacciones falsas positivas debido a los niveles de exposición a micobacterias ambientales.^{44, 45}

La principal desventaja es que el número de animales infectados con *M. bovis* no diagnosticados por esta prueba oscila entre un 10 y 20 %, esto constituye un problema, ya que estos animales infectados no detectados por esta prueba, pudiera ser debido a fases iniciales de la enfermedad (primeros 10 días), etapas terminal de la infección o en su caso por anergia generalizada asociada a la falla de células T específicas, ocasionando principalmente que permanezcan como fuente de contaminación y pueden ser la causa de un incremento en el número de reactores en regiones donde ya se había controlado la enfermedad a través del tiempo, otros de los inconvenientes son las reacciones cruzadas con micobacterias ambientales y con menos frecuencia el error humano.⁴⁶

1.5.2. Prueba de detección de interferón-gamma (IFN- γ)

El ensayo se basa en la liberación de IFN- γ por linfocitos T previamente sensibilizados y estimulados durante 24 horas con antígenos micobacterianos (PPD bovino y aviar) (Ver figura 2). La cuantificación del IFN- γ se realiza por un sistema de prueba de ELISA tipo "sandwich", que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el IFN- γ bovino. La prueba presenta una sensibilidad del 88 al 97%, mientras que su especificidad es del 90 al 96%.^{47, 48}

Esta prueba se utiliza con mayor frecuencia para fines de investigación que para el diagnóstico. Los resultados han demostrado que la prueba detecta ganado infectado que no había sido detectado por la prueba intradérmica (ID) doble comparativa en el caso de vacas anérgicas por lo que el uso de esta conjuntamente con la prueba de campo brindan una sensibilidad de un 94%, aunque por otro lado pueden ser impropios ya que esta es muy costosa y requieren de laboratorios con equipos apropiados así como personal capacitado.⁴⁹

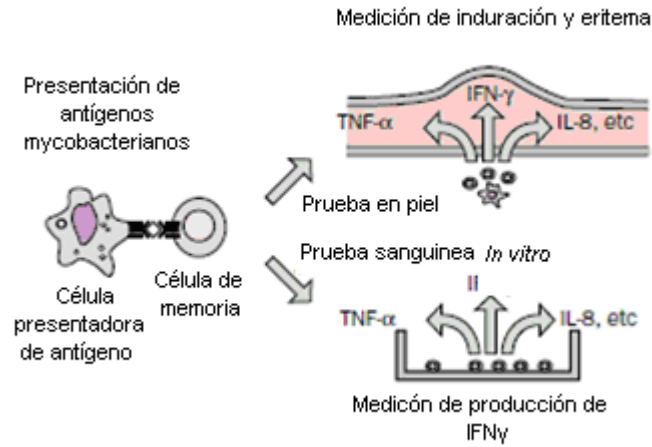


Figura 2. Liberación de IFN- γ por linfocitos T estimulados en piel e *in vitro*.⁵⁰

Una de las alternativas en la prueba del IFN- γ , para el diagnóstico más sensible y específico ha sido la utilización del antígeno ESAT-6, la cual es una proteína de bajo peso molecular que se encuentra en la porción RD1 del genoma de las micobacterias del complejo tuberculosis; RD1 contiene genes estructurales para 9 proteínas, dentro de las que se incluyen ESAT-6 y CFP-10, consideradas como altamente inmunogénicas.⁵¹ Ha tomado gran auge tanto en trabajos de investigación como en programas de erradicación ya que logra diferenciar ganado infectado con micobacterias patógenas del ganado sensibilizado con micobacterias ambientales y ganado vacunado con BCG (figura 3).⁵²⁻⁵⁴

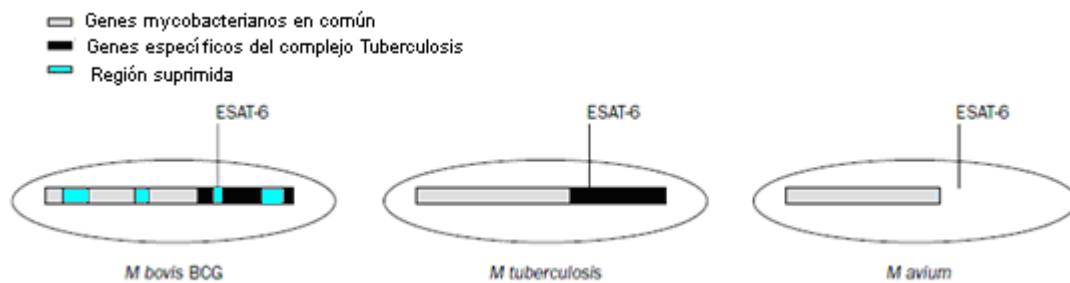


Figura 3. Ejemplificación de los genomas de micobacterias patógenas, ambientales y BCG.⁵⁰

1.5.3. Prueba de inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA)

La ELISA por sus siglas en inglés (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción que se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.), y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima, este puede ser medido espectrofotométricamente; se utiliza como prueba complementaria para el diagnóstico de la TB. El ensayo evalúa la inmunidad humoral, tiene una sensibilidad de 47.5 % y especificidad de 94.4%.^{55, 56}

El empleo de los sistemas de ELISA en la investigación serológica de anticuerpos contra *M. bovis* ofrece ventajas por ejemplo, detectando las etapas avanzadas de la enfermedad y estado de anergia, así como la automatización y la objetividad de los resultados; la desventaja de esta prueba es que no detecta las primeras fases de la enfermedad.⁵⁷

1.5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que ha demostrado su utilidad en la identificación de micobacterias ya sea del complejo *M. tuberculosis* o micobacterias ambientales en diferentes tipos de tejido, en bovinos a partir de muestras de exudado nasal, sangre y leche.⁵⁸

Esta técnica permite la amplificación de secuencias específicas de ADN que se encuentran acotadas por oligonucleótidos denominados iniciadores. Un fragmento del gen que codifica la proteína de secreción MPB70, sirven para identificar micobacterias del complejo *M. tuberculosis* incluyendo la cepa de *M. bovis*.⁵⁹

Debido a los problemas asociados al aislamiento de esta micobacteria, se ha considerado que para confirmar el diagnóstico de TB, este se realice mediante la técnica de PCR. Esta técnica para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad a diferencia de otras secuencias de inserción (IS), en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos.⁶⁰

Sin embargo, es necesario instrumentar esta técnica en muestras de tejido, analizando

su sensibilidad y especificidad bajo distintas situaciones epidemiológicas y de esta manera poder obtener resultados en pocas horas, en comparación con el cultivo que requiere mayor tiempo (3 meses) .⁶¹

1.5.5. Aislamiento, análisis bacteriológico e histopatológico

El diagnóstico de la infección exige el cultivo de *M. bovis* y por ello cualquier método de diagnóstico debe ser contrastado con la técnica de bacteriología.

Para el aislamiento primario de *M. bovis* son necesarias entre 3 y 5 semanas, aunque en algunos casos puede llegar hasta 4 meses. El cultivo convencional lleva asociado 3 pasos básicos; suspensión, concentración y la descontaminación de las muestras con ácidos, álcalis y detergentes con el fin de eliminar otras bacterias y hongos que podrían impedir el crecimiento de la micobacteria.⁶²

Los análisis bacteriológicos e histopatológicos se realizan para complementar y/o confirmar el diagnóstico de la TBB a partir de muestras de órganos que presenten lesiones compatibles con tuberculosis o secreciones sugestivas:

- a) Nódulos linfáticos. Se toman muestras preferentemente de los nódulos de la cabeza, pre escapulares, mediastínicos anteriores y posteriores y bronquiales derecho e izquierdo. En el caso de tuberculosis miliar tomar muestras de nódulos mesentéricos.
- b) Pulmones. La lesión tuberculosa puede ser caseosa o calcificada o una cavidad franca. De este órgano se tomarán muestras de 2 cm por lado de las lesiones presentes.
- c) Útero en caso de metritis.

Las técnicas para el análisis bacteriológico son:

- a) Examen directo: Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante.
- b) Examen indirecto: Cultivo, aislamiento e identificación del *M. bovis*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con o sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragani, ATS y Lowenstein Jensen (L-J).

Para diagnóstico histopatológico se utiliza la tinción de hematoxilina-eosina; esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y nueva fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso.⁶³

1.6. Medidas de bioseguridad en explotaciones lecheras

La Bioseguridad son las medidas que tenemos que seguir para erradicar los riesgos biológicos, como higiene, desinfección, calendarios de vacunación, desparasitación, control de plagas, equipo, arcos sanitarios o vados sanitarios. etc., considerando otros factores como instalaciones adecuadas, medicina de producción, manejo, genética, medio ambiente, nutrición, epidemiología, etología, bienestar animal, etc. Asimismo, la aplicación de medidas necesarias para el diagnóstico, la terapéutica, la prevención y así tener una empresa altamente redituable que produce alimentos inocuos. Las medidas deben ser prácticas y fáciles de aplicar con metas medibles a corto, mediano y largo plazo, que se realicen rutinariamente. Es necesario romper los esquemas tradicionalistas, utilizar métodos y técnicas actualizadas demostradas científicamente, evaluar el costo beneficio y el impacto, etc.⁶⁴

Una de las plagas que más afectan al control biológico de la TBB en granjas lecheras son los roedores; debido a que los ratones de campo eliminan *M. bovis* en las heces. Otro problema sanitario es la falta de información sobre otras especies que actúan como transmisores como son los caninos. Si los perros son alimentados con leche cruda contaminada, vísceras, placenta, mortinatos o cadáveres de animales infectados, pueden presentar tuberculosis extrapulmonar, dando como resultado que el perro excreta el bacilo a través de las heces. Colateralmente se ha demostrado que los perros que cohabitan con personas enfermas o animales enfermos pueden albergar el agente etiológico en su faringe, sin presentar lesiones tuberculosas.⁶⁵

En el municipio de Tizayuca perteneciente al estado de Hidalgo, se localiza el complejo agroindustrial de Tizayuca (CAIT) que cuenta con 126 establos con aproximadamente 25 mil cabezas de ganado, en su mayoría Holstein-Friesian,

especializado en la producción de leche. En un estudio reciente en el área de CAIT indica que existe una prevalencia del 9.35% de tuberculosis bovina y 50/78 perros (64.1%) son alimentados regularmente con leche sin hervir. Estas vacas están en contacto directo con los caninos de las personas que laboran en el mismo establo, lo que indica que se establece una relación bovino-canino-humano que representa una fuente directa para el contagio de la TBB.^{66, 67}

1.6.1. Segregación

En bovinos la principal vía de transmisión es por inhalación de aerosoles, motivo por el cual es necesario la construcción de becerrerías, nuevos establos y salas de ordeña o en su caso adecuar las instalaciones existentes con simples separaciones o divisiones de las construcciones o habilitar otras no utilizadas que permitan separar o segregar el ganado positivo del negativo; es imposible dar una recomendación única, pues de acuerdo a cada realidad existente en un predio serán diversas las alternativas de solución que se puedan encontrar.⁶⁸ Por lo tanto las medidas preventivas que deberán ser consideradas en general son:

- a) Aislamiento y rápida remoción de animales viejos.
- b) Aislamiento de animales jóvenes positivos.
- c) Protección de terneras, vaquillas y novillos de la exposición a animales viejos y/o reactores.
- d) Estudiar manejo separado de vacas jóvenes y negativas de aquellas viejas y reaccionantes, mientras transcurre el plazo para la eliminación.
- e) Eliminación de toros infectados que pueden ser muy eficientes en la diseminación de la enfermedad.
- f) Al efectuar la separación de los hatos se debe considerar la dirección de los vientos predominantes *versus* la distancia de los hatos, pues este hecho puede ser un factor importante de contagio, ya que debemos tener en cuenta que una de las principales vías de infección de la TBB es la aerógena (viento), transportando principalmente las gotas de *Flugge*, las cuales son gotitas expulsadas por la tos en los animales infectados por *M. bovis* y que pueden diseminar la enfermedad.

- g) Ordeñar primero vacas negativas y después las positivas con posterior lavado de los comederos de la sala de ordeña.
- h) No dar calostro ni leche de vacas positivas o de vacas viejas negativas a terneros salvo que este pasteurizada. En predios de alta prevalencia, ante el mayor riesgo de vacas anérgicas, es recomendable el uso de sustituto lácteo.
- i) Realizar un diagnóstico frecuente, cada 6 meses, a la masa negativa. Lo que sería un indicador de la efectividad de las medidas de bioseguridad junto con las medidas de control.
- .j) Llevar a cabo una vigilancia activa en mataderos, siendo este es un factor fundamental. Es muy probable que dentro de un hato positivo existan una o más vacas enfermas anérgicas. Normalmente, aunque no siempre, son las vacas más viejas las mejores diseminadoras de la infección. Es por esto que se transforma en un imperativo, cuando haya eliminación natural en el predio, enviar vacas negativas a matadero; en esta circunstancia, el médico veterinario asesor debe efectuar el seguimiento de este animal contactándose con el veterinario inspector del matadero para realizar un análisis exhaustivo de la canal y, ante la presencia de cualquier sospecha de lesión tuberculosa, debe confirmarse con exámenes de laboratorio (histopatología, cultivo y PCR).
- k) Todos los efluentes de la lechería deben ir por conductos cerrados a cámaras. En ningún caso deben ser vaciados a potrero.⁶⁸⁻⁷¹

1.6.2. Agentes Químicos

Un aspecto relevante de las micobacterias es su alta resistencia respecto a otras bacterias no formadoras de esporas, a los ácidos, álcalis y a determinados desinfectantes químicos. Además son muy resistentes a la desecación o congelación, lo que les permite sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, tanto en superficies de objetos inanimados como en el suelo o el estiércol. Sin embargo, deben permanecer al abrigo de la luz del sol ya que los rayos ultravioletas son letales para las mismas. La higiene y la desinfección pueden reducir la propagación del agente dentro de la explotación, *M. bovis* es relativamente resistente a los desinfectantes y requiere un tiempo de contacto prolongado para inactivarse; puede sobrevivir varios meses en el medio ambiente, particularmente en lugares fríos, oscuros y húmedos. Entre 12 y 24 °C,

el tiempo de supervivencia varía de 18 a 332 días, dependiendo de la exposición a la luz solar. Los desinfectantes eficaces incluyen soluciones de fenol al 5%, yodadas con una elevada concentración de yodo disponible, glutaraldehído y formaldehído. En ambientes con concentraciones bajas de materia orgánica, también resulta eficaz el hipoclorito de sodio al 1% con un tiempo de contacto prolongado. *M. bovis* también es susceptible al calor húmedo de 121 °C durante un mínimo de 15 minutos.⁷²

1.6.3. Manejo del calostro

La transferencia preparto de inmunoglobulinas desde la circulación materna hacia las secreciones mamarias, conocida como calostrogénesis, es una etapa diferenciada y de duración limitada, en los rumiantes domésticos, la transferencia comienza varias semanas antes del parto y cesa en forma abrupta inmediatamente antes del parto. Durante este breve periodo, hasta 500g/ semana de Ig G son transferidos a las secreciones mamarias. Como la Ig G representa más del 85% de las inmunoglobulinas totales presentes en el calostro, se considera que esta elevada concentración de IgG es el sello distintivo de la formación del calostro. Si bien el calostro es una fuente importante de nutrición y de inmunidad pasiva en los terneros, también posee potentes propiedades inmunomoduladores que pueden impedir el desarrollo de una respuesta inmunitaria activa ante ciertos antígenos.⁷³⁻⁷⁵

La mayoría de los trabajos se han encaminado en la detección de *M. bovis* en muestras de leche, y poca atención se le ha prestado al calostro, el cual juega un papel importante e indispensable dentro de la crianza de los becerros. La presencia de ADN de *M. bovis* en muestras de calostro tanto de vacas rectoras y negativas a la prueba de tuberculina, es de suma importancia dentro de la transmisión de la TB. El manejo del calostro y de leche juega un rol importante en la transmisión horizontal de *Mycobacterium* spp., ya que el riesgo de infección de los becerros con bacterias de este género, se asocia con la reactividad de la madre a la prueba de tuberculina y al manejo del calostro y leche.⁷⁶

1.7. Vacuna BCG de *M. bovis* empleada contra TBB

La vacuna BCG (Bacilo de Calmette Guerin) confiere protección antes de la exposición a la infección y previene, sobre todo en el lactante y en niños menores hasta el 80% del desarrollo de formas graves de la enfermedad como la tuberculosis meníngea y la miliar en el caso de los humanos, en el caso de los bovinos se ha observado que la vacunación con BCG a muy temprana edad disminuye los grados de lesiones patológicas al momento de revisión en rastro, por lo que puede ser una importante estrategia para disminuir la carga bacteriana y de esta manera disminuir el riesgo de infección tanto de bovino a bovino como de bovino a humano.⁷⁷

Actualmente se están desarrollando y evaluando en ganado diferentes tipos de vacunas, basadas en microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos, vacunas subunitarias compuestas por proteínas o glicoproteínas purificadas, proteínas recombinantes de ciertos antígenos de TB sobre expresados en la cepa BCG, mutantes atenuadas de *M. tuberculosis* y vacunas de ADN.^{78- 83}

Un gran número de razones pueden explicar la eficacia variable de la BCG en ganado; por ejemplo, las diversas cepas de BCG utilizadas, la variabilidad en los métodos de preparación de la vacuna, las dosis y rutas de inoculación además de las variaciones genéticas del ganado. Se ha divulgado que las castas de *Bos indicus* (cebúes) exhibieron un grado más alto de protección después de la vacunación con BCG que razas de ganado *Bos taurus*, sugiriendo que el fondo genético del hospedero podría influenciar el resultado de la vacunación.⁸⁴

Estudios en seres humanos y becerros neonatales sugieren que una vacunación temprana con BCG (antes de una exposición alta a micobacterias ambientales) puede inducir significativamente una mayor inmunidad protectora.⁸⁵

Una de las especulaciones por las cuales no se ha podido establecer la vacunación con BCG como mecanismo preventivo para el control de la TBB, es la sensibilización de los animales a la prueba de la intradermorreacción, tales que los animales vacunados pueden responder positivamente a la prueba. Sin embargo está demostrado experimentalmente que en periodos de entre 6 y hasta 9 meses se pierde esta

reactividad.⁸⁶ Por otro lado este obstáculo se puede superar con un diagnóstico utilizando el ensayo de IFN- γ que identifica antígenos como el ESAT-6 de los cuales sus genes se han suprimido en el genoma de BCG.⁸⁷

La vacuna BCG *Phipps* ha sido evaluada en modelos de ratón conjuntamente con otras cepas de BCG, en estos estudios se observó que los ratones inmunizados con la cepa *Phipps* desarrollaron áreas de neumonía menos extensas que los animales vacunados con las otras cepas y su carga bacteriana fue menor, indicando el establecimiento de resistencia a la enfermedad. Además se observó que la reacción a la intradermorreacción fue relativamente baja, en comparación con las otras cepas de BCG y el grupo control.⁸⁸

De varios candidatos para vacunas propuestas, las vacunas con proteínas fusionadas subunitarias han recibido importante atención en la literatura recientemente, especialmente con las proteínas antigénicas como ESAT-6, Ag85B y TB10.4 que son altamente inmunógenas.⁸⁹⁻⁹⁴ Al parecer, la fusión de múltiples epítopes en una vacuna subunitaria las hace más efectivas que las vacunas simples cuando interactúan con la compleja respuesta inmune en contra de la TBB. Actualmente, se encuentra en estudios en fase I de expansión, que está siendo probada diferentes grupos de estudio: 1.- En individuos vacunados con BCG, 2.- En individuos infectados y en estado de latencia y 3.- En individuos que habitan en regiones endémicas.⁹⁵

Sin embargo, no existe un candidato ideal vaccínico que puede inducir la inmunidad al 100% contra la TB. No obstante, un progreso significativo se ha hecho durante los últimos 10 años.⁹⁶

2. HIPOTESIS

La respuesta inmune de vacas en producción rectoras y no rectoras a la prueba de tuberculina será diferente después de la vacunación con BCG a los 6 meses, medida con las pruebas de diagnóstico de rutina para la TBB.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Comparar el efecto de la vacunación con BCG sobre la respuesta inmune de vacas rectoras y no rectoras a la prueba de tuberculina.

3.2. Objetivos particulares.

- Determinar la prevalencia de tuberculosis en un hato lechero vacunado con BCG antes y después de la aplicación de la vacuna, de acuerdo a la prueba de tuberculina cervical doble comparativa (IDD).
- Definir si la vacuna BCG influye en las pruebas diagnósticas rutinarias para la tuberculosis bovina en un hato con alta prevalencia de la enfermedad.
- Determinar si las pruebas diagnósticas permiten diferenciar animales vacunados de infectados con *M. bovis*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales de estudio

Para el presente estudio se utilizaron 326 bovinos adultos de la raza Holstein-Friesian en producción de diferentes edades, el hato lechero se encuentra localizado en la cuenca ganadera del estado de Hidalgo.

4.2. Diseño experimental

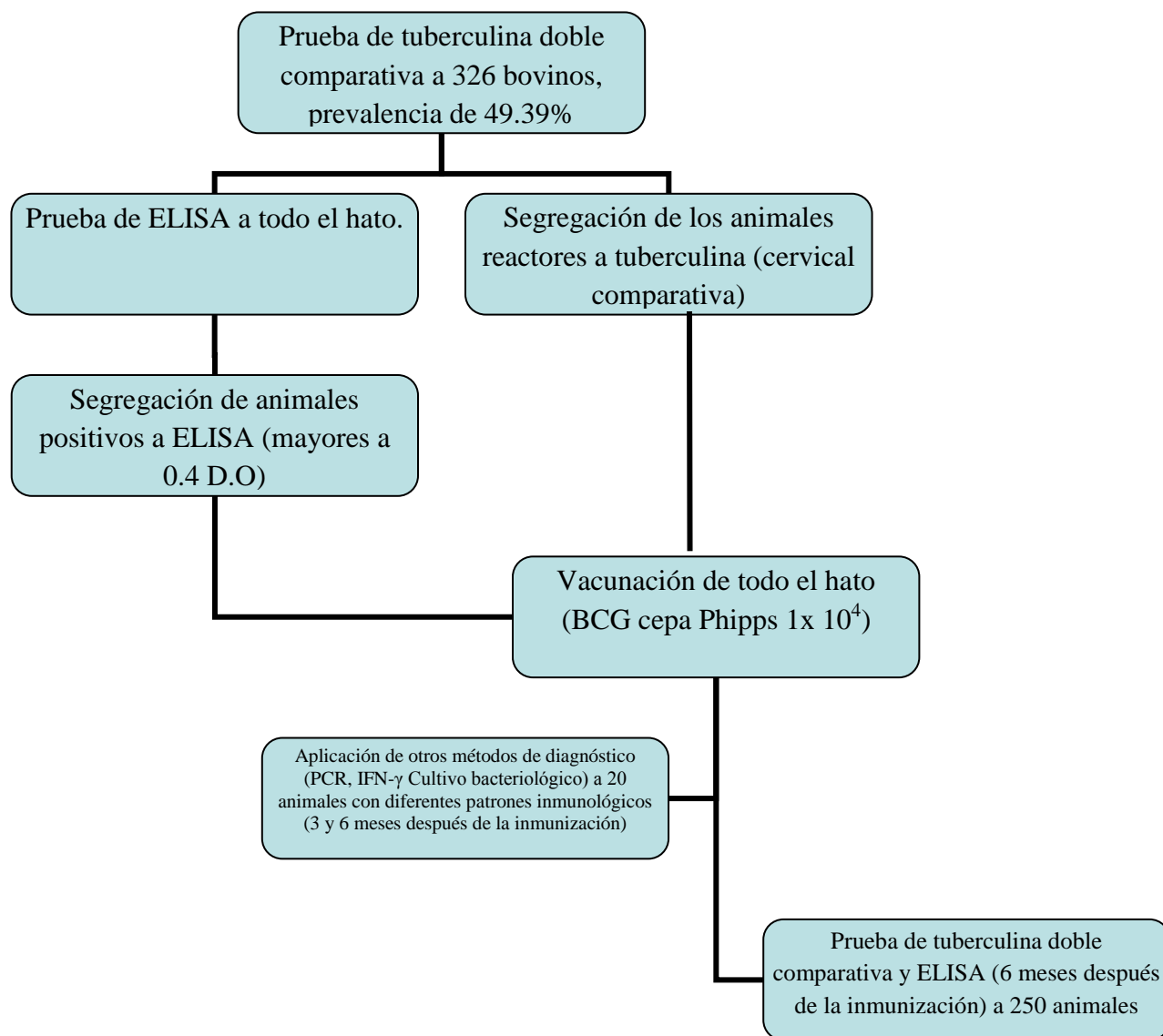


Figura 4.- Diagrama de flujo donde se muestra los procedimientos establecidos dentro de la explotación lechera donde se realizó el estudio.

La vacunación de toda la explotación una única vez se consideró como la primera instancia de control, y posteriormente las nuevas crías se vacunaron en los primeros días de nacimiento (menores a 30 días).

4.3. Establecimiento de medidas de bioseguridad en el hato lechero

Conjuntamente con el programa de vacunación se estableció las medidas de bioseguridad con la finalidad de controlar más eficientemente la enfermedad:

- 1.- Se identificaron madres infectadas de TBB (tuberculina (+) y ELISA (+); tuberculina (-) y ELISA (+), antes del parto y segregación en la medida de lo posible.
- 2.- Se estableció que los becerros de madres infectadas fueran separados de manera inmediata.
- 3.- El uso de calostros provenientes de madres negativas a la tuberculosis y/o empleo de sustitutos de leche para la alimentación de los becerros. Si esta en posibilidad del productor, pasteurizar el calostro.
- 4.- Se estableció la segregación de los animales en dos grupos, animales libres de TB, tuberculina (-) y ELISA (-) y animales reactivos tuberculina (+) y ELISA (+), tuberculina (-) y ELISA (+).
- 5.- Se consideraron el empleo de tapetes sanitarios a la entrada del establo y entre los animales infectados y no infectados a la TBB (hipoclorito de sodio al 1%, fenol al 5%)⁽¹⁴⁾.
- 6.- Se consideró que los animales reactivos se ordeñen al final de cada proceso.
- 7.- Todo animal que ingresó al hato debió ser negativo a la prueba de tuberculina doble comparativa y ELISA.

* No fueron aplicadas en su totalidad por cuestiones ajenas al proyecto.

4.4. Elaboración de la BCG

Los animales se vacunaron con BCG (1×10^4 UFC) cepa *Phipps* de manera subcutánea. Para la elaboración de la vacuna BCG cepa *Phipps*, consistió básicamente en tres etapas, reactivación de la bacteria, realización de un lote semilla^Ω y realización de un lote primario; en la primera etapa, se preparó medio sólido MIDDLE BROOK 7H10 enriquecido con OADC (ácido oleico, dextrosa y catalasa), se colocaron en estufa de CO² a 37° C por 3 días para la prueba de esterilidad.

^Ω Donada por la Dra. Clara Espitia del Instituto de Biomédicas, UNAM.

Para la preparación de lote semilla se colocó en una caja con medio sólido MIDDLE BROOK se sembró 50 µl del cultivo almacenado a -70°C; se dejó incubando por 15 días a 37° C hasta que hubo un crecimiento homogéneo en la caja y libre de contaminación. Una vez crecida la bacteria se procedió a pasarla a un medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC, en agitación constante, se incubaron a 37 °C/ 200 rpm y se monitoreo el crecimiento cada 24 h a una longitud de onda de 600 nm hasta tener 0.8 de DO y se congeló a -70°C.

Para la elaboración del lote primario se tomó una alícuota del lote semilla para sembrarse en medio sólido MIDDLE BROOK 7H10 con OADC, se dejó crecer de 15 a 20 días hasta que se observó crecimiento. Se tomó una asada grande para sembrarla en 200/ml de medio líquido (7H9) enriquecido con ADC incubando a 37 °C, en agitación constante (200/rpm) hasta tener una D.O. de 0.35 a 0.45.

Se midió la curva de crecimiento, para ello se preparó 200/ml de medio líquido, sembrando el lote primario en una concentración de 7%, se incubó a 37°C en agitación de 200/rpm. Se midió la D.O. a 600/nm diariamente por 15 días.

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

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

4.5. Prueba de tuberculina doble comparativa (IDD)

A todos los animales se les aplicó la prueba de tuberculina doble comparativa, en la tabla del cuello del lado izquierdo, específicamente en su tercio medio, de manera simultánea en dos lugares separados de 12 cm. Se les inyectó 0.1ml (3250 UI) de PPD bovino (PPD-B) cepa AN5 y 0.1 (3250 UI) ml PPD aviar (PPD-A) cepa D4 para detectar infección con *M. bovis* o micobacterias del complejo, rasurando los sitios de inoculación y midiendo el grosor de la piel con un vernier previo a la inoculación. Después de 72 horas posinoculación, se procedió a la lectura del grosor de la piel con el mismo implemento, con forme lo marca la NOM-031-1995.

El resultado positivo a la tuberculina se especificó cuando la reacción al PPD bovino fue mayor de 4 mm que la reacción al PPD aviar. Se consideró un animal sospechoso cuando la reacción del PPD bovino es de 3-4 mm con respecto al PPD aviar. Se consideró un resultado negativo cuando la reacción del PPD bovino fue negativo o, aun siendo positiva la reacción fue igual o menor que la reacción provocada por el PPD aviar.

Lo anterior se realizó al día 0 y al mes 6 del estudio, de acuerdo a la norma oficial mexicana.¹

4.6. ELISA doble comparativa.

Para la realización de esta prueba, se utilizó suero 326 animales, se evaluaron los niveles de anticuerpos hacia antígenos micobacterianos empleando extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis* cepa AN5y el CFPE de *M. avium* D4; se manejaron placas de 96 pozos las cuales fueron sensibilizadas con los antígenos mencionados, de cada antígeno diluido en solución de pegado (solución de carbonatos pH 9.6), dejando incubar toda la noche, posteriormente se decantó y se lavó 3 veces con solución de lavado (solución de fosfatos 0.01M pH 7.4 con NaCl y 0.1 % de Tween 20), se adicionó 100 µl de solución bloqueadora (1.5% de leche descremada en PBS y Tween 20 al 0.1 %), incubando por una hora en estufa de CO₂ al 5%, posteriormente se lavó 5 veces, se añadió 100 µl por pozo de cada suero diluido 1:100 en solución de fosfatos incubando por una hora, se descarto la solución y se lavo 5 veces con solución de lavado enseguida se agregaron a cada pozo 100 µl de proteína G

conjugada con peroxidasa diluida a 1: 10 000 en solución de fosfatos, se incubó por 1 hora, se descartó la solución y se lavó 5 veces con solución de lavado, posteriormente se agregó 100 µl de solución de revelado (10ml/placa de solución de citratos pH 4.5, 4 mg de orto-fenildiamina y 4 µl H₂O₂). Se paró la reacción a los 5 minutos añadiendo 50 µl de solución de paro (H₂SO₄ 2M), las placas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA.⁴ Para la obtención del punto de corte (0.4 D.O) se obtuvo del promedio de las densidades ópticas de todos los animales antes de la vacunación más dos desviaciones estándar y los animales que resultaron arriba del punto de valor de corte, se consideraron positivos.

4.7. Aplicación de otras pruebas diagnósticas a 20 vacas en producción con diferentes patrones inmunológicos.

Se analizaron 20 animales y fueron divididos en 4 grupos de 5 cada uno, con diferentes patrones inmunológicos a las pruebas de tuberculina doble comparativa y ELISA: grupo 1, vacas en producción con prueba de tuberculina (+) y ELISA (+), el grupo 2, vacas en producción con prueba de tuberculina (+) y ELISA (-), el grupo 3, vacas con prueba de tuberculina (-) ELISA (+) y el grupo 4, vacas con prueba de tuberculina (-) y ELISA (-).

4.8. Prueba para detección de IFN-γ.

La prueba se realizó empleando un kit comercial (BOVIGAMTM Bovine Gamma Interferón Test), que se basa en la estimulación *in vitro* de los linfocitos aislados a partir de la sangre heparinizada, la estimulación fue hecha con el antígeno ESAT-6 y se dejó un pozo sin estimular como control negativo, los linfocitos T circulantes presentes en la muestra secretan IFN-γ y fue medido mediante una prueba de ELISA de captura, posteriormente las densidades ópticas se determinaron a 450 nm en un lector de ELISA.⁴⁸

4.9. Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizaron muestras de exudado nasal de los 20 animales, cumpliendo con los patrones inmunológicos antes descritos. Para la extracción del ADN se tomó 1 ml de sedimento de exudado nasal y se transfirió a un tubo de microcentrífuga (1.9 ml) y se centrifugó 12,000 rpm por 5 min, de donde posteriormente se decantó el sobrenadante. Después de la centrifugación, el botón fue homogenizado con 400 µl de TE (100mM tris-HCL, pH 8.0, 10 mM EDTA) y 50 µl de lisosima (100 mg/ml, Sigma No. de Cat. L6876), para romper la pared celular e incubado por 1 hora a 37 °C. Posteriormente se añadieron 70 µl de SDS al 10%, seguido por 5 µl de una solución de proteinasa K (100 mg Invitrogen No. de Cat. 25530-015) para inactivar las proteínas, agitando en el vórtex e incubado a 65 °C por 20 min. Después de la incubación, a cada muestra se le agregaron 100 µl de NaCl (5 M), seguido por 100 µl de una solución de 5M NaCl con 5% Ncetyl- N, N, N, -bromuro de trimetil amonio precalentado a 65°C, así, la mezcla se incubó a 65 °C por 10 min.

La extracción de ADN se hizo adicionando 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico, se agitó en un vórtex y se centrifugó a 12 000 rpm por 5 minutos, se transfirió la fase 1 de tres fases que se forman a un tubo de 1.5ml sin tomar la fase intermedia, se adicionó 0.6 volúmenes (360 µl de alcohol isopropílico absoluto) para precipitar los ácidos nucleicos, se dejó la muestra a -20°C por 30 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 20 µl enzima del botón de ADN, se adicionó 1 ml de etanol al 70% en frío, se centrifugó a 12 000/rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante, dejando 2 µl aproximadamente enzima del botón, después la muestra se centrifugó a 12 000/rpm por 1 minuto y se decantó, se dejó los tubos abiertos para secar el ADN a temperatura ambiente, por último se adicionó 20 µl de TE 1x y se almacenó a 4°C.

Posteriormente el ADN genómico, purificado y homogenizado, se observó por electroforesis en un gel de agar a 1% teñido con bromuro de etidio y corrido a 90 volts durante 50 min. Los geles fueron observados en un lector de gel.

Una vez que se aseguró que el ADN no estuviera degradado, se corrió una PCR simple para hacer el diagnóstico de TB por medio de la amplificación de un segmento de 372 pb del gen MPB70 de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (TB1F 5' GAA

CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' y TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3'); El protocolo de amplificación fue: 35 ciclos a 96° C por 15 min., 94 °C por 30 seg., 58 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Posteriormente se usó 5 µl del producto para amplificar un fragmento de 208 pb dentro de la región del fragmento de 372 pb del gen MPB70 por medio de un PCR anidado con los oligonucleótidos diseñados para este estudio (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' y M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'); 25 ciclos de 96°C por 12 min 94 °C por 30 segundos , 71°C por 30 segundos, 72 °C por 10 minutos.⁹⁷

4.10. Aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica.

Las muestras de moco nasal se descontaminaron con Zefirán al 0.3% durante 3 min se centrifugaron a 300 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y el sedimento se sembró por duplicado en medio de Stonebrink.

Las colonias sospechosas se identificaron por pruebas bioquímicas de producción de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis de Tween 80, crecimiento en isoniazida (INH) y pirazinamida y sensibilidad a la hidrazida del ácido tiofén 2 carboxílico (TCH). Los cultivos se consideraron negativos si no se observaron colonias de *M. bovis* después de tres meses.

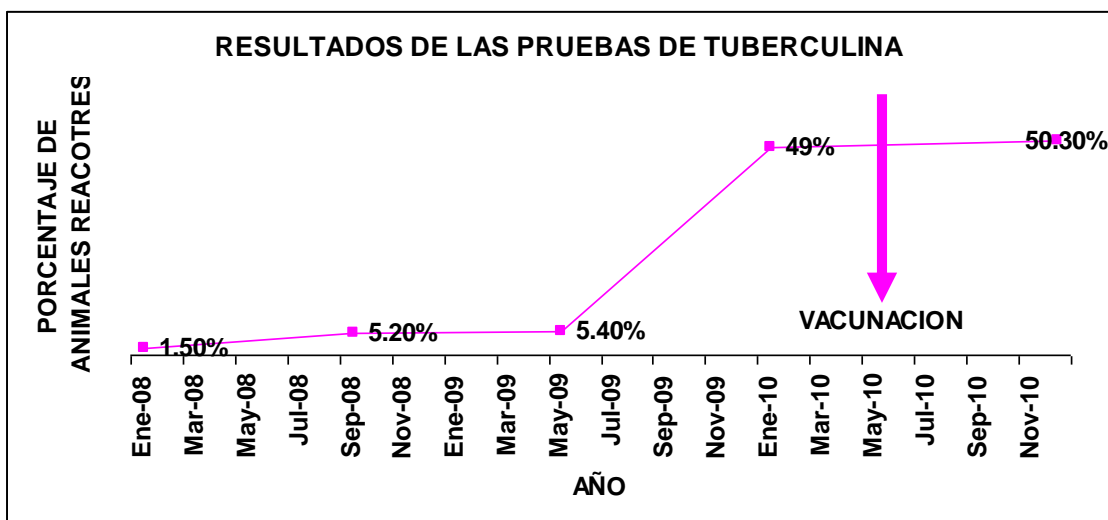
4.11. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se hizo mediante la prueba pareada de t de Student con el programa Statistical Analysis System, para determinar la existencia de diferencias significativas antes y después de la vacunación para la prueba de ELISA, y para la prueba de tuberculina con la prueba de χ^2 . El valor de ($p < 0.05$) fue considerando como significativo. Para los resultados de PCR e IFN γ se realizó la prueba exacta de Fischer con las mismas condiciones.⁹⁸

5. RESULTADOS

5.1. Prueba intradermorreacción (ID)

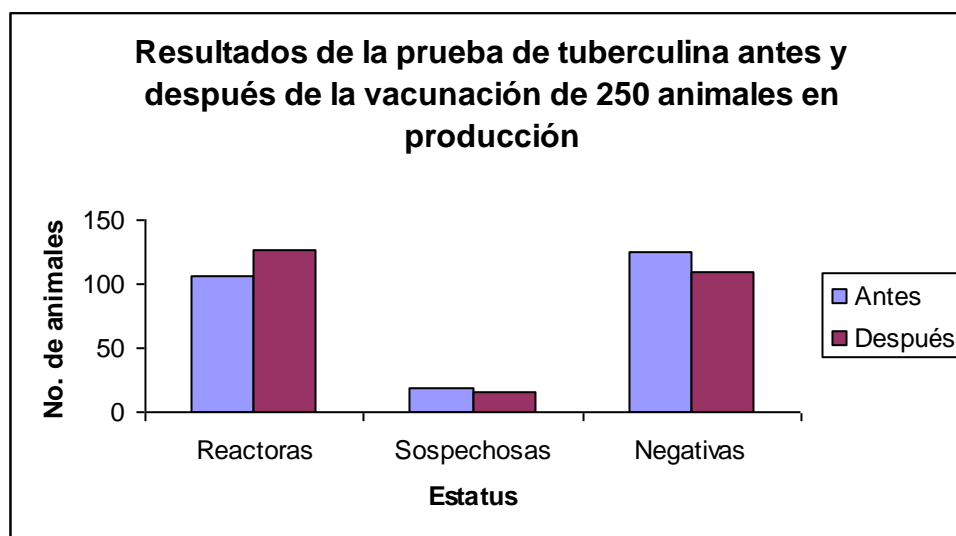
La explotación fue evaluada mediante las pruebas diagnósticas de intradermorreacción simple caudal y doble cervical comparativa (IDD) durante tres años atrás conforme a la NOM-031-ZOO-95, en la gráfica 1 se muestra la panorámica de las prevalencias entre los años 2008-2010. El porcentaje de animales reactivos en el 2008 que era de entre 1.5% al inicio del año y 5.2% al final del mismo año, en el 2009 obtenían un porcentaje de 5.4% y en enero del 2010 el porcentaje se incrementó hasta 49.39%. Motivo por el cual, fue considerado necesario la implementación de medidas urgentes en el control para TBB.



Gráfica 1. Pruebas de ID realizadas en el establo 181 del centro agropecuario Tizayuca, Hidalgo, durante los años 2008, 2009 y 2010.

Debido a que el estudio se realizó bajo condiciones de campo, únicamente se consideraron 250 animales ya que solo estos se tenían sus registros completos de los 350 animales iniciales, antes y después de la vacunación, los resultados se muestran en la grafica 2, donde al realizar la prueba estadística de χ^2 entre los diferentes estatus positivas (reactoras), negativas (no reactivas) y sospechosas, se obtuvo que la vacunación no influye significativamente en la prueba de ID, ($P > 0.05$). Ya que como

se muestra en la gráfica 2, mostró un leve incremento de animales reactivos, mientras que dentro de los animales sospechosos fue muy similar, sin embargo el incremento que se observa en animales reactivos disminuyó en animales negativos, todos sin diferencias significativas.



Gráfica 2. Resultados de la prueba de tuberculina antes y después de la vacunación de 250 animales en producción.

En el cuadro 1, se muestran los resultados del grupo de los bovinos negativos antes y después de la vacunación, donde un 87.2% de los animales siguen mostrando negatividad a la prueba, mientras que un 12.8 % (16/125) reaccionaron a la tuberculina. Cabe mencionar que el promedio de edad de estos reactivos se encontraba entre 3-4 años.

Estatus	Antes de la vacunación		Después de la vacunación	
	Núm. anim.	%	Núm. anim.	%
Negativas	125	100	109	87.2
Positivas	0	0	16	12.8
Sospechosas	0	0	0	0
Total	125	100	125	100

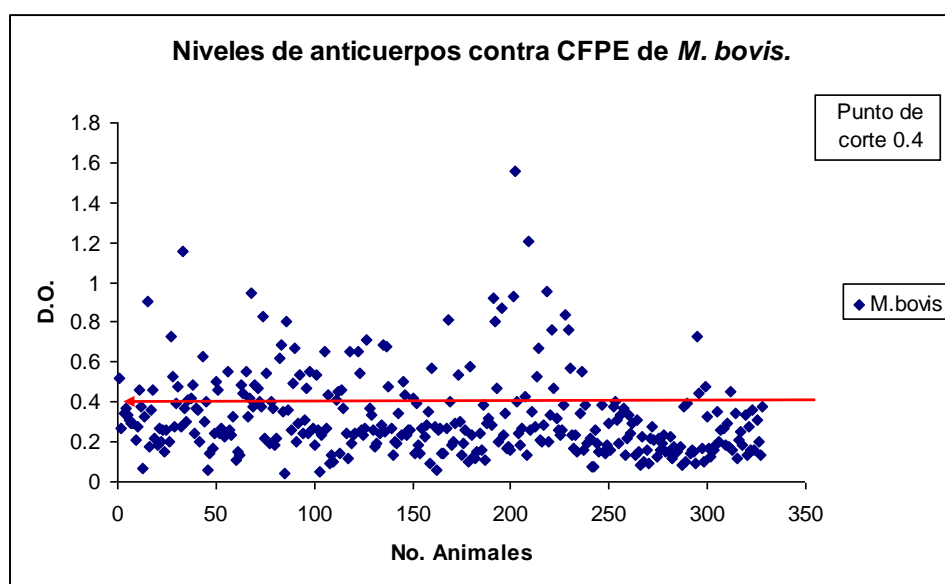
Cuadro 1. Resultados de la prueba de ID después de la vacunación de animales que tenían un estatus de negatividad antes de la inmunización.

5.2. Prueba de ELISA

Los animales que fueron evaluados con la prueba de intradermorreacción doble comparativa (326 animales) se analizaron, para la prueba de ELISA (250 animales).

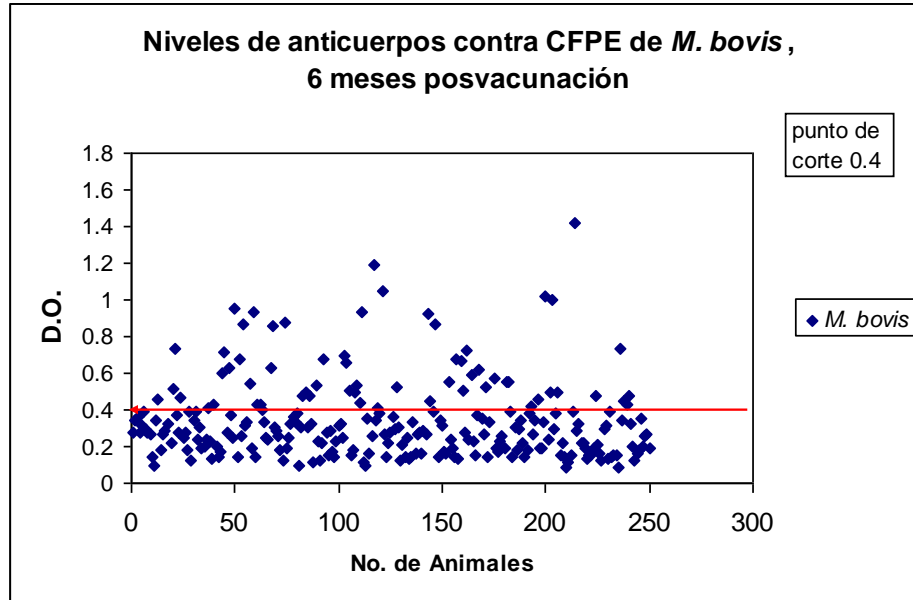
El objetivo de esta prueba, fue determinar la respuesta humoral hacia *M. bovis* y *M. avium*, y así poder identificar animales anérgicos, que no fueron detectados con la prueba de intradermorreacción. De esta manera, se realizó la segregación de estos animales anérgicos que pudieran estar liberando la micobacteria.

En la gráfica 3, se muestran los resultados de la prueba de ELISA, cuando la prevalencia era del 49.39%.



Gráfica 3. Niveles de anticuerpos hacia el CFPE de *M. bovis* obtenidos mediante la prueba de ELISA de 326 animales realizada al inicio del estudio.

Seis meses después de la vacunación, se realizó un nuevo muestreo del ganado, para determinar sus niveles de anticuerpos por medio de la prueba de ELISA, los resultados se muestran en la **gráfica 4**, donde se obtuvo mediante la prueba pareada de T de Student una $P= 0.0422$, indicándonos que hay una diferencia estadística significativa entre los animales positivos y negativos antes y después de la vacunación. En cuanto a los positivos antes de la vacunación se tenía un 23.36% y 6 meses después de la vacunación un 24.3%.



Gráfica 4. Resultados de la prueba de ELISA después de vacunación con BCG (Phipps) tomando como punto de corte > 0.4 D.O. como positivas y < 0.4 D.O. como negativas.

5.3. Resultados de otros métodos de diagnóstico en 20 animales con diferentes patrones inmunológicos (ELISA, ID, IFN γ , PCR y cultivo bacteriológico).

5.3.1. Resultados de ELISA.

Simultáneamente al estudio se analizaron 20 vacas que tuvieran los siguientes criterios antes de la vacunación y agrupándolas en 4 grupos de 5 animales cada uno; grupo 1. ELISA (-) ID (+), grupo 2. ELISA (+) ID (+), grupo 3. ELISA (+) ID (-), grupo 4. ELISA (-) ID (-), los resultados se muestran en el cuadro 2, donde se observa que en el grupo 1 y 4 presentaron valores por debajo del punto de corte (0.4 D.O) a la prueba de ELISA antes de la vacunación, presentando un aumento en las D.O. a los tres meses después de la vacunación y para el tercer muestreo que se realizó a los 6 meses se presenta una disminución en la cantidad de anticuerpos mostrando una D.O. similar a la inicial.

Para los grupos 2 y 3 donde la D.O., que presentaron antes de la vacunación sobrepasaban el punto de corte de 0.4 D.O., se consideraron a estos animales como positivos a la prueba de ELISA, en el segundo muestreo realizado a los 3 meses se observa una disminución de las D.O., encontrándose que al realizar el tercer muestreo a los 6 meses se observa que existe una disminución mayor en el grupo 2 comparativamente con el grupo 3, el cual manifiesta un aumento ligeramente en comparación con el muestreo realizado antes de la vacunación.

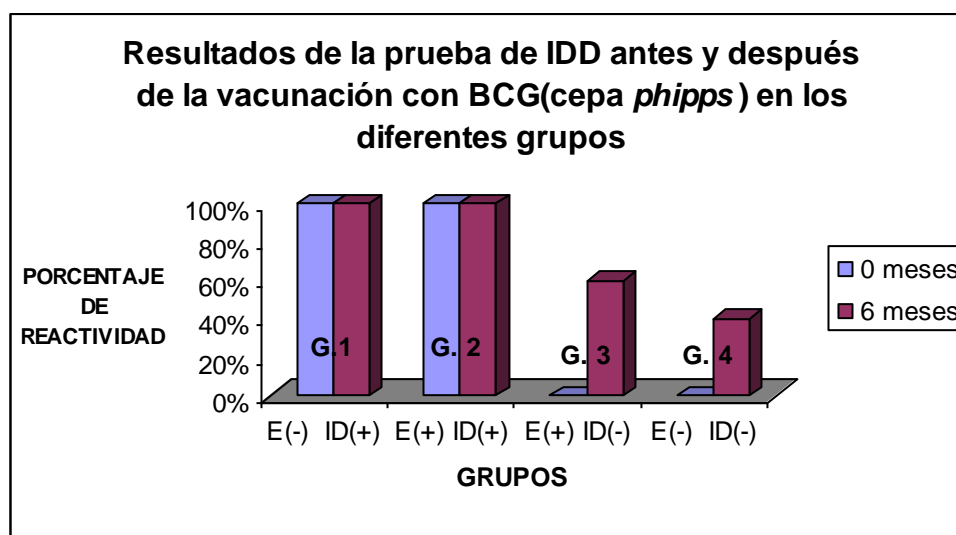
GRUPO	MESES		
	0	3	6
1	0.2619± 0.01	0.4349±0.1	0.2698±0.03
2	0.7424± 0.05*	0.5461±0.07	0.3505±0.06
3	0.6993±0.03	0.6177±0.13	0.7710±0.44
4	0.1954±0.02	0.3193±0.02*	0.1772±0.3

Cuadro 2. Resultados de la prueba de ELISA al antígeno CFPE de *M. bovis*, en los grupos con diferentes criterios (antes y después de la vacunación (3 y 6 meses).

* indica diferencia significativa con respecto a los meses de muestreo ($p>0.05$)

5.3.2. Resultados de ID.

De los mismos 20 animales de los cuales se agruparon según el criterio antes mencionado, se analizaron acorde a la prueba de ID, los resultados se muestran en la grafica 7, donde se observó que para el grupo 1 y 2 donde se observó reactividad antes y después de la vacunación, para los grupos 3 y 4 donde no había reactividad antes de la vacunación, después de la vacunación el grupo 3 manifestó un 60% de reactividad y el grupo 4 mostró un 40 %.



Grafica 7. Análisis de los diferentes grupos con la prueba de ID antes y después de la vacunación.

5.3.3. Resultados de PCR.

Para la evaluación de las muestras de exudado nasal de los 20 animales divididos en 4 grupos con los criterios antes mencionados, se realizó la prueba de PCR simple, donde no se encontró resultados positivos en los dos muestreos. Se realizó una PCR anidada a partir de los productos del PCR simple, donde los resultados se muestran en la gráfica 8, a los 3 meses después de la vacunación y al finalizar el estudio (6 meses). En el grupo 1, para el tercer mes ninguno de los integrantes del grupo (0/5) mostraron evidencia de ADN de la bacteria, en el sexto mes dos animales (2/4) fueron positivos; en el grupo 2 para el mes 3, todos los integrantes del grupo (0/5) mostraron negatividad a la prueba, para el mes 6, tres de los 5 animales (3/5) dieron positivo; en el grupo 3

solo un animal (1/5) fue positivo en el mes 3 y en el mes 6 el mismo animal fue positivo (1/5); y para el grupo 4 todos los animales (0/5) fueron negativos a la prueba al mes tres, y en el mes 6 se mostró la misma negatividad para todos los animas (0/5).

Grupo	Meses		
	3	6	P<0.05
1	0/5	2/4	0.1666
2	0/5	3/4	0.047*
3	1/5	1/5	0.777
4	0/5	0/5	--

Cuadro 3. Resultado de las prueba de PCR anidado para los cuatro grupos al mes 3 y 6 del estudio.

* Diferencia significativa (P<0.05)

5.3.4. Resultados de IFN γ al antígeno ESAT-6

Los resultados de las 20 vacas con diferentes patrones inmunológicos a la prueba de IFN- γ , específicamente al antígeno ESAT-6 se muestran en el cuadro 4, donde se puede observar que en los grupos 1 y 2 donde se muestra una reactividad a la tuberculina antes y después de la vacunación, se muestra evidencia de la presencia de la micobacteria patógena al dar positivos al antígeno ESAT-6, con excepción de un animal (437) , para el grupo 3 y 4 donde antes de la vacunación eran negativos a la prueba de ID, a los 6 meses los animales que muestran reactividad a la prueba de tuberculina registran positividad al antígeno ESAT-6, solo la vaca 635 que muestra reactividad a la prueba de tuberculina pero no muestra evidencia de tener contacto con una micobacteria patógena esto podría deberse a una reacción postvacunal.

Grupo	Meses		
	3	6	P<0.05
1	5/5	2/4	0.1666
2	4/5	4/4	0.555
3	3/5	4/5	0.50
4	1/5	1/5	0.777
Entre grupos	0.528	0.1680	

Cuadro 4. Resultados de la prueba de IFN γ al antígeno ESAT-6 de 20 animales.
*P < 0.05, diferencia significativa

5.4. Resultados de cultivo bacteriológico

Durante todo el periodo que se evaluaron los animales no hubo aislamientos positivos de *M. bovis* a partir de los exudados nasales obtenidos en los diferentes muestreos.

6. DISCUSIÓN.

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades más importantes en el ganado, ya que constituye un problema de difícil erradicación. La presencia de esta enfermedad representa un impedimento en el desarrollo de la ganadería, la rápida diseminación es debida a muchos factores ya sea de mal manejo, mala alimentación, ingreso de nuevos animales etc., además que constituye una amenaza para la salud de la población humana.⁹⁹

Para la prevención y control de la TBB, se aplican medidas como la identificación de animales infectados, eliminación y sacrificio, cuarentena de hatos y decomiso de órganos y canales. Durante muchos años se ha puesto en tela de juicio la efectividad de la vacuna BCG para reducir la TBB, y un problema que ha impedido su práctica es la interferencia de la vacunación con la prueba de tuberculina, lo cual condiciona la venta y exportación de animales y sus productos.

La mayoría de los trabajos en donde se evalúa la respuesta hacia la vacuna BCG, han tomado como modelos becerros jóvenes generalmente menores de 6 meses y en condiciones controladas con la mínima exposición a micobacterias ambientales.¹⁰⁰ En el presente estudio, se consideró evaluar animales adultos en producción, para observar el efecto de la inmunización con BCG (cepa *Phipps*), los resultados mostraron que no hubo una diferencia significativa en las pruebas de tuberculina doble comparativa aplicadas antes y después de la inmunización ($P > 0.05$); solo un 12.8 % (16/125) de los animales que fueron negativos a tuberculina antes de la inmunización, reaccionaron a la prueba a los 6 meses; el hecho de que no tenga una diferencia significativa es probablemente debido a que la reacción a la tuberculina por efecto de la BCG se va perdiendo de 6 a 9 meses, Coad y col.(2010), en diferentes estudios realizados consideraron que existe una variación en la respuesta debido a el tipo de ganado, la edad, la cepas vacúnales, la dosis empleada y las rutas de inoculación,¹⁰¹ Bubble considera que otros de los factores implicados que ha sido estudiado, es la alta exposición a micobacterias ambientales, las cuales podrían bloquear, enmascarar, o alterar la activación de la respuesta inmune por la vacuna; por otro lado reciente información expuesta por Hernández Pando y col. sugieren que dosis bajas de BCG puede estimular preferentemente la inmunidad celular a antígenos micobacterianos y tener un mínimo efecto por largo tiempo a la prueba de tuberculina, situación que es muy parecida a lo ocurrido en este trabajo dado que los animales vacunados a una dosis baja (1×10^4 UFC), no mostraron un incremento significativo a la prueba IDD después de la vacunación.^{102, 103}

La aplicación de métodos de diagnóstico complementarios a la tuberculina, es de suma importancia ya que nos permite identificar animales que sean una primordial fuente de infección y que no reaccionen al PPD, como en el caso de los animales anérgicos que se pueden detectar por medio de la prueba de ELISA. La vacunación con BCG induce principalmente una respuesta celular, por lo que la producción de anticuerpos en las diferentes etapas de la TBB es muy variable y generalmente niveles altos se detectan en etapas avanzadas de la enfermedad.¹⁰⁴ En este trabajo, se observaron diferencias significativas a los 6 meses después de la inmunización en los niveles de anticuerpos

hacia los CFPEs de *M. bovis*, con lo que correlaciona con lo reportado por Lyashchenko y col. 2004, donde evaluaron la respuesta inmune celular y humoral de animales vacunados con BCG cepa *Pasteur* 1×10^4 , donde realizaron la prueba de tuberculina a las 14 semanas después del desafío con *M. bovis* por vía intratraqueal, se encontró que a los 14 días después de la tuberculización, hay un aumento en las Ig G hacia las proteínas MPB70 y MPB83 en los animales no vacunados a diferencia de los vacunados aunque en estos últimos existe un aumento aunque no significativo, lo anterior debido a que las proteínas MPB70 (proteína de secreción) y la MPB83 (glicoproteína) también están presentes en el PPD, por este motivo se explica el aumento de los niveles de anticuerpos de Ig G totales en este trabajo después de la vacunación y de una tuberculinización.¹⁰⁵

Aunque lo anterior es el panorama general de una explotación con alta prevalencia de TBB, para poder evaluar vacas individualmente, se seleccionó 20 vacas divididas en cuatro grupos con sus diferentes patrones celulares tomando como referencias las pruebas de tuberculina y ELISA, en donde para la prueba de tuberculina aplicada al mes 6 después de la vacunación con BCG, se tiene que los animales que fueron tuberculina positivos (grupo 1 y 2, n=10) el 100% de estos animales volvieron a ser reactivos, esto debido a que ya existía evidencia de que estaban infectados confirmándolo a los 6 meses; y los que eran tuberculina negativos pero ELISA + muestran un 60 % (3/5) de reactividad, y el grupo 4 con el ELISA (-) muestra un 40 % (2/5), esto debido a que en el transcurso de los 6 meses estos animales estuvieron expuestos a la micobacterias, ya que se movía el ganado en los diferentes corrales sin previa desinfección, además que la distancia entre animales positivos y negativos era mínima, lo cual se confirma con las pruebas de IFN- γ , donde se muestran positivas al antígeno ESAT-6 en estos animales, lo cual concuerda con los estudios realizados por Buddle y col., 1999; Vordermeier y col., 1999, 2001;¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ en donde muestran la eficacia de este antígeno, así como el CFP-10 para diferenciar animales vacunados de infectados.¹⁰⁹

Se considera que la excreción de *M. bovis* a través de aerosoles y la inhalación de estos es la principal ruta de transmisión de la enfermedad, por lo tanto es importante vigilar la eliminación del microorganismo por esta ruta para entender la patogénesis, además de los problemas asociados al aislamiento de esta micobacteria, se ha considerado confirmar el diagnóstico de TBB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN en el genoma de bacterias del complejo *M. tuberculosis*.^{110,111}

Diferentes autores han estudiado el tiempo en que lo bovinos comienzan a eliminar el bacilo por aerosoles, los resultados mostraron que los animales desafiados comienzan a eliminar los bacilos entre los 80 y 100 días posinfección.¹¹⁰⁻¹¹² Ramírez y col. obtuvieron eliminaciones a los 60 días en modelos caprinos,¹¹³ aunque el patrón de excreción y su duración puede ser diferente en cada animal. En el presente estudio se observó que en los 4 grupos con la técnica de PCR simple no se observa resultados positivos en los dos muestreos, mientras que para la PCR anidada se observó que a los tres meses después de la vacunación solo existe un dato positivo en el grupo 3 (E(+) ID (-)), pero a los 6 meses se observó evidencia de ADN en un 40% de los animales (2/5) para el grupo 1, para el grupo 2 un 60% (3/5), para el grupo 3 un 20% (1/5), para el grupo 4 no se observó evidencia en los dos muestreos; lo anterior puede deberse a que la sensibilidad de la PCR realizada de ADN, obtenido a partir de muestras biológicas (exudado nasal), tiende a disminuir por factores como son inhibidores de la polimerasa o la presencia de ADN del detritus celular, aunado al hecho de que la eliminación del agente no es constante.¹¹⁴ Estudios realizados por Ramírez y col. han encontrado utilidad en otro tipo de PCR como es el PCR multiplex que puede diferenciar vacunados de infectados.¹¹⁵

Se sabe que el aislamiento bacteriológico de micobacterias es difícil y que un número reducido de bacterias viables influye en el resultado del diagnóstico, McIlroy y col. afirman que para obtener cultivos positivos de *M. bovis* a partir de moco nasal se requieren mínimo de 2-5 ml de muestra.¹¹¹ Es poco probable obtener esta cantidad a partir de muestras de moco nasal, obtenidos con hisopos por la escasa cantidad de

muestra que se recupera, es posible que en el presente trabajo el número de bacterias viables obtenidas con el hisopo no fuera suficiente para lograr el aislamiento bacteriológico ¹¹⁶, siendo esta última la principal causa de nuestros resultados.

La provisión de nueva información acerca de la respuesta inmune tanto hacia la enfermedad misma, como a la vacunación con BCG en ganado bovino beneficiará en el contexto de la toma de decisiones para el control y erradicación de la TBB; así como la estandarización de pruebas diagnósticas más sensibles.

7. CONCLUSIONES

Al determinar la prevalencia de TBB en un hato lechero y aplicar las pruebas de tuberculina y ELISA antes y después de la vacunación con BCG cepa *Phipps* se puede concluir lo siguiente:

- La vacunación con BCG (*Phipps*) en animales adultos en producción, **no afecta la prueba de tuberculina** ya que **no sensibilizó** a los animales hacia el PPD bovino a los 6 meses después de la inmunización.
- La vacunación con BCG (*Phipps*) en animales adultos en producción en conjunto con una tuberculización anterior, **afectó en la prueba de ELISA**, ya que indujo una respuesta humoral mediada por anticuerpos hacia *M. bovis* a los 6 meses después de la inmunización y 12 meses después de la tuberculización.
- El aislamiento de *M. bovis* mediante el cultivo bacteriológico de **moco nasal mostró no ser eficaz para el diagnóstico**, posiblemente debido a que la muestra no contiene la cantidad suficiente de micobacterias o que la eliminación de micobacterias es en forma intermitente y no constante.
- El PCR anidada resultó ser más eficaz que la PCR simple para detectar micobacterias.

8. ANEXO 1.

Solución de Pegado. Buffer de Carbonatos 0.06M pH 9.6

Bicarbonato de sodio (NAHCO ₃)	3.8 gr/l
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	1.93 gr/l
Agua destilada	1l

Solución de Fosfatos (PBS) 0.01MpH7.4 con NaCl y 0.1% de Tween 20

Fosfato disodico hidrogenado (Na ₂ HPO ₄)	1.1 gr/l
Fosfato sódico dihidrogenado (NaH ₂ PO ₄)	0.32 gr/l
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 gr/l
Tween 20	0.5 ml/l
Agua destilada	1l

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

Fosfato disodico hidrogenado (Na ₂ HPO ₄)	1.1 gr/l
Fosfato sódico dihidrogeando (NaH ₂ PO ₄)	0.32 gr/l
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 gr/l
Tween 20	0.5 ml/l
Leche descremada en polvo	1.5 gr/100ml
Agua destilada	1l

Solución de citratos pH 4.5

Acido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	4.6 gr/l
Citrato trisódico (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O)	7.4 gr/l
Ortofenildiamina	4μg/10ml
Peroxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)	4μ/10ml
Agua destilada	1l

9. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCG	Bacilo Calmette Guerin
°C	Grados centígrados
CAIT	Complejo agroindustrial de Tizayuca
CFP-10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 KDa
CFPE	Extracto proteico de filtrado de cultivo
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DO	Densidades opticas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Inmuno ensayo ligado a enzimas
ESAT-6	Antígeno de secreción temprana de 6kDa
ID	Intradermorreacción
IDD	Prueba de tuberculina doble comparativa
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IS	Secuencias de inserción
LAM	Lipoarabinomananos
μ l	Microlitros
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
ml	Mililitros
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MPB70	Proteína de secreción inmunogénica principal de <i>M. bovis</i>
NK	Células asesinas naturales
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa

PMN	Células polimorfonucleares
PPD-A	Derivado proteico purificado Aviar
PPD-B	Derivado proteico purificado Bovino
RD	Regiones de diferencia
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Acido ribonucleico ribosomal
TBB	Tuberculosis Bovina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95.
2. POLLOCK JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*.2002; 163(2):115-127.
3. Manual De la OIE. www.oie.com. Consultado el año 2012.
4. ESTRADA CC, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de TB en México. *Veterinaria México*. 2001; 32(3):208.
5. BUDDLE BM, Pollock JM, Skinnera MA, Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *International Journal for Parasitology*.2003; 33:558-559.
6. COLLINS JD. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology*. 2006; 112: 380.
7. VORDERMEIER HM, Chambers MA, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson RG. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 2006; 171: 229–244.
8. www.TuberculosisTextbook.com Palomino, Leao, Ritacco. Tuberculosis 2007.
9. WAGNER DY, LS. Nontuberculous mycobacterium infections: a clinical review. *Infection* 2004; 32:257-70.
10. WAYNE, L. G. y G. P. Kubica. 1986. Genus *Mycobacterium*. En: Bergey Manual of Systematic Bacteriology. (Volumen II). Sneath P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G: Holt (Eds). William y Wilkins. Baltimore, USA. Pp.1435-1457.
11. JAWETZ E., Melnick J., Adelberg E. MICROBIOLOGIA MÉDICA 16a ed. México D.F: Ed Manual Moderno.1999:343.
12. Pan-american Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, regional office of the World Health Organization, international Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the Americas; Saltillo, Coahuila, México. 1991; 18-20.

13. COTRINA, N.P. Epizootiología de la tuberculosis bovina. Científico Técnico. La Habana, Cuba.1999;10-11, 158-164.
14. DRAPEE P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res. Microbiol. 1981; 142: 420-422.
15. RASTOGI N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. Res. Microbiol. 1991; 142:462-476.
16. AUSINA RV. Tuberculosis. Ferrera Valenti, P. 13° edición. Mosby/Doyma libros, Madrid. 1995; 2367-2371.
17. THOEN CO and Steele JH. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ed. By Charles O. Thoen and James H. Steele. Iowa State University Press/Ames. Iowa 1995; 3-15.
18. FELTON MJ and Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. Infection and Immunity. 1996; 64:683-690.
19. MURRAY CJL, Styblo K, Rovillon A, Tuberculosis in developing countries burden, intervention and cost. Bull. Int. Union Tuber. Lung Dis. 1990. 65:6-24.
20. LEE RE, Brennan PJ, Besra GS. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Tuberculosis. Shinnick.Springer.1996.
21. BARNES P, Quoc Le H, Davidson P. Tuberculosis en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana. Clínicas Médicas de Norteamérica. Vol. 6. Tuberculosis.1993. Editorial Interamericana. pp. 1435-1454.
22. TORRES P. Actualización de Tuberculosis. SENASA. Buenos Aires. Argentina. 2000. Pp. 57-58.
23. NARDELL E. Control ambiental de la tuberculosis. Clínicas Médicas de Norteamérica. Vol. 6. Tuberculosis.1993. Editorial Interamericana. pp. 1381-1399.
24. SENASICA, SAGARPA; Dirección General de Salud Animal; Cuestionario FAO/OIE/OMS – 2002. México.
25. KREBS JR. Bovine tuberculosis in cattle and badgers. Ministry Agriculture, Fisheries and Food Publications, London, United Kingdom. 1997.

26. STEELE JH. Regional and country status reports. Part2. Introduction. In: Thoen CO, Steele JH, editors. *Mycobacterium bovis* infection in animals and human. Ames, IA: Iowa State University press; 1995. 169-172.
27. <http://www.zoonosis.unam.mx> consultado en el año 2012.
28. DUNGWORTH DL, Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. The respiratory system. Pathology of Domestic Animals. Vol. 2. Fourth Edition. Academic press. INC. 1993. Pp. 641-648.
29. REBHUND JC, Divers TJ, Peek SF. Diseases of dairy cattle. Segunda Edición. Saunders Elsevier. 2008. Pp. 612-614.
30. QUINN PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Science. Pp. 96-102
31. MERCHANT, I. y R. Packer. 1970. Bacteriología y Virología Veterinaria. Ed. Acribia España 3era. Ed. P. 453-461.
32. Trigo TF, Valero EG. Patología General Veterinaria. Cuarta Edición 2004. México, D.F. UNAM. Pp.312-317.
33. ROBBINS SL, R.S., pathologic basis of disease, 7/E. International Edition, Elsevier Inc. All rights reserved. 2005.
34. BLOOD, D.C.; O.M. Radostits. 1992. Medicina Veterinaria. 7ma Ed. España – Madrid. OPS. p. 764-776.
35. KORBEL DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. Microbes and infection. 2008.
36. ERNST JD. Macrophages receptor for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998; 66: 1277-1281.
37. ADEREM A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol 1999; 17: 593-623.
38. SCHLUGER NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. Respir Res. 2001; 2: 157-163.
39. FLYNN JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Rev Immunol 2001;19:93-129.
40. DAMENBERG AM, Tomashafski JF. Pathogenesis of pulmonary disease and disorders. New York. McGraw-Hill.1988.pp. 1821-1842.

41. DUNALP N, Criles D. Inmunología de la tuberculosis. Clinicas Médica de Norteamérica. Vol. 6. Tuberculosis. Editorial Interamericana.1993.pp.1305-1319.
42. MONTIEL M, Rivera S, Hernández R, Hassanhi , Vargas F, Nuñez J. Respuesta inmunitaria y anergia, estudio en pacientes tuberculosos del hospital universitario de Maracaibo, Venezuela. Acta Científica Venezolana 2002; 53:36-43.
43. GONZÁLEZ OR, Gutiérrez CB. Field evaluation of the single intraderma cervical tuberculin test and the interferon gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Vet Microbiol; 1999; 70:55-66.
44. MONAGHAN ML, Doherty ML. Collins et al. The tuberculin test. Vet. Microbiology. 1994; 40:111-124.
45. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004.
46. FIFS T, Corner LA, Rothel JS and Wood PR. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. Scand J. Immunol. 1994;39:267-274.
47. BLOOM BR. T cell-responses and cytokines in: Tuberculosis. Pathogenesis. Protection and control. Edited by Barry R. Bloom. ASM PRESS. Washington D.C. 1994. Cap. 25: 419.
48. WOOD PR., Jones SL. BOVIGAMTM: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis. 2001; 81(1/2): 147-55.
49. MUSCOPLAT CC, Johnson DW, Theon CO, Ayivor MD, Klausner DJ. Development of a whole blood stimulation assay for detecting hypersensitivity to PPD in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Veterinary Microbiology. 1977; 2:261-265.
50. ANDERSEN P, M E Munk, J M Pollock, T M Doherty .Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. THE LANCET, September 23, 2000. Vol.356.
51. SAMBANDAMURTHY V K and Jacobs W R. Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis. Microbes and Infection 2005; 7:955-61.

52. RITACCO V, de Kantor L, Barrera L, Errico F. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 1991; 50:365-367.
53. BUDDLE BM, Parlane NA, Keen DL, et al. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M bovis*-infected cattle by recombinant mycobacterial antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 1-5.
54. POLLOCK JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 1997; 175: 1251-54.
55. COSTELLO E, O'Rielly PF., Yearsley DK., Collins JD, Monaghan ML, Basset HF. A study of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Irish Veterinary Journal.* 1997; 50:35-8.
56. SILVA E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 2001; 78:111-17.
57. YOON Y.D., Kim J.M., Park J.M., Lee M.W., Choi C.S. Studies on the *in vitro* leukocyte migration inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Rep. Rural Develop. Admin. Vet.* 1990; 32: 1-22.
58. MORALES LA, Peñuelas UK, Álvarez OG, Martínez VI, Maldonado J, Mendoza DG y Milián SF. Correlation between PCR and Tuberculin Test for Detection of *Mycobacterium*. *Revista Científica, FCV-LUZ* 2008;1:17 - 21,
59. ROMERO TA, Arriaga DC, Guevara VJ, García SJA, Torres LRA, Estrada CC. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidad en un hato lechero, *Vet. Méx.* 2006; 37:137-143.
60. DZIADEK J, Sajduda A, Borun TM. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Tuberc Lung Dis* 2001;5:569-574.
61. LIEBANA E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, et al. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clinical Microbiology.* 1995; 33:33-36.

62. PAYEUR JB, Jarnagin JL, Marquardt JG Schaper LA, Martin BM. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of micobacteria. National Veterinary Service Laboratories. USDA.1993.
63. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/031zoo.pdf> año consultado 2011.
64. CONTRERAS, J.A. Medidas de bioseguridad. Enfermedades causadas por bacterias, Tuberculosis, Enfermedades de los Bovinos. 2da Ed. Editorial Bogue. Barquisimeto. 2000. pp. 560-584.
65. ACHA, P.N. y Szyfres, B. Tuberculosis zoonótica. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington. Organización Panamericana de la Salud. 2003; 266-283.
66. Memorias del VII Congreso Internacional de Epidemiología San Andrés Cholula, Puebla, 2011.
67. KANTOR, I.N.; RITACCO, V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: currents status, control and the eradication programs. Veterinary Microbiology. 1994; 40: 5-14.
68. D.A. ABERNETHY , G.O. Denny , F.D. Menzies , P. McGuckian , N. Honhold , A.R. Roberts, The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*, Veterinary Microbiology 2006; 112: 231–237.
69. TWEDDLE NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zeland. Veterinary Microbiology. 1994: 40; 23-39.
70. The Center for Food Security & Public Health, Iowa State University, Institute for international cooperation in animal Biologics and OIE collaborating center, Actualization de Tuberculosis Bovina 2009. pp. 1-7
71. JOHN D. Collins, Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future, Veterinary Microbiology.2006; 112: 369–381.
72. The Center for Food Security & Public Health, Iowa State University, Institute for international cooperation in animal Biologics and OIE, Actualization de Tuberculosis Bovina 2010.

73. BRANDON MR, Watson DL, Lascelles AK. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp.Biol.Med.Sci* 1971; 49: 613.
74. BUTLER JE. Immunoglobulins of the mammary secretions. *Lactation: A comprehensive treatise, Vol. III.* New York, Academic Press. 1974. p. 217.
75. BANKS KL McGuire TC. Neonatal Immunology. In Halliwell REW, Gorman NT (eds): *Veterinary Clinical Immunology.* Philadelphia, 1989; pp. 193-204.
76. RENTERÍA ET, Hernández AJ. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium spp.* Exposure associated with management of colostrums and milk. *Prev. Vet. Med.* 1996; 27: 23-27
77. STOVER CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennet LT et al. New use of BCG recombinant vaccine. *Nature* 1991; 351: 456-458.
78. HORWITZ MA, Heath G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDA major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a Highly susceptible animal model. *Proc Natl Sci US.* 2000; 97: 13853-13858.
79. ROBERTS AD Sonnenberg MG, Orway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT et al. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol* 1995; 85:502-508.
80. WEDLOCK DN, Skinner MA, Parlane NA, Vordermeier HM, Hewinson RG, De Lisle GW et al. Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83: 339-349.
81. COCKLE PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomic. *Infect immune* 2002; 70:6996-7003.
82. LOGAN KE, Chambers MA, Hewinson RG, Hogarth PJ. Frequency of IFN-producing cells correlates with adjuvant enhancement of bacille Calmette-

- Guérin induced protection against *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* 2005; 23:5526-5532.
83. HOPE JC, Villarreal RB. Bovine TB and the development of new vaccines. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2007; 31:77-100.
84. MATTIOLI, R.C., Bah M., Kora S., Cassama M. y Clifford D.J. Susceptibility to different tick genera in Gambian N'Dama and Gobra zebu cattle exposed to naturally occurring tick infection. *Tropical Animal Health and Production*. 1995;27(2): 995-1005
85. BUDDLE BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Leslie GW. Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine*. 2002; 20:1126-1133.
86. WHELAN AO, Coad M, Unadhyah BL, Clifford Dj, Hewinson RG, Vordermeier HM. Lack of correlation between BCG induced tuberculin skin test sensitization and protective immunity in cattle. *Vaccine*. 2011; 29:5453-5458.
87. VORDERMEIER HM, Chambers AM, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson BM. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis cattle. *J. Vet Sci*. 2002; 171:229-244.
88. CASTILLO RAI, Castañon AM, Hernández PR, Calva JJ, Sada DS, López VY. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Level of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity*. 2006; 74:1718-1724.
89. BRANDT L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 2000; 68(2):791-795.
90. AAGAARD C, Dietrich J, Doherty M, Andersen P. TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunology and Cell Biology*. 2009; 87(4):279-286.
91. HOFT DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *The Lancet*. 2008; 372(9633):164-175.

92. DIETRICH J, Aagaard C, Leah R, et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *Journal of Immunology*. 2005; 174(10):6332-6339.
93. MUSTAFA AS, Skeiky YA, Al-Attayah R, Alderson MR, Hewinson RG, Vordermeier HM. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle. *Infection and Immunity*. 2006; 74(8):4566-4572.
94. SORENSEN AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 1995; 63(5):1710-1717.
95. AAGAARD C, Dietrich J, Doherty M, Andersen P. TB vaccines: current status and future perspectives. *Immunology and Cell Biology*. 2009; 87(4):279-286.
96. FRANCO PC, Roupheal N, del Rio C, Santos-PJ I. Vaccination strategies to prevent tuberculosis in the new millennium: from BCG to new vaccine candidates. *International Journal of Infectious Diseases*. 2006; 10:93-102.
97. MORALES LA, Peñuelas UK, Álvarez OG, Martínez VI, Maldonado J, Mendoza DG, Milián SF. Correlación entre PCR en exudado nasal y la reacción de tuberculina para la detección de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos. *Rev. Sci*, 2008; 1:17-21.
98. WAYNEW D, Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 2008 ed. Limusa México.
99. THOEN CP, LouBue & I. De Rantor. The important of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis, *Veterinary Microbiology*. 2006; 112:339-345.
100. LÓPEZ ML, Díaz OF, Vallecillo MA, Esquivel SH, Gutiérrez PJA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: de estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista latinoamericana de microbiología*. 2006;(2):173-178.
101. COAD M, Clifford D, Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitization in naturally

infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary Research*.2010; 41(2):14.

102. BUDDLE BM. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*.2001; 81:125-132.
103. HERNANDEZ-PANDO, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina, and G. Rook.. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infection and Immunity*. 1997; 65:3317-3327.
104. GARIBAY EA. Defectos en la expresión de las proteínas de membrana que predisponen a una alta susceptibilidad a la tuberculosis. *Rev Edu Bioq*. 2005; 24:54 -58.
105. LYASHCHENKO K, Whelan A.O, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, Vordermeier HM. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and Infected with *M. bovis* *Infection and Immunity*.2004;72: 2462-2467.
106. BUDDLE, B.M., Parlane, N.A., Keen, D.L., Aldwell, F.E., Pollock, J.M., Light- body, K., Andersen, P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1999; 6:1-5.
107. VORDERMEIER, H.M., Cockle, P.C., Whelan, A., Rhodes, S., Palmer, N., Bakker, D., Hewinson, R.G. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1999; 6:675-682.
108. VORDERMEIER, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmer, N., Hewin- son, R.G. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 2001; 8:571-578.

109. VORDERMEIER H.M. Gordon SV, Hewinson RG. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Veterinary Microbiology*. 2011; 151:8-13.
110. Mc CORRY T, Mc Nair J, Skuce RA, Pollock J, Nelly S. Investigation into nasal shedding *Mycobacterium bovis* from calves infected experimentally with bovine tuberculosis. Fifth international conference on the pathogenesis of micobacterial infection. 2002. p 119.
111. Mc LLROY SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet. Rec.* 1986; 718-721.
112. NEILL SD, O'Brien JJ, McCracken RM. *Mycobacterium bovis* in the previous respiratory tracts in the heads of tuberculin reacting-cattle. *Vet. Rec.* 1988; 122:184-186.
113. RAMIREZ CIC, Santillan FMA, Arellano RB, Morales AF, Tenorio GVR. Detección de secuencias nucleotídicas de *Mycobacterium bovis* a partir de ADN de moco nasal de caprinos inoculados experimentalmente. *Vet. Mex.* 2006; 191-196.
114. SUFFYS P, Vonderborght P, Pinto-Correa P. Inhibition of the chain reaction samples from tuberculosis patients alters processing using a Silicaguandinumthiocynate DNA isolation procedure. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 2001. Nov. 15-18, Rio de Janeiro, Brasil. *Fundacion Oswaldo Cruz*. Pp. 1137-1139.
115. RAMÍREZ CIC. Santillan FMA, Arriaga DC, Arellano RB, Morales AF. Empleo de una PCR multiplex para diferenciar caprinos vacunados con *M. bovis* BCG de infectados con *M. bovis* de campo. *Tec. Pec. Mex.* 2004; 42(3):419-428.
116. LANTOS A, Niemann S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* incaptive siberian tiger. *Emerg. Infect. Dis.* 2003.9:1462-1464.

