



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**“DETECCIÓN DE ANIMALES ANÉRGICOS EN TRES EXPLOTACIONES
LECHERAS CON DIFERENTES PREVALENCIAS DE TUBERCULOSIS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :

ANGEL JIMÉNEZ GARCÍA DE LEÓN

ASESOR:

DR. FERNANDO DÍAZ OTERO

COASESOR:

MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ



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.

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme gozar de vida, salud y poder alcanzar una de mis más anheladas metas. Gracias.

A mis padres, Angel y Carmen, y a mi hermana Perla, por su amor, por estar conmigo, por todas sus enseñanzas y consejos, por su apoyo incondicional hasta en los momentos más difíciles, les dedico este trabajo con todo mi amor.

A mi Abuela, por sus consejos, sus palabras de aliento y por su apoyo durante todos mis estudios.

A todos mis amigos y esas personas que me han acompañado a lo largo de todo este camino. Mencionar a unos, sería olvidar a otros.

A la UNAM, en especial a la Preparatoria 6 y a la FES Cuautitlán por la oportunidad de realizar mis estudios, por las maravillosas experiencias a lo largo de todo este tiempo y por permitirme formar parte de esta gran institución.

Al Dr. Fernando Díaz Otero por darme la oportunidad y depositar su confianza en mí para la realización de este trabajo y permitirme colaborar con él en este proyecto; por su valiosa amistad, por compartir conmigo su conocimiento, su gran enseñanza e influencia en mi formación profesional, académica y personal.

El trabajo desarrollado a continuación se realizó en el laboratorio de Inmunología del CENID – Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias como parte de las investigaciones del proyecto “Evaluación de la inmunidad protectora contra la tuberculosis bovina empleando BCG y extracto proteico de filtrado de cultivo”. Este proyecto fue financiado con recursos del proyecto D 43244 – Z de CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

- Dr. Fernando Díaz Otero, M. en C. Laura Jaramillo Meza, MVZ Rafael Pérez González y M. en C. Dante González Salazar, por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo, por su gran amistad, sus atenciones, consejos y apoyo, y por esas gratas vivencias a lo largo de este tiempo.
- Dra. Camila Arriaga Díaz, por su confianza y apoyo.
- Dr. Dionisio Córdova por su gran apoyo para la realización del método estadístico de este trabajo.
- A mis amigos y compañeros del CENID – Microbiología (Martita, Cecy, Marco, F. Diosdado, etc....) por la grata convivencia y colaboración durante este tiempo.
- A los responsables y encargados de cada hato por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.
- A mis sinodales por su disposición, tiempo y dedicación para este trabajo

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Características de las Micobacterias	4
1.2 Métodos de diagnóstico para Tuberculosis Bovina	6
1.2.1 Prueba de Intrademorreacción (ID)	6
1.2.2 Prueba de Interferón gamma (IFN- γ)	7
1.2.3 Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	8
1.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	9
1.2.5 Aislamiento e Identificación	9
1.3 Patogenia y respuesta inmune en la Tuberculosis Bovina	10
1.4 Mecanismos de anergia en la Tuberculosis Bovina	14
1.5 Características de las lectinas	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. OBJETIVOS PARTICULARES	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Animales de estudio	22
5.2 Obtención del extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i>	22
5.3 Prueba intradérmica doble comparativa	23
5.4 Prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	23
5.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y condiciones de cultivo	24
5.6 Conteo de leucocitos	25
5.7 Estimulación <i>in vitro</i> de linfocitos	25
5.8 Prueba de interferón- γ (IFN- γ)	25
5.9 Análisis Estadístico	26
6. RESULTADOS	28
6.1 Resultados a la prueba de intrademorreacción	28
6.2 Resultados a la prueba de ELISA	29
6.3 Resultados a la prueba de IFN- γ	31
7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSIONES	40
9. ANEXO 1 REACTIVOS	41
10. ABREVIATURAS	42
11. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de vacas anérgicas en hatos con diferente prevalencia de TB, empleando pruebas serológicas y evaluando la inmunidad celular bajo condiciones *in vitro*. Se seleccionaron 3 hatos donde inicialmente fueron evaluados por medio de la prueba de tuberculina para conocer su prevalencia, obteniendo así, al primer hato de 0.72% (277 animales), 14.85% (100 animales) y 34.16% (322 animales); se obtuvieron sueros de todos los animales en producción de dichos hatos y estos fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos contra componentes de extracto proteico de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis* y *M. avium* mediante la prueba de ELISA; para determinar el valor de corte en esta prueba, se estableció en base a la media total de las tres poblaciones considerando 2 desviaciones estándar. Los animales que mostraron altos títulos de anticuerpos y resultaron negativos a tuberculina se les evaluó la inmunidad celular mediante la prueba de IFN- γ usando como antígenos PPD bovino, PPD aviar, Concanavalina A (Con A) y un control sin estimular. Los resultados a ELISA muestran que en el primer hato en estudio con prevalencia de 0.72%, se identificaron 11 animales con altos títulos de anticuerpos, de estos 11 animales, 3 se mostraron anérgicos al obtener baja producción de IFN- γ en presencia de los antígenos y específicamente Con A. Se siguió el mismo criterio de evaluación en los 2 hatos restantes; obteniendo así, en el hato con 14.85% de prevalencia, 6 animales con altos títulos de anticuerpos, de los cuales 5 se mostraron anérgicos. En el tercer hato con 34.16% de prevalencia se mostraron 15 animales con altos títulos de anticuerpos y 10 de estos resultaron anérgicos. Estas pruebas de diagnóstico resultan ser eficientes para la detección de animales anérgicos en hatos lecheros y su importancia radica en que estos animales al resultar negativos a la prueba de tuberculina, continúan dentro de la explotación siendo un foco potencial para la diseminación de la enfermedad. El uso de estas pruebas, conjuntamente con los programas de la Campaña contra la TB podrán identificar animales reactores positivos tanto como animales anérgicos y así favorecer de una manera más eficaz el control de la TB.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TB) es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera, es un problema que se traduce en barreras no arancelarias de tipo sanitario, causa pérdidas por decomisos, disminución de la producción animal y producción láctea (17% aproximadamente). Así mismo, ocasiona pérdidas indirectas en los costos de programas de control, que generalmente se convierten en la eliminación de los animales reactivos (1, 2).

En México uno de los principales problemas en cuencas lecheras, es la alta incidencia de TB, que va del 2% al 24%, lo que representa una gran merma económica para el productor por el sacrificio de animales y la baja producción (2).

En la campaña nacional contra la TB (NOM-031-ZOO-1995) se menciona que actualmente en México existen 21 regiones en 19 estados en etapa de erradicación, donde las explotaciones predominantes en estos estados son de ganado de carne; así mismo, se menciona que la estrategia a seguir en zonas de baja prevalencia; ganado de carne son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, cuarentena de hatos infectados, vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos, y la constatación de hatos libres. En zonas de mediana y alta prevalencia; ganado lechero y doble propósito son: el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactivos, cuarentena de predios positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados (4), resultando estas medidas incosteables para el propio productor.

Figura 1. Avances de la campaña sanitaria contra la tuberculosis bovina.



Nota: Erradicación: Etapa en los estados donde la enfermedad no se ha presentado por un año.
Control: Etapa en los estados donde se manifiesta la enfermedad; debiéndose aplicar procedimientos sanitarios (5).

Algunos de los factores de riesgo predisponentes en la manifestación de la TB son el hacinamiento, el tamaño del hato, y probablemente la presencia de enfermedades inmunosupresoras como diarrea viral bovina (DVB) y leucosis bovina, entre otras (3).

Los animales con tuberculosis avanzada pueden ser negativos a la prueba de intradermorreacción, posiblemente porque desarrollan tolerancia inmunológica provocada por la saturación en sus tejidos de antígenos micobacteriales, sin embargo, la razón de la anergia en estos animales está aún indeterminada, y se atribuye en parte a la inmunosupresión provocada por algunas citocinas provenientes de subpoblaciones de linfocitos T supresores o por la participación de células presentadoras de antígeno (APC) carentes de moléculas co-estimuladoras de superficie (6). Las pruebas celulares *in vitro* tales como la proliferación linfocítica han demostrado ser útiles en el diagnóstico de la TB (7).

Los animales anérgicos tienen importancia relevante, en zonas de baja incidencia de TB, debido a que poseen la capacidad de diseminar la enfermedad dentro del establo. Se ha observado que en zonas de baja prevalencia de TB que llevan programas de control de tuberculosis durante tiempos prolongados, aparece un incremento de animales reactivos positivos, y esto es debido principalmente a que cuando se realiza la prueba de tuberculina en el hato, estos animales no son identificados, por lo tanto se vuelven focos diseminadores de las micobacterias (6). El 30% de los animales expuestos a la micobacteria son infectados, y de estos, el 10% desarrollan la enfermedad (8), incrementando así paulatinamente la incidencia de la enfermedad.

1.1 Características de la Micobacteria

La TB es ocasionada por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*; lo componen un grupo de especies micobacterianas que incluyen a *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. microti* y más recientemente ha sido descrita *M. canetti* como parte del complejo (9).

Tiene forma de bastón alrededor de 2 a 4 μm de largo por 0.2 – 0.5 μm de ancho, son bacterias aerobias obligadas, ácido alcohol resistentes, pueden teñirse como gram positivos, sin embargo es una tinción débil e irregular; las micobacterias son teñidas adecuadamente por el método de Ziehl – Neelsen (10, 11) y se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias debido a su estructura y composición química particular de la pared (12).

Su virulencia se debe a los lípidos presentes en su pared celular como micosidos, fosfolípidos y sulfolípidos; los cuales protegen al bacilo contra la fagocitosis. 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. La cera D y varias tuberculoproteínas inducen una reacción de hipersensibilidad retardada detectada en la prueba de tuberculina (11, 13).

Los lípidos de la pared también las hacen impermeables a agentes hidrofílicos, le proveen la característica de ácido alcohol resistencia; resistencia a la desecación, pudiendo mantenerse viables en tierra o heces por muchos meses (11); resiste a la acción de anticuerpos y desinfectantes (1, 14). El centro de la pared celular está compuesto de peptidoglicano, arabinogalactano ácidos micólicos y lipoarabinomano (LAM). El peptidoglicano de la pared celular es un polímero altamente entrecruzado, formado por aminoazúcares y aminoácidos que se encuentran rodeando a la membrana plasmática. (15, 16, 17)

Otro 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 (18, 19).

El LAM es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática formado por residuos de D – arabinosa y D – manosa. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunorreguladoras, entre las que se encuentran por un lado, anular la activación de las células T, e inhibir la activación de los macrófagos mediada por el interferón gamma (IFN- γ), así como la actividad de la proteína quinasa C, también estimula la producción de citocinas por los macrófagos, los cuales pueden provocar muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis (18, 20, 21).

El ácido micólico es un fuerte inmunógeno, pero se desconoce mucho acerca de sus interacciones con las células del hospedero y por otro lado, se ha especulado que este provee una barrera protectora al paso de los antibióticos. (20)

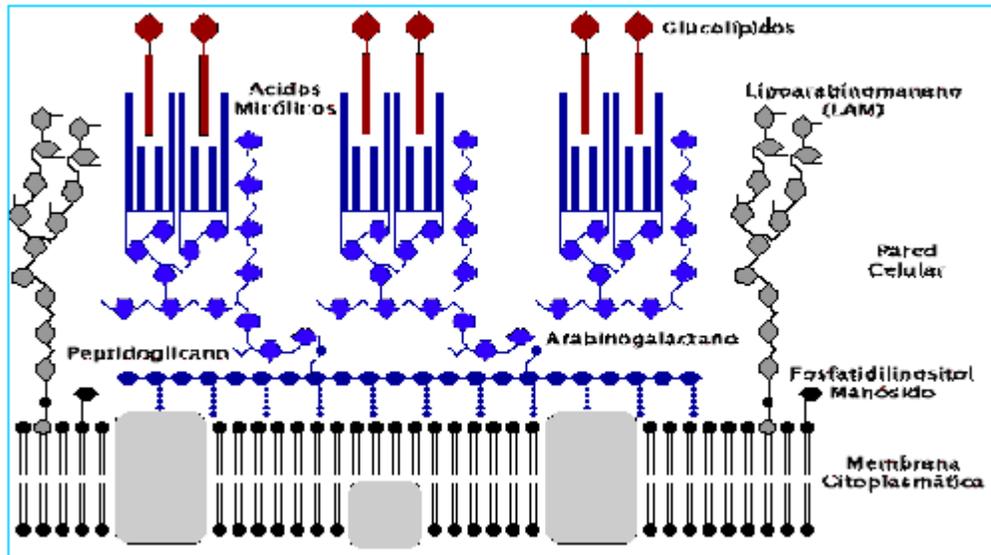


Figura 2. Esquema de las envolturas de una bacteria ácido – alcohol resistente (22).

1.2 Métodos de Diagnóstico para Tuberculosis Bovina

1.2.1 Prueba de Intradermorreacción

Actualmente, la prueba de diagnóstico para TB usada rutinariamente es la prueba intradérmica de la tuberculina donde se utiliza 0.1 ml de derivado protéico purificado (PPD) de *M. bovis* (4), la cual identifica una respuesta de hipersensibilidad retardada a una dosis de PPD obtenido de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5. Sin embargo, algunos inconvenientes de la prueba de tuberculina es su sensibilidad (70%) y especificidad (50 – 60%), además que interfiere con el estado inmune del ganado con respecto a repeticiones de la prueba y uno de los problemas de la aplicación de este método de diagnóstico es que en ocasiones animales con infecciones tempranas o con tuberculosis diseminada no reaccionan con frecuencia (7).

El número de animales infectados con *M. bovis* no diagnosticados por esta prueba oscila entre un 10 y 20%, esto constituye una desventaja, ya que estos animales infectados no detectados permanecen 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. Se ha observado que en etapas terminales de una infección tuberculosa crónica puede haber también una pérdida de reactividad a la prueba de tuberculina y anergia generalizada asociada con falla de las células T para proliferar en respuesta a antígenos micobacterianos (23).

1.2.2 Prueba de Interferón gamma (IFN- γ)

Los ensayos celulares que miden la proliferación *in vitro* de células estimuladas con PPD provenientes de ganado infectado con *M. bovis* son más usados para propósitos de investigación, sin embargo, estos ensayos son impropios como una práctica alternativa a la prueba de tuberculina en el campo debido a que estos son más costosos y se requieren de laboratorios con equipos apropiados así como de personal capacitado (24).

El ensayo de interferón gamma (IFN- γ) fue desarrollado en 1985, el cual involucra una incubación inicial de sangre completa estimulada con PPD en un periodo de 24 h. se toman los sobrenadantes y se realiza el ensayo para mostrar la presencia de IFN- γ (25). Esta citocina es conocida por ser predominantemente producida por las células T en respuesta a una estimulación antigénica, e *in vitro* se producen cantidades que pueden ser medidas por medio de una prueba de ELISA (26).

Los resultados han mostrado que la prueba de IFN- γ es significativamente más sensible que la prueba intradérmica simple para el diagnóstico de TB teniendo un 93% de sensibilidad. Sin embargo, aunque la prueba de IFN- γ , detecta ganado infectado que no había sido detectado por la prueba de intradérmica; por lo tanto, el uso de estas dos pruebas conjuntamente brindan una sensibilidad del 95.2%. La sensibilidad y especificidad de la prueba de IFN- γ son similares en todos los países que la usan como prueba de rutina y al parecer no son influenciadas por la fuente del PPD usado para estimular las muestras de sangre. En estudios experimentales, esta prueba ha mostrado detectar ganado infectado con *M. bovis* hasta 14 días postinoculación (27).

1.2.3 Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA se basa en una reacción antígeno – anticuerpo en la que una de las fases reaccionantes está inmovilizada en una superficie sólida. La unión antígeno – anticuerpo se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima (60, 76).

Se ha observado que existe una fuerte correlación entre los niveles altos de anticuerpos IgG circulantes antimicobacteria con la presencia de lesiones de tuberculosis, por lo tanto, existe gran cantidad de antígeno bacilar en el organismo del animal. Esto tiene aplicación y relevancia en situaciones de prevalencia media o elevada, en donde en una primera etapa se podrían seleccionar y eliminar los animales con enfermedad avanzada, que son la principal fuente de infección en el hato, o animales anérgicos, que pueden tener cantidades detectables de anticuerpos circulantes, y sin embargo, no manifiestan reacción a las pruebas de tipo celular como la tuberculina (6).

Esto ha llevado al desarrollo de métodos de diagnóstico alternos que puedan ayudar a la detección de animales con estas características. En particular, los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) han mostrado ser muy adecuados para determinar la presencia de anticuerpos contra *M. bovis* en el suero de animales infectados, especialmente en estados avanzados de la enfermedad (28).

Estudios realizados previamente han mostrado que aunque la sensibilidad de la prueba es baja, es muy útil para identificar animales tuberculosos no detectados por pruebas convencionales en los cuales se ha demostrado la presencia de *M. bovis* al sacrificio (28, 29).

1.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta metodología fue descrita para el diagnóstico de TB a partir de distintos tipos de muestras como son sangre, exudado nasal, leche, tejidos, y otros. (30, 31).

Es un proceso *in vitro* por medio del cual las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) blanco se duplican con ayuda de una enzima llamada ADN polimerasa, logrando millones de copias de un segmento específico que se pueden visualizar en geles de agarosa por medio de electroforesis. La PCR es un método altamente sensible y específico que se basa en la utilización de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos) que actúan como iniciadores en la síntesis de nuevas copias de ADN (32).

Esta técnica se basa en la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína MPB70 es altamente sensible y específica en el diagnóstico de TB en humanos y bovinos (33).

1.2.5 Aislamiento e Identificación

Las micobacterias son bacilos aerobios, inmóviles y no formadores de esporas, con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared. *M. bovis* crece más lentamente que *M. tuberculosis*, es microaerófilo y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C con una atmósfera de 5 – 10% de CO₂ en un medio más complejo con una base de papa y huevo como el medio Löwestein Jensen, o con una base de agar y suero como el medio Middlebrook. La morfología colonial de *M. bovis* es pequeña, seca, con aspecto escamoso y no cromógena (34, 35, 36).

Se utilizan diversas pruebas bioquímicas para distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*. A diferencia de este último, las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativos en *M. bovis*, pero el resto de las características bioquímicas son indistinguibles: produce catalasa termosensible

(positiva a temperatura ambiente e inactivada a 68°C) y la tolerancia a la sal es negativa. El crecimiento en medio Löwenstein-Jensen es pobre en presencia de glicerol, y mejor en presencia de piruvato, el crecimiento de *M. bovis* es inhibido por la TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico) a una concentración de 5 µg/ml. Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y, en cualquier caso, el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante (34).

1.3 Patogenia y Respuesta Inmune en la Tuberculosis Bovina

La bacteria es transmitida principalmente por vía respiratoria y en pocas ocasiones por vía digestiva, a través de alimento o agua contaminada, heces, orina, descargas genitales y leche. La infección comienza con el depósito de la bacteria en el pulmón o en la mucosa de la faringe. En animales que sufren una primera infección una multiplicación inicial tiene lugar cuando los macrófagos ingieren los microorganismos. La resistencia a la destrucción por los fagocitos permite una multiplicación continua intra y extracelular. Alrededor del foco inicial los microorganismos se multiplican y se desarrolla una respuesta inflamatoria donde intervienen polimorfonucleares. Las células infectadas y las bacterias alcanzan los nódulos linfáticos regionales donde continúa la proliferación bacteriana así como una respuesta inflamatoria. Después de una semana, las reacciones inmunes mediadas por células comienzan a modificar la respuesta del hospedador; de una respuesta a cuerpos extraños a una reacción característica de granuloma infeccioso. La bacteria que es fagocitada y digerida en vacuolas fagocíticas, es procesada por fagosomas y porciones del antígeno digerido es llevado a la superficie junto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). El reconocimiento del antígeno / MHC clase II es característica de una respuesta inmune adquirida. La producción de citocinas como la interleucina 1 (IL-1) por el macrófago continúa la respuesta y es seguida por la producción de IL-2 por los linfocitos T; IL-2 es un factor de crecimiento de células T y facilita la multiplicación clonal.

Existen dos tipos de respuesta inmune producida por este tipo de células T. La respuesta inmune tipo 1, que es asociada con la respuesta inmune mediada por células (IMC); respuesta de importancia en la protección contra tuberculosis e inversamente la respuesta tipo 2, que es asociada con la respuesta humoral y no hay protección en contra de la tuberculosis. Este tipo de respuesta se caracteriza por células Th2 produciendo IL-4, IL-5 e IL-10 (38).

Los macrófagos infectados secretan IL-12, una citocina responsable de la activación de los linfocitos CD4+ (Th1), que producen IFN- γ , factor de activación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de inhibición de migración (MIF), que atraen y activan macrófagos (13).

La respuesta inmune hacia la infección por *M. bovis*, está basada en una respuesta de células T tipo 1 (Th1), iniciándose tras la activación de linfocitos CD4+ capaces de secretar IFN- γ , pero existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como linfocitos T CD8+ y linfocitos T $\gamma\delta$, que están involucrados en la respuesta temprana y proveen una rica fuente de quimiocinas y también secretan IFN- γ (37).

Los linfocitos T CD4+ encabezan la respuesta inmunitaria protectora a través de tres mecanismos; el primero, es el reconocimiento de los antígenos de la bacteria mediante los receptores de células T (TCR), en el contexto de la MHC clase II, así los linfocitos T CD4+ antígeno específico inician el segundo mecanismo el cual es la activación celular. El tercer mecanismo es la fase efectora, que consiste en un patrón específico de citocinas; así, la subpoblación Th1 producirá grandes cantidades de IL-2, factor de necrosis tumoral (TNF) e IFN- γ promoviendo así la respuesta inmune celular y la activación de macrófagos; además, esta respuesta induce la activación y proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ (39). El IFN- γ es clave en la infección por *M. bovis*. Esta citocina es producida por células CD4 y CD8, y por células *natural killer* (NK) durante la infección por *M. bovis* en TB (40).

Los macrófagos activados adquieren la capacidad de destruir a la micobacteria. Su eficiencia depende de una adecuada respuesta inmune así como de la virulencia de la bacteria los linfocitos CD4+ Th1 así como los linfocitos T $\gamma\delta$ lisan a la micobacteria contenida en los macrófagos. En rumiantes, los linfocitos T $\gamma\delta$ representan más del 40% de los linfocitos circulantes en animales adultos (13, 41).

La mayoría de las células T $\gamma\delta$ expresan la molécula WC1; y se ha observado que la gran actividad de estas células en las infecciones por *M. bovis* están involucradas en la respuesta inmune Th1; tienen una fuerte proliferación y producción de IFN- γ , después de la estimulación *in vitro* con antígenos micobacterianos (42). Estas células participan en la formación el granuloma, debido a que su presencia favorece el reclutamiento de monocitos, mientras que en su ausencia se desarrollan lesiones piogranulomatosas (43).

Los linfocitos T activados por las micobacterias interactúan con los macrófagos en 3 formas. Las células T cooperadoras CD4+ secretan IFN- γ que activa a los macrófagos, para producir una destrucción intracelular de las micobacterias a través de medios nitrogenados como el oxido nitroso (N₂O), oxido nítrico (NO) y ácido nítrico (HNO₃). Por otro lado, las células T citotóxicas CD8+ destruyen los macrófagos infectados por las micobacterias, destruyendo así también a las micobacterias; y por ultimo, las células T doblemente negativas CD4- CD8- lisan a los macrófagos sin destruir a las micobacterias; en consecuencia, aparecen macrófagos más competentes que inhiben la multiplicación intracelular de la bacteria y limitan su crecimiento. La lisis de los macrófagos da lugar a la formación de granulomas caseificantes (reacción de hipersensibilidad retardada) (44, 45).

Mientras que los linfocitos CD8+ reconocen el antígeno micobacteriano en el contexto MHC-I, una vez activados estos linfocitos también producen IFN- γ y pueden producir lisis de las células que expresan antígenos micobacterianos (46).

Los macrófagos, transformados en células epitelioides frecuentemente se vuelven células predominantes, a su vez, también aparecen células gigantes tipo

Langhans, las cuales son probablemente producto de una fusión celular. Ambos tipos celulares son derivados de macrófagos. Al centro de la lesión se desarrolla una necrosis caseosa y este foco necrótico queda rodeado por tejido de granulación, macrófagos y linfocitos. Aparecen fibrocitos y por último una capa fibrosa que envuelve la lesión, la cual es llamada tubérculo. Los tubérculos pueden agrandarse, unirse y eventualmente ocupan grandes porciones de los órganos (13). En el ganado vacuno el 90% de los casos, las lesiones pulmonares se encuentran en los lóbulos caudales (45, 47).

En ocasiones un proceso exudativo agudo toma lugar, predominantemente por una respuesta neutrofílica. Se piensa que esto puede ser favorecido por tales factores como: alta dosis infectante, alta virulencia de la cepa, predisposición del hospedero, pérdida de la arquitectura del tejido como en el pulmón y un alto grado de hipersensibilidad a tubérculos.

Los bacilos se pueden diseminar más lejos y alcanzar el conducto torácico y la sangre, medio que a su vez disemina a los bacilos a todos los órganos (tuberculosis miliar). Los individuos jóvenes frecuentemente desarrollan lesiones más severas que los adultos. También existen diferentes susceptibilidades entre razas; el ganado cebú es más resistente que las razas europeas, sin embargo, esto ha sido muy discutido (13).

La infección tuberculosa también se puede dar por una reactivación, que es el resultado de la reinfección exógena o bien de la reactivación de la infección primaria, siendo esta la causa más común (13, 48). Los granulomas de la tuberculosis secundaria suelen localizarse en el vértice de los pulmones, aunque también pueden estar diseminados en médula ósea, meninges y otros órganos. Los rasgos característicos de la tuberculosis secundaria son la presencia de necrosis caseosa y de cavidades, que al romperse circulan a través en los vasos sanguíneos, extienden la micobacteria por todo el organismo y cuando se abren las vías respiratorias liberan micobacterias en aerosoles (48).

1.4 Mecanismos de la Anergia en la Tuberculosis Bovina

El término anergia se acuñó por Nossal & Pick en 1980, para describir el estado sin respuesta que era inducido en células B después de una inyección de proteínas solubles *in vivo* (49).

Las primeras observaciones de falta de respuesta de células T a un antígeno, fueron hechas en clonas de este tipo de células de humano cultivadas con un antígeno en ausencia de células presentadoras de antígeno (APC). Desde ese tiempo el término anergia se ha usado para describir la falta de respuesta inmune celular, inducida de diferentes maneras y mediada por mecanismos diversos (49, 50).

Estudios *in vitro*, muestran que este estado sin respuesta es inducido por la estimulación de los receptores de células T en ausencia de señales co-estimuladoras, tales como las que ocurren como resultado de una interacción de las moléculas B7 en la célula presentadora de antígeno (APC) con receptores CD28 en la célula T (51).

La tolerancia inmunológica es el fenómeno de la inactivación funcional, inducida por el antígeno o la muerte de linfocitos específicos, dando lugar a la incapacidad de un organismo para responder frente a ese antígeno (52).

El estado de anergia en tuberculosis ha sido referida como la ausencia de la respuesta celular, donde la respuesta de las células Th1 que se distinguen por secretar IL-2 e IFN- γ está disminuida o nula y predomina la respuesta de células Th2, que sintetizan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-3, citocinas que se concentran más en estimular a los linfocitos B (Figura 2) (53, 54).

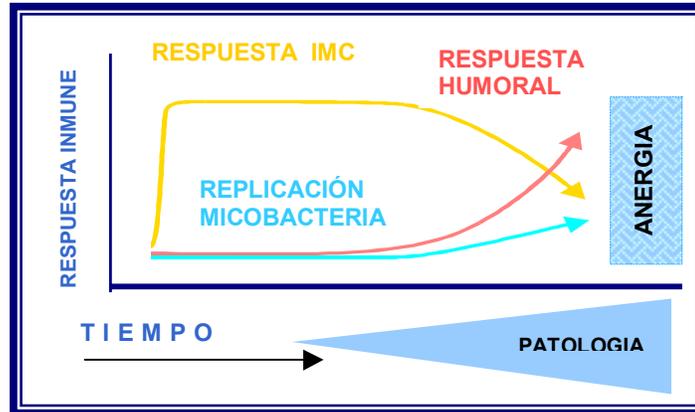


Figura 2. Diagrama del espectro de la respuesta inmune de bovinos después de la infección con *M. bovis*. La IMC desarrolla una respuesta inicial, al incrementar número de bacilos se desarrolla la respuesta humoral (anticuerpos). El estado de anergia ocurre conforme avanza la enfermedad (55).

Esto provoca una reducida o falta de reactividad a una prueba de hipersensibilidad tardía como la prueba intradérmica del PPD. La baja reactividad hacia esta prueba puede asociarse a una infección avanzada, se disminuye la capacidad de los linfocitos T de secretar citocinas cuando sus receptores celulares actúan recíprocamente con un antígeno específico (56).

La mayoría de los informes sobre anergia han descrito la inhibición de secreción de la IL-2 por células T, que son normalmente capaces de secretar IL-2 durante la activación. Sin embargo, la anergia también se ha descrito en la célula T cooperadora tipo 2 (Th2) en que la secreción de citocinas, siendo la más importante la IL-4, no se afecta; pero la habilidad de las células T para proliferar en respuesta a IL-4 se inhibe. El tema común en estos ejemplos es que la anergia se refiere a la incapacidad de las células T de producir o responder a las señales para su proliferación. Es importante notar que la falta de respuesta es a menudo parcial (49).

Si las células T CD4+ reconocen antígenos procesados presentados por APC que carecen de coestimuladores, las células T no proliferan ni se diferencian y se vuelven incapaces para responder al antígeno, incluso aunque se presenten posteriormente por APC competentes. Este tipo de pérdida de respuesta funcional o anergia, se demostró inicialmente en experimentos *in vitro*, utilizando líneas

celulares Th1 de ratón. La activación completa de las células T requiere tanto el reconocimiento del antígeno (señal 1) como de los coestimuladores, principalmente el B7-1 y B7-2 (señal 2). La señal 1 sola, es decir, el reconocimiento del antígeno, puede dar lugar a la pérdida de respuesta o anergia. Las células T anérgicas son incapaces de activar algunos de los factores de transcripción que se unen al promotor de la IL-2 y, de esta manera, no pueden producir IL-2. Una forma similar de pérdida de respuesta funcional específica de antígeno se induce *in vivo*, si se administran grandes cantidades de antígenos proteicos sin adyuvantes. Se postula que, en ausencia de adyuvantes, las APC no están activadas para expresar grandes cantidades de coestimuladores, por lo que las células T reconocen el antígeno sin la adecuada coestimulación.

Las células T se activan si los linfocitos T CD4+ específicos de un determinado antígeno peptídico, reconocen el antígeno presentado por APC competentes. No obstante, si las mismas células T se encuentran primero con una forma diferente del antígeno, en el que los residuos que contactan con el TCR están ligeramente alterados, las células se pueden volver anérgicas (52) (Figura 3).

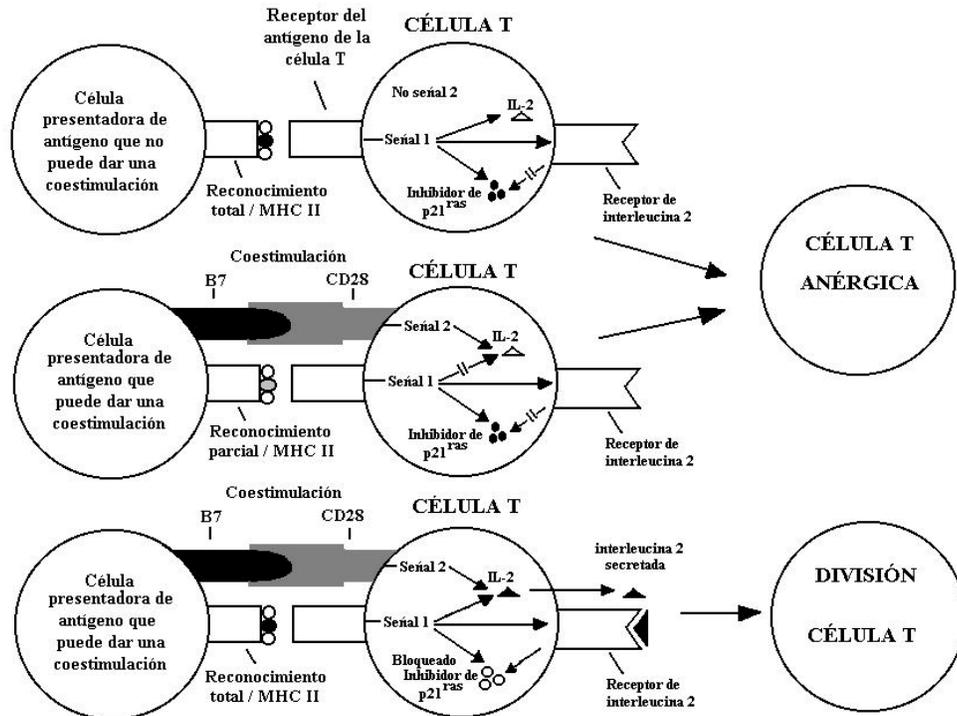


Figura 3. La anergia de las células T es inducida en células CD4+ por un reconocimiento parcial en la presencia de una coestimulación o un reconocimiento total en ausencia de una coestimulación (57).

Las células dendríticas (DC) juegan un papel importante en la activación de la célula T. La maduración de DC se requiere para una presentación del antígeno óptima: las DC inmaduras son activadas durante la captación y proceso del antígeno, pero muestran una moderada superficie de expresión en las moléculas del MHC tipo II y una pequeña o nula expresión de las moléculas coestimuladoras. La maduración de DC es estimulada por un lipopolisacárido (LPS) y varias citocinas (IL-1, GM-CSF, TNF- β), y las DC maduras expresan niveles más altos de moléculas coestimuladoras y MHC, y es significativamente más capaz de activar a la célula T (58).

Los mecanismos bioquímicos de la anergia no se han definido con exactitud, sin embargo, análisis bioquímicos sugieren que las células T anérgicas pierden la capacidad de sintetizar IL-2, debido a un defecto en el acoplamiento con el receptor del antígeno con la proteína p21^{Ras}, necesaria para la inducción y activación de la proteína-1-dependiente del gen de transcripción de IL-2 (59). Las

células T anérgicas no producen su factor de crecimiento (IL-2), y no proliferan en respuesta al antígeno; sin embargo, no se establece que la respuesta a IL-2 sea una característica esencial de una célula T anérgica (58). En los clones de células T que se vuelven anérgicas, el entrecruzamiento del receptor de la célula T (TCR) no activa las vías de transducción de señales que conducen a la activación de las enzimas que participan en la generación del factor de transcripción (52).

La capacidad de una célula para responder a un antígeno depende de contar con el receptor correcto de antígeno de la célula T. Se ha observado que se desarrolla tolerancia a un antígeno si un animal carece de células T con receptores específicos para ese antígeno. Dosis altas de antígeno producen una forma de tolerancia que se denomina parálisis inmunitaria y es probable que se trate de una forma de anergia clonal. Las dosis altas tal vez evadan a las células presentadoras de antígenos, lleguen a las células T cooperadoras y las hagan anérgicas (60).

La estimulación repetida de los linfocitos T por antígenos persistentes parece favorecer la inducción de la anergia en las células T nativas (61), así como también puede provocar la muerte de las células activadas mediante un proceso de apoptosis (52).

1.5 Características Generales de las Lectinas

Las lectinas constituyen un interesante grupo de proteínas de origen no inmune, que comparten en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas (62). Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son:

- La evaluación de la producción de citocinas (interferón y citocinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos

provenientes de pacientes con enfermedades como la tuberculosis, leishmaniasis, entre otras (63, 64).

- La caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión (65, 66).
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas (67).
- Estudios acerca de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación (64, 68).

Estos mitógenos pueden activar de forma diferente a los linfocitos T y B, por ejemplo, la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con A) inducen mitogenicidad en células T (62).

La Con A es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*. Debido a sus propiedades bioquímicas, la Con A fue clasificada por Summer y Howell en 1936 como una lectina. Los estudios realizados demuestran que la Con A es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos (69).

La proliferación de linfocitos *in vitro* inducida por mitógenos es la prueba más ampliamente utilizada. Se basa en que ciertas lectinas, como la Con A se unen a residuos hidrocarbonados de glucoproteínas de superficie de los linfocitos T que están relacionados con el proceso de activación (ej. TCR y CD2); estimulando así su proliferación policlonal. Esta técnica constituye una herramienta para el diagnóstico de las inmunodeficiencias de tipo celular, tanto las primarias como las secundarias (70, 71, 72, 73).

En inmunología clínica experimental, resulta de gran utilidad para el estudio del efecto que los fármacos, productos biológicos (vacunas, inmunomoduladores) y agentes patógenos provocan sobre la respuesta inmune celular (74).

2. HIPOTESIS

Los estados de anergia en tuberculosis bovina se asocian con una polarización en el tipo de respuesta inmune, de una respuesta celular tipo Th1 hacia una respuesta tipo Th2, caracterizada por la producción de niveles altos de anticuerpos a los antígenos micobacterianos, debido a ello es posible identificar bovinos tuberculosos anérgicos empleando pruebas que evalúen tanto la respuesta celular como humoral; como son: la prueba intradérmica de hipersensibilidad tardía (DTH) e IFN- γ para la respuesta Th1 y la prueba de ELISA para la respuesta Th2, a fin de estimar y comprobar la polarización de la respuesta inmune propia en los estados de anergia.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de vacas anérgicas en explotaciones lecheras con diferente prevalencia de tuberculosis bovina.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la prevalencia de TB mediante la prueba de tuberculina doble comparativa en tres hatos lecheros.
2. Realizar pruebas serológicas (ELISA) para la identificación de animales con altos títulos de anticuerpos.
3. Establecer valores de corte en los tres hatos, empleando análisis estadísticos
4. De los animales evaluados serológicamente, confirmar el estado de anergia por medio de la prueba de IFN- γ en presencia de Con A bajo condiciones *in vitro*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales de Estudio

Para el presente estudio se utilizaron animales en producción de 3 diferentes hatos lecheros. Uno de ellos con población de 277 animales, el segundo con población de 101 animales y el tercer hato con población de 322 animales.

5.2 Obtención de extractos proteicos de filtrado de cultivo (EPFC) de *M. bovis* y *M. avium*.

La cepa de micobacteria que se empleó en este estudio fue *M. bovis* AN5, *M. avium* D4, donada por PRONABIVE. La cepa *M. bovis* fue mantenida en medio de Löwenstein Jensen o en medio de Stonebrink Lesslie. Se cultivó la micobacteria en medio líquido sintético de Dorser Henley modificado. El medio de cultivo se distribuyó en cantidades de 1 litro en frascos con capacidad de 2 litros; estos frascos fueron inoculados con *M. bovis* e incubados a 37°C durante 6 semanas. Al terminar los diferentes periodos de incubación, los cultivos se filtraron a través de una malla de alambre No. 85 (178 µm de apertura) para separar la mayor cantidad de masa bacteriana. El líquido residual se paso a través de filtros de asbesto y celulosa. (Carlson Ford) 1/1250 BK9 o Seitz K2), posteriormente se filtró a través de papel filtro Whatman #3 y por ultimo se emplearon filtros millipore (Millipore Corp. Bradford, Mass) de 1.2, 0.45 y 0.22 µm. Las proteínas presentes en los filtrados de cultivo se precipitaron con cristales de sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] a una saturación final de 80% con agitación constante a 4°C por 24 horas. Al terminar este tiempo la solución se centrifugó a 4°C por 90 minutos a 8500 rpm (Beckham rotor JA-10) para empaquetar el precipitado, el cual fue resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.3 y posteriormente dializado exhaustivamente contra PBS en bolsas de diálisis (Sparta/Por No. 3787-D40) con punto de corte de 2000 Da a 4°C durante 36 horas con 4 cambios de 2 litros cada uno. Después del dializado se comprobó la ausencia de [(NH₄)₂SO₄] agregando cloruro de bario. El material obtenido se designó como extracto

proteico de filtrado de cultivo (EPFC), la concentración de proteína de los EPFC's se determinó por el método de Bradford y fue dividido en alícuotas de 1 ml las cuales fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

5.3 Prueba de Intradermorreacción Doble Comparativa

Esta prueba evalúa la hipersensibilidad de tipo tardío y actualmente es usada por la campaña nacional de erradicación de la tuberculosis bovina y brucelosis (CANETB) (1, 75).

Se evaluó la respuesta inmune celular *in vivo*, con las tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña, realizando una prueba doble comparativa (PPD bovino y PPD aviar). El procedimiento de esta prueba es; rasurar las dos diferentes áreas de inoculación en la tabla del cuello; se levanta el pliegue de la piel en el centro de estas áreas rasuradas y se mide el grosor utilizando un Vernier, registrando los valores en milímetros. Se inoculó 0.1 ml de PPD bovino y 0.1 ml de PPD aviar en cada área rasurada respectivamente vía intradérmica. La lectura de la prueba se realiza a las 72 h, midiendo con el vernier el grosor de la piel en la zona inoculada. En cuanto a la interpretación de esta prueba intradérmica comparativa, se define como animal positivo aquel que presentó un engrosamiento superior a 4 mm a la tuberculina bovina sobre la tuberculina aviar; se considera sospechoso si la reacción a tuberculina bovina es entre 1 y 3.9 mm; y se considera negativa cuando no hubo reacción de la tuberculina bovina o el engrosamiento igual o menor a 1 mm (4).

5.4 Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Se evaluó la respuesta humoral de todos los animales de cada hato. Detectando anticuerpos contra los antígenos micobacterianos, mediante la prueba serodiagnóstica de ELISA comparativa, empleando EPFC de *M. bovis* y *M. avium* como antígeno. A las placas sensibilizadas se les añadió 100µl por pozo de cada suero diluido 1:50 en solución bloqueadora (3% de leche en polvo descremada en

PBS y 0.1% de Tween 20) y se incubaron por 1 h. en estufa de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Posterior a esto, se descartó la solución y se lavaron por 5 veces con solución de lavado (PBS 0.01 M pH 7.4 con NaCl y 0.1% de Tween 20), enseguida se agregaron a cada pozo 100µl de proteína G conjugada con peroxidasa diluida 1:8000 en solución bloqueadora, se incuban 1 h. en estufa de CO₂ al 5% a 37°C; se descartó la solución y se lavaron por 5 veces con solución de lavado; posterior a esto, se añadieron a cada pozo 100µl de solución de revelado (10ml / placa de buffer de citratos pH 4.5, 4mg de orto-fenildiamina y 4µl H₂O₂). Se paró la reacción a los 10 min añadiendo 50µl de solución de paro (H₂SO₄ 2M). Las lecturas se realizaron a 492 nm. Con los resultados obtenidos, se establecieron valores de corte mediante análisis estadísticos y se seleccionaron a los animales resultantes positivos con altos títulos de anticuerpos contra *M. bovis*.

5.5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y condiciones de cultivo

De los posibles animales anérgicos (negativos a tuberculina y con altos títulos de anticuerpos) se tomó muestra de sangre para evaluar la respuesta celular bajo condiciones *in vitro*.

Se obtuvo una muestra de 6 ml de sangre con heparina de los animales que resultaron negativos a la prueba de tuberculina, y que presentaron altos títulos de anticuerpos en el ELISA comparativo (*M. bovis* / *M. avium*). El paquete de células blanco (leucocitos) se separó por gradiente (Ficoll-Paque Plus)¹, en tubos Falcon de polipropileno de 15 ml. Se agregaron 5 ml de Ficoll-Paque Plus y se depositaron cuidadosamente 7 ml de sangre con heparina evitando romper el gradiente; posteriormente se centrifugaron a 2800 rpm por 40 minutos. En seguida se recuperó la interfase de células mediante pipetas Pasteur y se depositó en tubos Falcon de 15 ml. Se agregó 5 ml de solución de Hanks² y se centrifugaron nuevamente a 2800 rpm durante 10 minutos; se decantó el sobrenadante y se

¹ Amersham Biosciences

² In Vitro, S. A.

repitió este procedimiento nuevamente. Finalmente se adicionaron 3 ml de medio RPMI 1640² con 10 % de suero fetal bovino (SFB). El conteo celular fue realizado en una cámara de New Bawer (78, 79).

5.6 Conteo de leucocitos

La viabilidad se determinó tomando 5 µl de células del tubo donde fueron resuspendidas en 45 µl de RPMI y se depositaron en un vial, obteniendo así un volumen total de 50 µl en una dilución 1:10. De este volumen se tomaron 10 µl de muestra y 10 µl de azul de Tripán, depositándolos en otro vial para poder llevar a cabo el conteo en una cámara de New Bawer. Una vez obtenido el conteo de cada muestra, estos se ajustaron a 5×10^6 células viables por pozo en placas para cultivo de 24 pozos.

5.7 Estimulación *in vitro* de linfocitos

Se estimularon los cultivos celulares agregando a cada pozo respectivamente 100 µl de PPD bovino³ (20µg/ml), 100 µl de PPD aviar³ (20 µg/ml), 10 µl de Con A⁴ (1 µg/ml) y un pozo sin estimular como control. Las placas se incubaron por 72 horas a 37°C y 5% de CO₂. Posterior a esto se cosecharon 200 µl de sobrenadante que fueron almacenarlos a - 70°C para su evaluación por la prueba de IFN-γ.

5.8 Prueba de Interferón-γ (IFN-γ)

La prueba se realizó empleando un kit comercial (BOVIGAM™ Bovine Gamma Interferon Test)³ que se basa en la estimulación *in vitro* de linfocitos aislados a partir de sangre heparinizada. Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocitos T circulantes presentes en la muestra secretan IFN-γ, y fue medido mediante una prueba de ELISA de captura (80).

³ CSL Veterinary

⁴ Sigma – Aldrich

Para la prueba de IFN- γ se adicionaron 50 μ l de diluyente a la placa (amortiguador diluyente para plasma). Después se adicionaron 50 μ l de muestra problema a los diferentes pozos, se mezcló el contenido y se incubó en estufa de CO₂ al 5% a 37°C por 1 h. Se decantó el contenido, se realizó un lavado, empleando un buffer de lavado y se dejó secar la placa; este procedimiento de lavado se repitió 5 veces más. Se adicionaron por pozo 100 μ l de conjugado (anticuerpo anti-IFN- γ bovino) y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 1 h. Se realizó el lavado de la misma forma que el anterior y se adicionaron 100 μ l de cromógeno tetrametilbencidina (TMB), preparado con amortiguador enzima – sustrato y H₂O₂. Se cubrieron las placas protegiéndolas de la luz y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Concluido este tiempo, se adicionaron 50 μ l de solución de paro (0.5M H₂SO₄) a cada pozo. Se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm. (80, 81, 82).

5.9 Análisis Estadístico

Se obtuvo la media de los valores obtenidos de los tres hatos en estudio, considerando las absorbancia de las pruebas de ELISA mas dos desviaciones estándar y los animales que resultaron por arriba del punto de valor de corte, se consideraron positivos a la prueba de ELISA. Esto se realizó para establecer un intervalo de confianza del 95% (83, 93).

DISEÑO EXPERIMENTAL

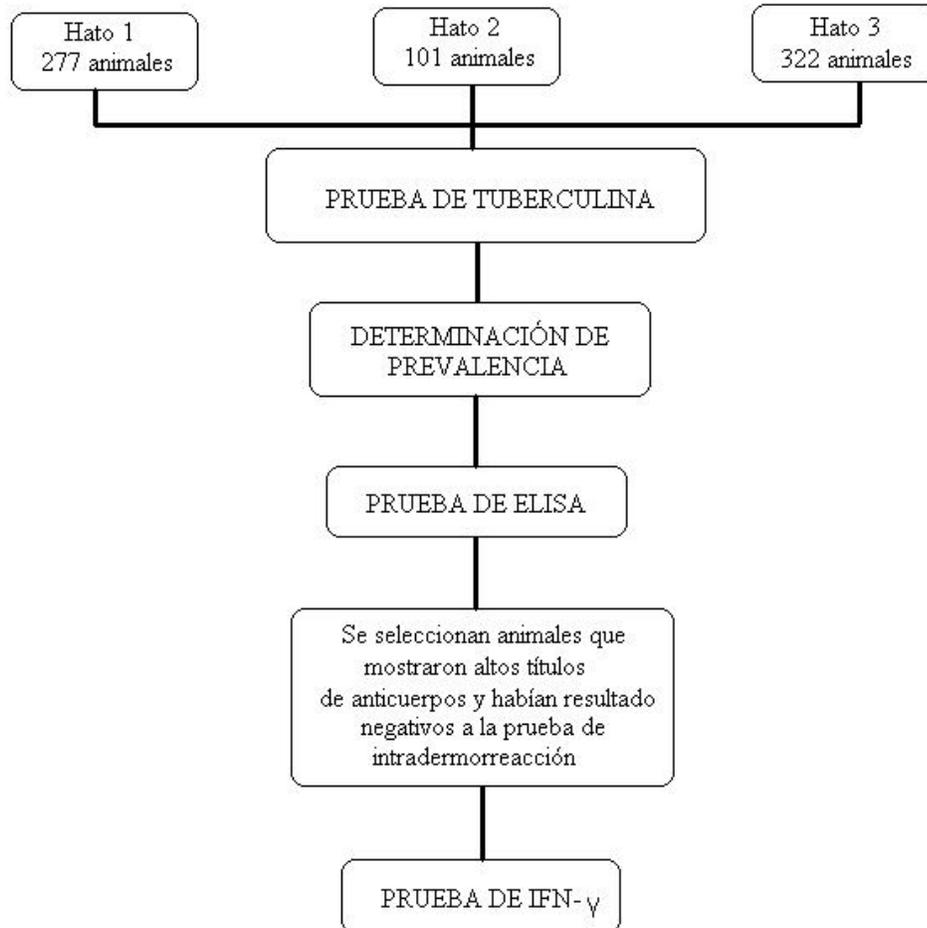
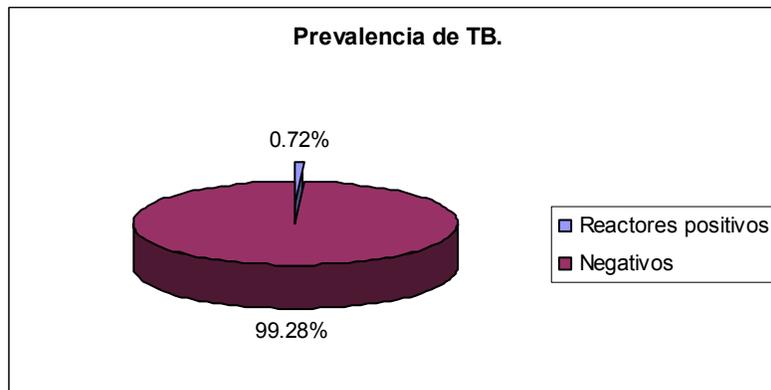


Figura 4. Diseño experimental

6. RESULTADOS

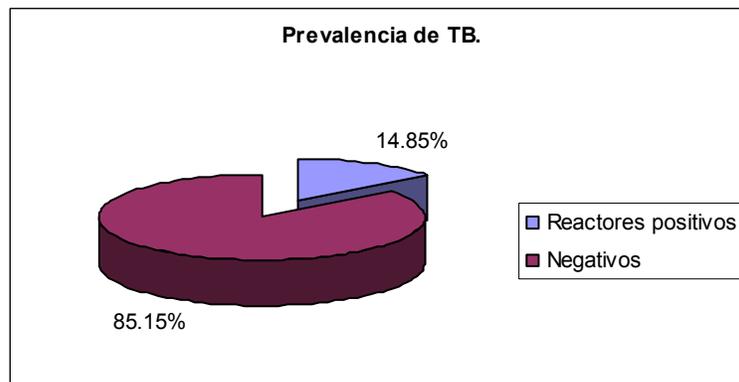
6.1 Resultados a la prueba de Intradermorreacción

A todos los animales en producción de las distintas explotaciones, fueron evaluados por la prueba diagnóstica de intradermorreacción doble comparativa, obteniendo así las prevalencias de la enfermedad en cada una de ellas. En el primer hato en estudio se evaluaron 277 animales, resultando con 2 animales reactores positivos (0.72%) (Gráfica 1).



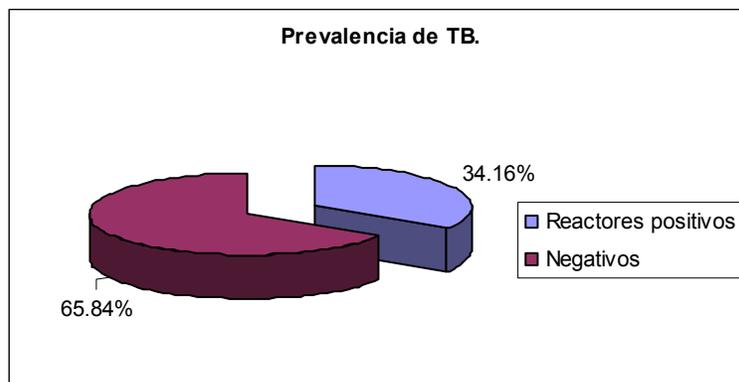
Gráfica 1. Resultados a la prueba intradérmica doble comparativa en el primer hato con 277 animales en producción y con una prevalencia de 0.72% de TB.

En el segundo hato se evaluaron 101 animales, resultando con 15 animales reactores positivos (14.85%) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Se muestra los resultados a la prueba intradérmica doble comparativa en la segundo hato con 101 animales.

En el tercer hato en estudio se evaluaron 322 animales, resultando con 110 animales reactivos positivos (34.16%) (Gráfica 3).



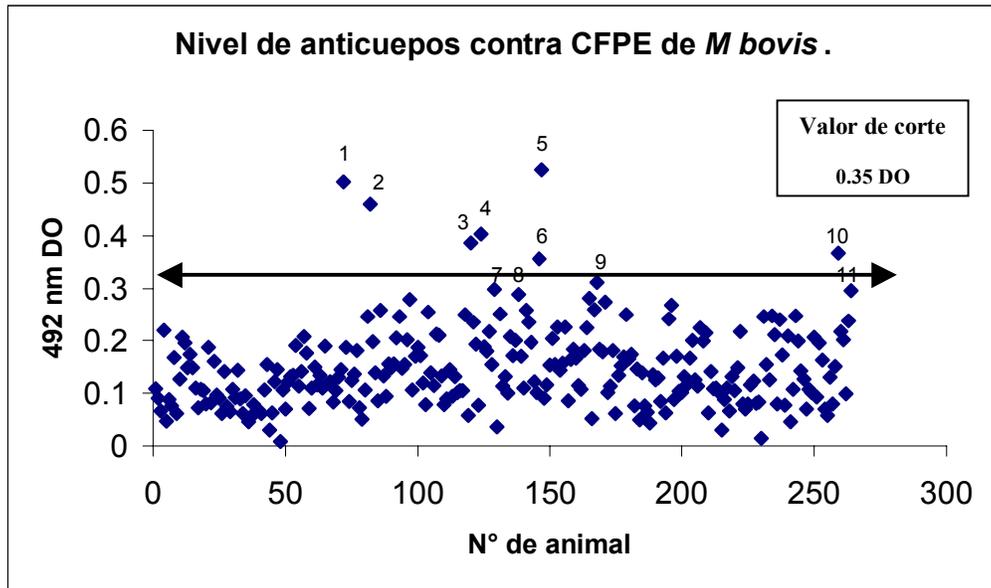
Gráfica 3. Resultados en en tercer hato con 322 animales se muestra los resultados a la prueba intradérmica doble comparativa.

6.2 Resultados de la prueba de ELISA

A todos los animales que fueron evaluados bajo la prueba de intradermorreacción doble comparativa, se les evaluó por medio de la prueba de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra componentes de EPFC de *M. bovis* y *M. avium*.

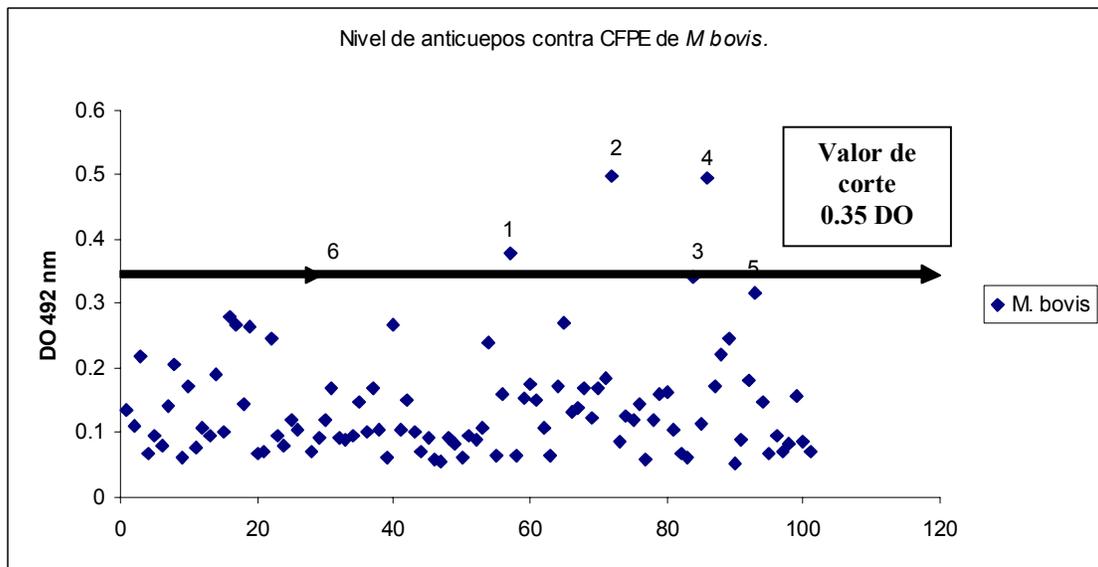
El motivo de realizar esta prueba comparativa entre ambos antígenos, fue para determinar la especificidad de la respuesta humoral, preferentemente hacia *M. bovis*. Es importante mencionar que ningún animal que resultó positivo en la prueba de intradermorreacción en los diferentes hatos, se relacionó con altos títulos de anticuerpos.

En la gráfica 4 se observa la presencia de anticuerpos de cada animal evaluado, expresado en densidad óptica (DO) a 492 nm. Todo animal que resultó por arriba del punto de corte se consideró positivo a ELISA y como posible animal anérgico. En el primer hato donde la prevalencia de TB fue de 0.72% el punto de corte fue de 0.35 DO y 11 animales resultaron positivos a esta prueba mostrando altos títulos de anticuerpos.



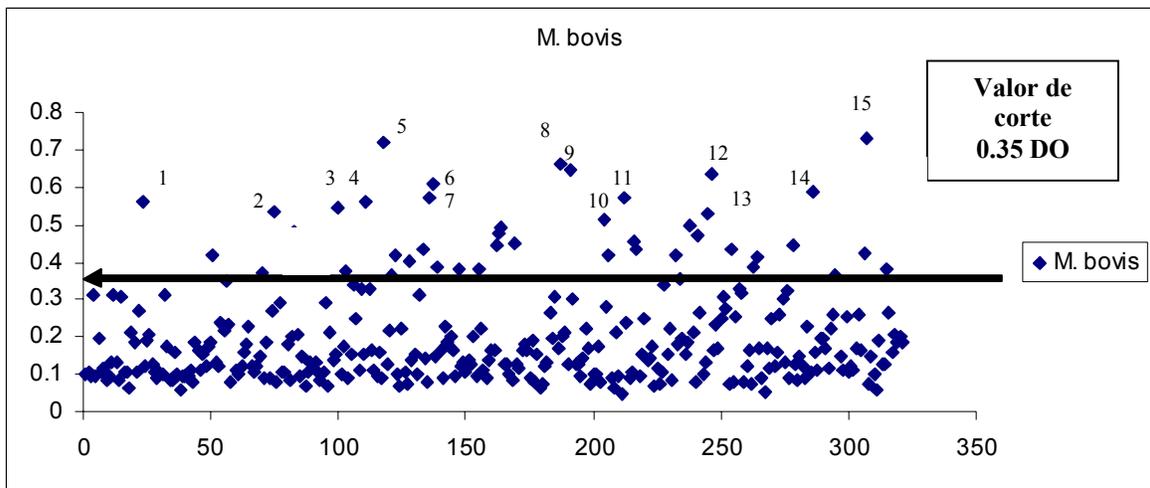
Gráfica 4. Respuesta de anticuerpos obtenida mediante ELISA simple con EPFC de *M. bovis* de 277 animales.

En la gráfica 5 se observa el segundo hato donde la prevalencia de TB fue de 14.85%, 5 animales con altos títulos de anticuerpos por arriba del valor de corte.



Gráfica 5. Se muestra la respuesta de anticuerpos obtenida mediante ELISA simple con EPFC de *M. bovis*, de la segunda explotación de 101 animales.

En la gráfica 6 se observa el tercer hato donde la prevalencia de TB fue de 34.16%, 43 animales resultaron con altos títulos de anticuerpos por arriba del valor de corte.



Gráfica 6. En el tercer hato, con 322 animales, se muestra la respuesta de anticuerpos obtenida mediante ELISA simple con EPFC de *M. bovis*.

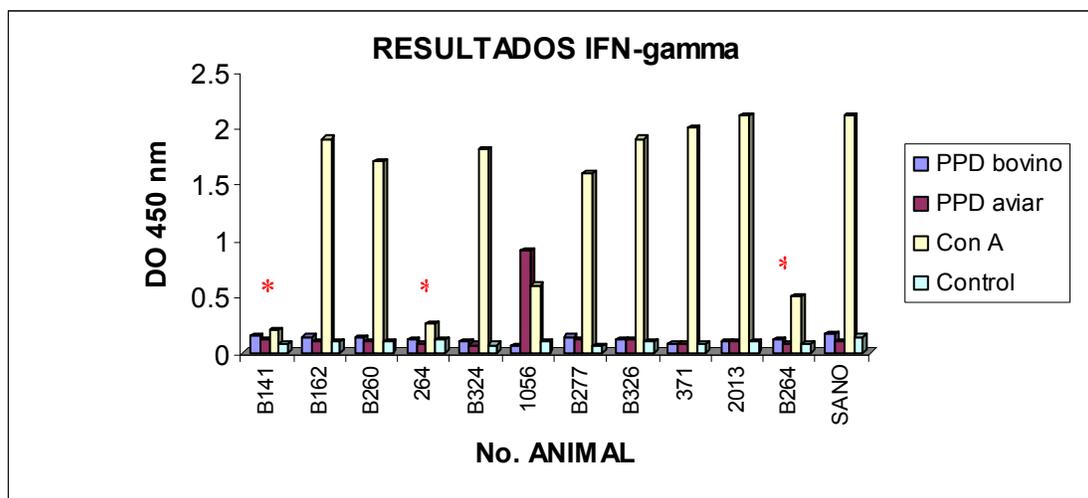
El motivo por el cual no se anexaron los resultados de la prueba de ELISA utilizando como antígeno *M. avium*, fue debido a que esta prueba se realizó con la finalidad de demostrar la especificidad de la respuesta humoral hacia *M. bovis*, además de que los resultados que se obtuvieron con esta prueba no fueron relevantes para efectos de este estudio.

6.3 Resultados a la prueba de IFN- γ

De los animales que resultaron negativos a la prueba de ID y positivos a la prueba de ELISA, se les evaluó la inmunidad celular bajo condiciones *in vitro*, usando como antígenos PPD bovino, PPD aviar, el mitógeno Con A y un control sin estimular.

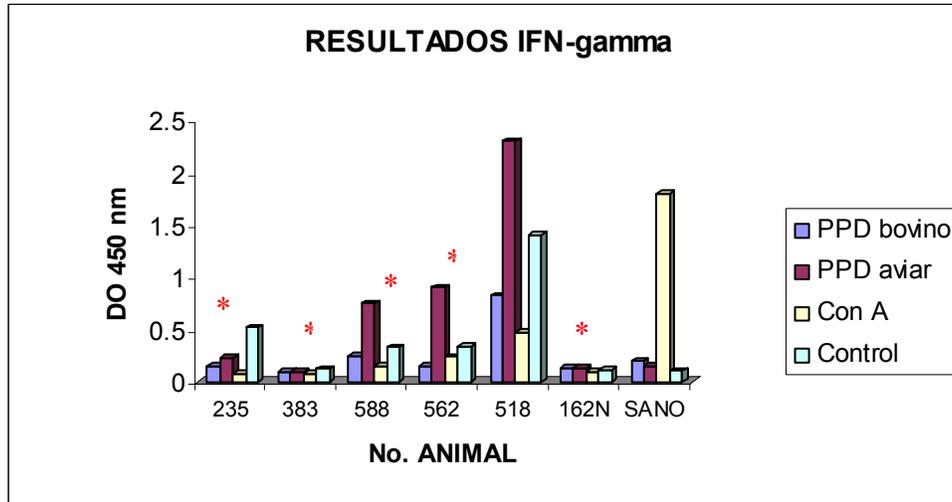
Del primer hato con 0.72% de prevalencia se seleccionaron 7 animales que resultaron por arriba del valor de corte a ELISA y 4 animales más que fueron considerados muy cercanos al este valor (Gráfica 4), De estos mismos animales

en estudio, se observó que la producción de IFN- γ , en presencia de PPD bovino, PPD aviar y el mitógeno Con A; 3 animales muestran una producción de IFN- γ muy baja inclusive en presencia de Con A (animales con asterisco) en relación a la producción de IFN- γ de un animal sano, que muestra un valor de absorbancia mayor a 2 en presencia de Con A (Gráfica 7).



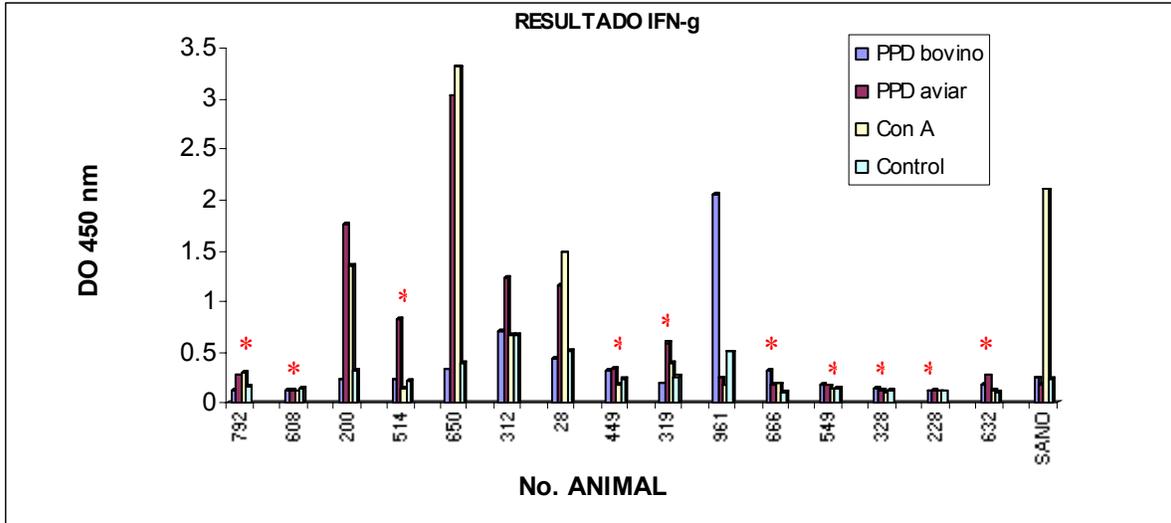
Gráfica 7. Nivel de producción de IFN- γ en cultivos de células estimulados con PPD bovino, PPD aviar, Concanavalina A y sin estimular como control

En el segundo hato con 14.85% de prevalencia se seleccionaron 4 animales positivos a ELISA más 2 que resultaron cercanos al punto de corte (Gráfica 5). Estos 6 animales habían resultado negativos a la prueba de ID. En la gráfica 8 se observa la producción de IFN- γ expresado en DO a 450 nm. Se muestra la respuesta de producción de IFN- γ en presencia de PPD bovino, PPD aviar y el mitógeno Con A, se obtiene que de los 6 animales seleccionados, 5 muestran un producción de IFN- γ muy baja en relación a un animal sano que muestra un valor de absorbancia cercano a 2 en presencia de Con A (Gráfica 8).



Gráfica 8. Nivel de producción de IFN- γ en cultivos de células estimulados con PPD bovino, PPD aviar, Concanavalina A y sin estimular como control.

En el tercer hato con 34.16% de prevalencia se seleccionaron solamente a 15 animales positivos a ELISA que mostraron los valores más altos de títulos de anticuerpos contra *M. bovis* por arriba del valor de corte (Gráfica 6). Debido a que inicialmente se habían considerado los valores de corte por cada población, y posteriormente se tuvo que ajustar a un solo valor de corte, 23 animales no fueron considerados para este estudio. De los 15 animales con mas altos títulos de anticuerpos, fueron negativos a la prueba de ID. En la gráfica 9 se observa la producción de IFN- γ expresado en DO a 450 nm. Se muestra la respuesta de producción de IFN- γ en presencia de PPD bovino, PPD aviar y el mitógeno Con A y el resultado es que de los 15 animales seleccionados, 11 muestran una producción de IFN- γ muy baja en relación a un animal sano que muestra una absorbancia mayor a 2 en presencia de Con A.



Gráfica 9. Nivel de producción de IFN- γ en cultivos de células estimulados con PPD bovino, PPD aviar, Concanavalina A y sin estimular como Control

7. DISCUSIÓN

El diagnóstico de la TB obtenido por la prueba de ID, por si sola no es completamente eficiente para el control y la erradicación de la enfermedad en bovinos (84), sin embargo, el empleo de esta prueba es la mas difundida a nivel mundial para el diagnostico de la enfermedad a pesar de que su sensibilidad y especificidad son bajas, siendo del 70% y 60% respectivamente (7, 80), además de que esta prueba se ve afectada por otros factores; una inoculación de tuberculina reduce significativamente la capacidad del ganado a responder a una segunda prueba intradérmica 7 días después; también se ve afectada por un estado de inmunosupresión fisiológica en el periodo de periparto, tratamiento con corticosteroides, así como la presencia de enfermedades inmunosupresoras (3, 85).

Muchos factores influyen en la detección y eliminación de animales infectados con *M. bovis*, como pueden ser el tamaño del hato, anergia a las pruebas, sensibilidad de las pruebas, etc. El proceso de probar un gran número de animales conlleva a errores de manejo durante la prueba; estos errores disminuyen la sensibilidad de la misma. La sensibilidad de la prueba de tuberculina varía por el sitio de inyección, la habilidad de la persona que la aplica y factores del sistema inmune, así como otras características de la población de animales. El ganado anérgico puede no responder a cualquier variación de la prueba de tuberculina (18).

Dentro de los mecanismos establecidos a nivel celular, el estado de anergia en tuberculosis, ha sido referida como la ausencia de la respuesta celular y esto provoca una disminuida o falta de reactividad a una prueba de hipersensibilidad tardía como la prueba intradérmica o el caso de la prueba de IFN- γ . La disminuida reactividad hacia estas pruebas puede asociarse a una infección avanzada, dentro de la cual se disminuye la capacidad de los linfocitos T de secretar citocinas cuando sus receptores celulares actúan recíprocamente con un antígeno específico (56).

Existen otros factores que pueden interferir en el diagnóstico de la TB así como en la determinación de animales anérgicos. Es conocida la existencia durante la preñez de inmunodepresión e inmunosupresión inespecífica (linfocitos T y B). Los linfocitos T son los más afectados durante la gestación con un incremento importante de los linfocitos T supresores, que controlan a los linfocitos T cooperadores. Esta inmunosupresión es generada por la alta concentración de progesterona normal en la etapa de gestación terminal, y agravada en el período periparto por la alta concentración de corticoides tanto fetales como maternos. La progesterona inhibe la proliferación de algunas subclases de linfocitos T a través de otros inmunomoduladores. Además, el estrés metabólico de preñez, parto y lactación pueden contribuir a la supresión del sistema inmune.

Por otro lado, el aspecto nutricional del animal es importante, ya que un déficit de cobre, zinc, selenio y vitamina E pueden provocar una supresión de la inmunidad e interferir con el diagnóstico de TB por medio de la prueba intradérmica.

La determinación oportuna de animales anérgicos en hatos con prevalencias bajas, es un elemento importante para mantener el estado de prevalencia en hatos libres o con baja prevalencia; es por eso que se sugiere el empleo de mas pruebas diagnósticas complementarias a la ID, lo que ha provocado que se desarrollen otras técnicas, como la prueba de IFN- γ , que se caracteriza por tener mayor sensibilidad y especificidad en relación a la ID. Se ha observado que en hatos con brotes de TB, la prueba de IFN- γ detecta animales infectados más temprano que la prueba intradérmica (80, 86), así como debido a su alta sensibilidad, animales negativos a la prueba de ID pueden ser detectados por esta prueba de IFN- γ (87, 88).

En la práctica clínica, la ausencia de respuesta de la hipersensibilidad tardía a antígenos específicos micobacterianos, es un claro indicio de una función deficiente de células T. Animales anérgicos que están infectados con *M. bovis*, frecuentemente no responden a la prueba de tuberculina. Una solución para la eliminación de estos animales anérgicos puede ser el uso de la prueba de ELISA

en conjunción con la prueba de tuberculina. (18). Esta prueba *in vitro* es la detección de IgG anti-micobacteria circulante, y permite determinar niveles de anticuerpos específicos y que no responden a la prueba de ID, donde se establecen valores de corte según la prevalencia de los hatos (83). Se ha observado una correlación de altos títulos de anticuerpos con la presencia de lesiones tuberculosas (6, 57). Esta prueba tiene diferentes ventajas, como el estudio de muchas muestras en un tiempo relativamente corto, permite el estudio en diferentes fluidos y se considera de bajo costo (60). Cuenta con una sensibilidad hasta del 60% y una especificidad de 93% (76, 77).

La prueba de ELISA ha demostrado ser una de las pruebas más específicas para el diagnóstico de la TB, aún empleando un antígeno como el PPD bovino (89, 90). En este trabajo se empleó para esta prueba el EPFC de *M. bovis*, la especificidad de la respuesta inmune humoral de los animales hacia *M. bovis*, se confirmó comparando su respuesta hacia antígenos de *M. avium*. Los EPFC's empleados para ELISA, preparados a partir de *M. bovis* y de *M. avium*, han sido comúnmente utilizados para medir la inmunidad humoral de la TB (91). Algunos autores han propuesto la implementación del ELISA en zonas de prevalencia alta, para realizar un barrido epidemiológico y al mismo tiempo, para identificar animales con tuberculosis diseminada, (28) ya que se pueden determinar de manera diferencial anticuerpos contra *M. bovis* y contra antígenos del complejo *M. avium*.

En el primer hato en estudio, se observaron 6 animales con altos títulos de anticuerpos que previamente habían resultado negativos a la prueba de tuberculina (Gráfica 4); cuando células T de estos animales se evaluaron bajo condiciones *in vitro* en presencia de PPD bovino, PPD aviar, Con A así como el control, 3 de estos 11 animales resultaron ser anérgicos al mostrar una baja producción de IFN- γ , inclusive en presencia de Con A, que en un animal sano, induce una mitosis en los linfocitos, mostrando así una alta producción de IFN- γ (69). Así mismo, 8 de estos 11 animales mostraron una buena producción de IFN- γ y posiblemente por que se encontraban en un estado previo a la anergia parcial.

En este mismo grupo, un animal montó una respuesta predominante a *M. avium*, lo cual sugiere una infección por micobacterias atípicas (Gráfica 7) (92).

Dentro del hato con prevalencia de 14.85% se observaron 6 animales con altos títulos de anticuerpos (Gráfica 5) y al ser evaluados mediante la prueba de IFN- γ , 5 de estos 6 animales resultaron anérgicos (Gráfica 8) y a su vez, estos mostraron variaciones en el control sin estimular.

En el hato con prevalencia del 34.16% se pudo observar con mayor claridad el efecto de inmunosupresión, ya que de 322 animales evaluados por ELISA, (Gráfica 6), 15 animales fueron evaluados en presencia de los antígenos específicos bajo condiciones *in vitro*, la baja producción de IFN- γ fue muy evidente, ya que 11 animales se encontraron anérgicos (Gráfica 9).

Sería importante confirmar este estado de anergia cuando estos animales sean enviados a rastro por simple desecho o por improductivos mediante la presencia de lesiones características de TB así como el análisis bacteriológico e histopatológico.

Para efectos de la campaña, la única prueba autorizada para el diagnóstico de TB es la prueba de tuberculina; sin embargo se sabe que su sensibilidad y especificidad pueden verse afectadas por factores fisiológicos, inmunológicos y de manejo como ya se ha discutido; es por eso que el empleo de pruebas complementarias de diagnóstico como ELISA e IFN- γ pueden ser una herramienta importante para el control de la TB (Figura 5), actuando como complemento a otras medidas sanitarias de manejo, principalmente en ganado especializado a la producción lechera que es donde se registran las prevalencias más altas de TB en el país.

DIAGNÓSTICO DE TB

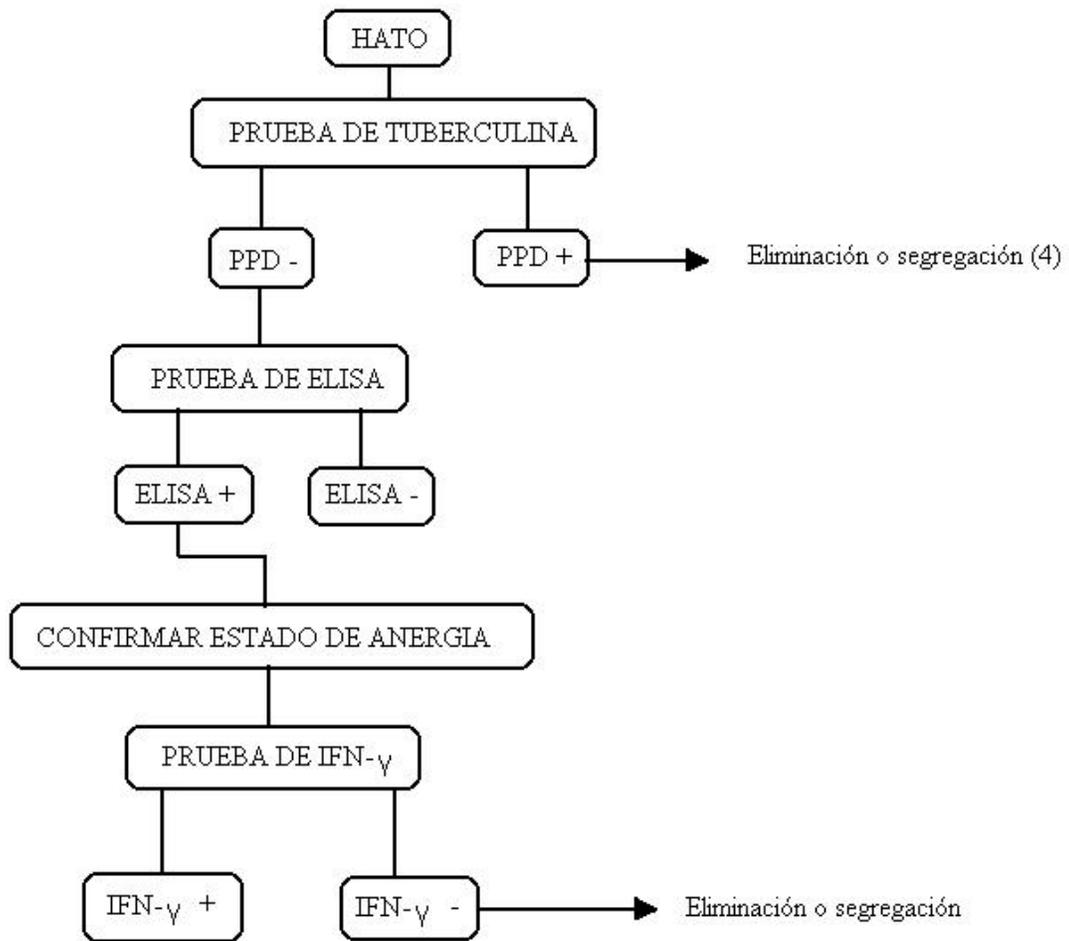


Figura 5. Propuesta de diagnóstico de tuberculosis para detectar animales anérgicos.

8. CONCLUSIONES

- El empleo de pruebas complementarias a la prueba de intradermorreacción es necesario durante las actividades propias de una campaña, así como para realizar estudios epidemiológicos en países donde la TB es endémica.
- La principal ventaja del ELISA es que identifica animales infectados no reactivos a la tuberculina e IFN- γ . Sin embargo, debido a su baja sensibilidad ($60\% \pm 10$), no identifica a todos los animales infectados, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TB.
- En hatos donde las prevalencias son bajas, es muy importante identificar animales anérgicos con la finalidad de eliminar fuentes potenciales de diseminación de la enfermedad y mantener un status inmune de hato para prevenir un brote, donde mediante los lineamientos que la campaña contra la TB establece ya se había logrado controlar la enfermedad a lo largo del tiempo.
- Es importante también tener un control adecuado de registros reproductivos y aunado al uso de pruebas complementarias de diagnóstico se podrá determinar con mayor certeza si la anergia tiene un origen fisiológico y es transitoria o bien si es ocasionada por algún otro proceso infeccioso.
- El uso de lectinas, como la Con A mediante la prueba de IFN- γ también podría ser una herramienta importante para hacer un diagnóstico confirmatorio de animales que se sospecha que son anérgicos.

9. ANEXO 1 DE REACTIVOS

Solución de Pegado. Buffer de Carbonatos 0.06 M pH 9.6

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	3.8 gr/l
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	1.93 gr/l
Agua destilada	1 l

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

Fosfato disodico hidrogenado (Na_2HPO_4)	1.1 gr/l
Fosfato sodico dihidrogenado (NaH_2PO_4)	0.32 gr/l
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 gr/l
Tween 20	0.5 ml/l
Agua destilada	1 l

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

Fosfato disodico hidrogenado (Na_2HPO_4)	1.1 gr/l
Fosfato sodico dihidrogenado (NaH_2PO_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 / 100 ml
Agua destilada	1 l

Solución Revelado. Buffer citratos pH 4.5

Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	4.6 gr/l
Citrato trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	7.4 gr/l
Ortofenildiamina	4 μg /10ml
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	4 μl /10ml
Agua destilada	1 l

10. ABREVIATURAS

ADN	Acido dexosirribonucléico
APC	Células presentadoras de antígeno
CANETB	Campaña nacional de erradicación de tuberculosis bovina y brucelosis
Con A	Concanavalina A
DC	Células dendríticas
DO	Densidades ópticas
DTH	Hipersensibilidad tardía
DVB	Diarrea viral bovina
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
EPCF	Extracto proteico de filtrado de cultivo
GM-CSF	Factor de activación de colonias de glanulocitos y monocitos
ID	Prueba de intradermorreacción
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IMC	Inmunidad mediada por células
LAM	Lipoarabinomanano
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibición de migación
PBMC	Células mononucleares presentes en sangre periférica
PBS	Buffer fostatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	Derivado proteico purificado
PRONABIVE	Productora Nacional de Biológicos Veterinarios
RPMI	Completo Roswall Park Memorial Insitute
SFB	Suero Fetal bovino
TB	Tuberculosis bovina
TCR	Receptor de células T
TMB	Tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral

11. BIBLIOGRAFÍA

1. SAGAR. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis. Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis. 1998
2. 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 – 37
3. POLLOCK JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 2002. 163(2): 115 – 127
4. NOM-031-ZOO-1995 "Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina"
5. <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc468/>
6. RITTACO. V., De Kantor, I. N., Barrera, L., Errico, F: Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 50: 365 - 367. 1991
7. FIFIS 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
8. GLASSROTH, F., Clinical considerations in designing trials of vaccines for tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 30 (Supl 3): S229 – 32
9. ASHFORD E, Whitney P, Raghunathan and Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals en *Review Scienfitic et thechnique.* OIE. Editado por Board – Consejo Editorial. 2001. 20: 325 – 337
10. Organización Panamericana de la Salud. 1991 VII Reunión Interamericana de la Salud Animal a Nivel Ministerial. Estrategias y plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Américas. Washington, D. C., EUA, 30 abril – 2 mayo.
11. QUINN PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. *Clinical Veterinary Microbiology.* Wolfe. London, England 1994 156 – 169
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. Nov 1991, pp 18 – 20
13. DWIGHT CH, Yuan CZ, Veterinary Microbiology. Blackwell science, USA. 1999. 10 – 11, 158 – 164
 14. CAMPUZANO GJ. Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. 1998. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias: Patología Animal. UNAM
 15. DRAPEE P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. Res. Microbiol. 1981. 142: 420 – 422
 16. RASTOGI N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. Res. Microbiol. 1991. 142: 462 – 476
 17. AUSINA RV. Tuberculosis. Farrera Valenti, P. 13° edición. Mosby/Doyma libros, Madrid. 1995. 2367 – 2371
 18. 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
 19. FELTON MJ and Vermeulen MW, Immunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. Infect and Immun. 1996. 64: 683 – 690
 20. MURRAY, CJL; Styblo. K, Rovillon A, 1990. Tuberculosis in developing countries burden, intervention and cost. Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 65: 6 - 24
 21. LEE RE, Brennan PJ and Besra GS. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Tuberculosis. Shinnick. Springer. 1996. Cap. I. 1 – 25
 22. FENTON J, Vermeulen MW. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. Infect. and Immun. 1996.
 23. BLOOM, B. R., 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
 24. 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*. Vet. Micro. 1977; 2:261 – 265
25. WOOD PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of γ -interferon. Res. Vet. Sci. 1990; 49: 46 – 49
 26. BAROJA ML, Ceuppens JL. More exact quantification of interleukin-2 production by addition of anti-Tac monoclonal antibody to cultures of stimulated lymphocytes. J. Immunol. Meth. 1987; 98: 267 – 270
 27. WOOD PR, Jones SL. BOVIGAM™: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis 2001, 81: 147 – 155
 28. PLACKETT, P., An ELISA for detection of anergic tuberculosis cattle. Aus Vet J. 66. 1 1989
 29. PADILLA U., Jesús, Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en bovinos inmunizados con proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis*, inmunomodulados con interferón gamma y BCG contra la Tuberculosis Bovina., Tesis Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2004
 30. WARDS BJ, Collins DM, del Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 1995; 43 : 227 – 240
 31. BORUN M, Sajduda A, Pawłowska I, McFadden JJ, Dziadek J. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using insertion sequences IS6110 and IS990. Tuberculosis. 2001 81(4): 271 - 278
 32. FUENTES XA, Castineiras MJ, Queraltó JM. Bioquímica y patología molecular. 2ª. Edición. Editorial Reverte, Vol. 1, 1998.
 33. COUSINS DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1992, 30: 255 – 258
 34. PRAT AC, Domínguez BJ, Ausina RV. *Mycobacterium bovis*. 2001. 1 – 7
 35. <http://www.monografias.com/trabajos11/tubo/tubo.shtml>
 36. PAYEUR JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper, LA, Martin BM. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and

- identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories. USDA 1993
37. STENGER S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Curr. Opin. Microbiol. 1999. (2): 89 – 93
 38. MOSMANN TR & Coffman RL. Th1 and Th2 cell: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 1989. 7: 145 – 173
 39. RAMACHANDRA L, Chu R, Askew D, Noss EH, et al. Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. Immunol Rev 1999; 168:217-239.
 40. COOPER AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russell DG, Orme IM, Disseminated tuberculosis in Interferon-gamma gene disrupted mice. J. Exp. Med. 1993; 178: 2243-2248.
 41. MUNK ME, Gatrill B, Schoel H, Gulle K, Pfeffer H, Wagner and Kaufmann SE. Immunity to micobacteria: possible role of alpha / beta and gamma / delta T lymphocytes. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 1990. 98 669 – 673
 42. KENNEDY H.E. Welsh M.D, Bryson D. et al. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1⁺ $\gamma\delta$ T Cell. Infect. and Immun. 2002. 70:1488-1500.
 43. CARDING, S.R. Role of gamma delta T cells in immunity to infections diseases and the regulation development. Immunol. Res. 1998. 17, 13-22.
 44. COTRAN R, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcional. 6^o edición. McGraw – Hill Interamericana Madrid. 2000. 370 – 373
 45. MORAN LE, Lazo AY. Tuberculosis. Inst. Sup. De Cien. Med. De la Habana. Rev. Cubana Estomatolo. 2001. 38 (1): 33 – 51
 46. SERBINA NV, Liu CC, Scanga CA,. CD8⁺ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin *in vivo* and lyse infected macrophages. J. Immunol. 2000;165,353-363.
 47. LIEBANA E, Aranaz A, Aldwell FE, Fair J, Nelly SD, Smyth AJ & Pollock JM. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active micobacteria

- from infected macrophages by antigen – stimulated T cells. Immunology 2000. 99:23 – 29
48. SANTANA GJ. Atlas de patología. La Habana: Científico – Técnica. 1985. 131 – 133
49. LECHLER, Robert, Jian – Guo Chai, Federica Marelli – Berg and Giovanna Lombardi, T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance, The royal society, 2001, pp 625 – 637
50. JENKINS MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen – specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J. Exp. Med. 1987. 165 – 302
51. MUELLER DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. Annu. Rev. Immunol. 1989. 445
52. ABBAS, Abul K, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, Inmunología Celular y Molecular, 4º edición, McGraw - Hill Interamericana, 2002, Madrid, España. pp 221 - 226
53. REGUEIRO, José R., López Larrea Carlos, Inmunología. Biología y patología del sistema inmune, 2ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, España 1996, 61-67
54. GARCIA C. E., Figueroa S., Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2001; 14(2) 114 – 128
55. GARCIA CE, Figueroa S. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 2001; 14(2) 114 – 128
56. CRUSE, Julius M., Robert E. Lewis., Illustrated Dictionary of Immunology, 2º edition, CRC Press, USA 2003, pp 35
57. WOOD PD, Corner LA, Rothel JS, Fifis T. A field evaluation of serological and cellular diagnostic test bovine tuberculosis. Vet Microbiol. 1992; 31: 71
58. MACIAN, Fernando, Sin-Hyeog IM, García J. Francisco, Rao, Anjana, T-cell Anergy, 2004

59. KANG SM, Beverly B, Tran AC, Brorson K, Schwartz RH, Lenardo MJ. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science*. 1992. 257
60. PAPPATERRA, M. G., Efecto *in vitro* e *in vivo* de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E. coli* y *Propionibacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo (tesis doctoral) Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, 2002.
61. KEARNEY ER, Pape KA, Loh DY & Jenkins MK. Visualization of peptide specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994. (1): 327 – 339
62. HERNÁNDEZ DP, Martín GO, Rodríguez de Pablos VY, Ganem BFA. Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 1999. 15(2): 91 – 95
63. BORN J, Uthgenannt D, Dodt C, Nunnighoff D, Ringvol E. Cytokine production and lymphocyte subpopulation in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech Ageing Dev*. 1995. 84(2): 113 – 126
64. ITICHI S, Yamano Y, Osame M, may WW. A kinetic comparative study on lymphocyte responses to superantigen and phytohemagglutinin: reciprocal presentation of superantigen in surface of activated lymphocytes. *Cell Immunol* 1996. 173(2): 312 – 316
65. BAVEJA UK, Basack S, Thusoo TK. A study of immune profile in human hydatid diseases. *J Commun Disc* 1995. 27(2): 61 – 66
66. SEGERSON EC. Immunosuppressive activity of a porcine high molecular weight uterine macromolecule is associated with transforming growth factor beta. *J Reprod Immunol*. 1995. 29(1): 47 – 60
67. LEBREC H, Rober R, Blot C, Burlesun GR, Buhuon, Pallardy M. Immunotoxicological investigation using pharmaceutical drugs. In vitro evaluation of immune effects using rodent or human immune cells. *Toxicology* 1995. 96 (2): 147 – 156
68. LAHFA FB, Dahmani Y, Trouthad D, Deshaux D. Nutricional influences on *in vitro* splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus* (*Rodentia gerbilliadae*). *Cell Mol Biol Res* 1995. 41(5): 387 – 390

69. GANEM BFA, Martín GO. Lectina concanavalina A: obtención y purificación. 2000. 24 – 28
70. BARTA O, Oyeran P. Lymphocyte transformation test in veterinary clinical immunology. *Comp Immun Microbiol Infect Dis.* 1981. 4(2): 209 – 221
71. FELSBURG PJ. Jul. Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. *Vet Clin North Am. Small Anim Practice.* 1994. 24(4): 629 – 653
72. MARGNI RA. Inmunología e inmunoquímica. 5° edición. Editorial Médica Panamericana. 1996
73. ROITT I, Brostoff J, Male D. Inmunología. Hartcourt 5a. edición, Madrid, España 1998 142, 161
74. NIMNO W. In vitro lymphocyte stimulation by Concanavalina A and with histamina as a co-mitogen in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol and Immunopathol.* 1991. 28: 67 – 80
75. MORRISON WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney PJ, Woodroffe R. Potential use of vaccination in cattle or badgers to control bovine tuberculosis. *Dev Biol (basel).* 2004. 119: 351 – 359
76. RAMÍREZ CC, Valero EG, Arriaga DC. Comparación del ELISA con la tuberculinización en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Tec. Pecu. Mex.* 1995. 33(3): 148 – 158
77. COSTELLO E, O'Reilly PF, Yearsley DK, Collins JD, Monaghan ML, Basset HF. A study of an enzyme – linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Ir. Vet. J.* 1997. 50: 35 – 38
78. HUDSON L, Hay FC. *Practical Immunology: The lymphocyte its role and function.* 2a. edición. Massachusetts USA. Blackwell Scientific Publications 1980. 29 – 33
79. NUALLÁIN EMO, Davis WC, Costello E, Pollock JM and Monaghan. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle using an immunoassay for bovine soluble interleukin-2 receptor- α (siL-2- α) produced by peripheral blood T-lymphocytes following incubation with tuberculin PPD. *Vet Immunol and Immunopath.* 1997. 56: 65 - 76
80. DOMINGO, M., Liébana E., Carrera J., Villafranca M. Eficacia comparativa de la intradermorreacción y de la prueba de liberación de interferón gamma

- para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. Med. Vet. 1995; 12 (5) 307 – 316.
81. ROTHEL, J. S., Jones S. L., Corner L. A., Cox J. C., and Wood P. R., A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- γ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust. Vet. J. 1990; (67) 134 – 137.
 82. WALRAVENS, K., Marche S, Rosseels V, *et al*, Interferon- γ diagnosis tests in context of bovine mycobacterial infections in Belgium. Vet Immunol. Immunopathol. 2002a (87) 401 – 406.
 83. DIAZ, F., Banda V., Jaramillo, L., Arriaga, C., González, D. y Estrada, C., Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. Vet. Méx. 2003; 34 (1) 13-26.
 84. POLLOCK JM, Girvin RM, Lightbody KA, Clements RA, Nelly SD, Buddle BM, Andersen P. Assessment of defined antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-reactor cattle. Vet Rec 2000;146: 659-665.
 85. DOHERTY ML, Monaghan ML, Basset HF, Quinn PJ. Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Res Vet Sci 1995; 58: 217 – 221
 86. LILENBAUM W, Schettini JC, Souza GN, Ribeiro ER, Moreira EC, Fonseca LS. Comparison between a γ -IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. J Vet Med Series B 1999; 46: 353 – 358
 87. NEILL SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TGD. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test – negative cattle. Vet Rec 1992; 131: 45 – 47
 88. NEILL SD, Cassidy J, Hanna J *et al*. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test – negative cattle with an assay for bovine interferon – gamma. Vet Rec 1994; 135: 134 – 135
 89. HANNA J, Neill SD, O'Brien JJ. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1992;31: 243-249.
 90. SILVA E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. Vet Microbiol 2001;78:111-117.

91. WOOD PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins CB, *et al.* Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J* 1990;68: 286–290.
92. AUER LA, Schleeauf SM. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1988;1:51-61.
93. DANIEL WW. Bioestadística. Base par el análisis de las ciencias de la salud. 4^a. Edición. Limusa. México, 2002. 107 – 110