



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**EVALUACION DE LA VACUNA BCG PHIPPS RECOMBINANTE  
EN BECERRAS RECIEN NACIDAS EN UN HATO CON  
PREVALENCIA ALTA EN TUBERCULOSIS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

ALBERTO ULISES ESPINOSA ALANIZ

ASESOR: M en C LAURA JARAMILLO MEZA  
COASESORES: Dr. FERNANDO DIAZ OTERO  
MVZ. RAFAEL PEREZ GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

**A CLAUDIA Y ARTURO POR  
TODOS ESTOS AÑOS EN LOS  
QUE ME HAN DADO LO MEJOR  
PARA QUE PUEDA SER UNA  
PERSONA DE BIEN, POR SU  
APOYO INCONDICIONAL EN  
TODO MOMENTO**

### **A MI ESPOSA Y A MI HIJO**

**A TALIA Y CARLOS QUE  
FUERON PARTE IMPORTANTE  
PARA REALIZAR ESTE  
TRABAJO, GRACIAS POR SU  
APOYO, SU PACIENCIA Y  
COMPRESIÓN POR LOS DIAS  
QUE NO PUDE ESTAR CON  
USTEDES PARA QUE PUDIERA  
REALIZAR ESTE TRABAJO**

**A USTEDES LES DEDICO ESTE TRABAJO QUE HICE CON MUCHO  
ESFUERZO Y DEDICACIÓN GRACIAS POR TODO**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del CENID – Microbiología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) como parte de las investigaciones de los proyectos “Evaluación de la inmunidad protectora contra la tuberculosis bovina empleando BCG y extracto proteico de filtrado de cultivo” y “Evaluación de una vacuna recombinante construida en *Mycobacterium vaccae* de la tuberculosis bovina en condiciones naturales de desafío”. Trabajo financiado con recursos de los proyectos D43244 – Z SEP – CONACYT y 12314 de SAGARPA – COFUPRO – CONACYT.

## AGRADECIMIENTO

-A la M en C Laura Jaramillo y al Dr Fernando Díaz por la confianza y apoyo que me brindaron para realizar este trabajo, por todos los consejos y la amistad que me brindaron. Gracias

-Al MVZ Rafael Pérez González por su apoyo que me brindo y las experiencias que me apporto

-A las personas que tuve el placer de conocer en el laboratorio del INIFAP Rosario, Xochitl, Cecy, Angel, Martha, Marco, Dante, Fernando Diosdado, Camila, Elvira. Gracias por todo.

-A mi jurado por su disposición, tiempo y sus comentarios acerca de este trabajo

	Página
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Generalidades de <i>Mycobacterium</i>	4
1.2 Impacto económico	5
1.3 Salud pública	6
1.4 Patología de la tuberculosis	7
1.5 Inmunidad de la tuberculosis	8
1.6 Diagnóstico de la tuberculosis bovina	12
1.6.1 Tuberculización	12
1.6.2 IFN- $\gamma$	13
1.6.3 ELISA	14
1.6.4 PCR	15
1.6.5 Bacteriología e Histopatología	16
1.7 Vacunas	17
1.7.1 BCG	17
1.7.2 BCG recombinante	19
1.7.3 Otras vacunas	20
2. Hipótesis	22
3. Objetivo general	22
4. Objetivo particular	22
5. Material y Métodos	23
5.1 Animales de experimentación	23
5.2 Diseño experimental	23
5.3 Obtención de la vacuna BCG Phipps	23
5.4 Estimulación <i>in vitro</i> de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	24
5.5 Prueba de IFN- $\gamma$	24
5.6 Prueba de Inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA	25
5.7 Prueba intradérmica doble comparativa	26
5.8 Aislamiento	26
5.9 Análisis estadístico	27
6. Resultados	28
6.1 Resultado de IFN $\gamma$	28

6.2 Resultado de ELISA	32
6.3 Resultado de la prueba de intradermorreacción	34
6.4 Resultado del aislamiento de <i>Mycobacterium bovis</i>	35
7. Discusión	36
8. Conclusiones	42
9. Anexo 1 soluciones	43
10. Bibliografía	45

## Índice de abreviaturas

BAAR – Bacilo ácido alcohol resistente  
BCG – Bacilo Calmette Guerin  
CD – Grupo de diferenciación  
CFPE – Extracto proteico de filtrado de cultivo  
CFP – Filtrado proteico de cultivo  
DO – Densidades ópticas  
DS – Desviación estándar  
ELISA – Inmuno ensayo ligado a enzimas  
ESAT-6 – Antígeno de secreción temprana  
HSP – Proteína de choque térmico  
ID – Intradermoreacción  
IgG – Inmunoglobulina G  
IFN- $\gamma$  – Interferón gamma  
IL – Interleucina  
LAM – Lipoarabinomananos  
MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad  
NO – Óxido nítrico  
NK – Células asesinas naturales  
ODN – Oligodeoxynucleotidos  
OMS – Organización Mundial de la Salud  
PCR – Reacción en cadena de la polimerasa  
PPD – Derivado proteico purificado  
RCT – Receptor de células T  
TB – Tuberculosis  
Th1 – Linfocito cooperador 1  
TNF- $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral alpha  
UFC – Unidades formadoras de colonias  
VIH – Virus de inmunodeficiencia humana  
WC1 – Grupo de diferenciación linfocitaria

## RESUMEN

*Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis (TB) bovina; en los últimos años la incidencia de la enfermedad ha ido incrementándose alrededor del mundo, debido a ello es necesario la aplicación de estrategias más efectivas de control. Esto involucraría la aceptación de un programa de vacunación, conjuntamente con el establecimiento de pruebas de diagnóstico que permitan diferenciar animales vacunados de infectados. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de la vacuna BCG Phipps recombinante para la prevención de la tuberculosis bovina en becerras de 6-30 días de edad en una explotación lechera con 50% de prevalencia de la enfermedad, que contaba en el momento de realizar el estudio con 365 becerras de diferentes edades de la raza Holstein-Friesian, empleándose para este estudio solo 20 becerras negativas a la enfermedad, que se dividieron en 2 grupos. Aunque prácticamente el total de becerras de la explotación fueron inoculadas con diferentes inmunógenos para la prevención de la enfermedad, dentro de ellos el extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE) de *Mycobacterium bovis*, la vacuna recombinante BCG cepa Phipps y una recombinante de *Mycobacterium vaccae*, ambas con el gen inserto de la proteína PstS-1 de 38 kDa, involucrada en la incorporación de fósforo inorgánico por la micobacteria. Solo se dio seguimiento de la cinética de la respuesta inmune inducida por la vacuna BCG cepa Phipps en 10 becerras vacunadas con  $10^4$  UFC de la recombinante de BCG y 10 becerras permanecieron como control sin vacunar. Se obtuvieron muestras de sangre de los animales durante el primer mes cada quince días y posteriormente cada mes durante seis meses, para evaluar la respuesta inmune celular mediante la producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre completa empleando los antígenos PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6 (Bovigam Test CSL), y determinar los niveles de anticuerpos mediante una ELISA comparativa empleando el CFPE de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium avium*. Durante los diferentes muestreos se tomaron muestras de exudado nasal para intentar el aislamiento de *M. bovis* empleando el medio de cultivo Stonebrink. A los 20 animales se les aplicó la prueba de tuberculina simple y doble comparativa a los 9 y 11 meses. Los resultados de producción de IFN- $\gamma$  muestran incrementos de la citocina en diferentes periodos de tiempo para el grupo vacunado en los cultivos estimulados con PPD bovino, los cuales fueron significativos a los 120 y 150 días post vacunación 1.1 y 1.7 DO, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Mientras que en el grupo control se observó solo un incremento significativo de IFN- $\gamma$  con este antígeno a los 90 días. Con el PPD aviar los

dos grupos mostraron un aumento importante pero no significativo de la citocina a los 60 días. En presencia de ESAT-6 se observó una respuesta transitoria en ambos grupos. Con respecto a la respuesta humoral, esta fue heterogénea para ambos grupos sin llegar a ser significativa en los primeros meses para los antígenos de *M. bovis*, no obstante hubo un incremento significativo para el grupo vacunado a los 150 días, en tanto que, el grupo control tuvo un valor significativo a los 180 días. Los resultados de tuberculinización en el grupo de BCG señalan que ningún animal fue reactor en la primera, y solo un animal resultó sospechoso en la segunda tuberculinización. Con respecto al grupo control se obtuvieron resultados similares al grupo vacunado. Si consideramos que la reactividad es debida a una posible infección por cepas de *M. bovis* de campo, podemos inferir que al momento de las evaluaciones ninguno de los animales se encontraba infectado, lo cual se corrobora por el hecho de no haber tenido aislamientos de la micobacteria en los diferentes muestreos realizados. Los resultados de producción de IFN- $\gamma$  y niveles de anticuerpos señalan la inducción de una baja respuesta a los antígenos de *M. bovis* en los animales inmunizados en comparación con los animales sin vacunar; no obstante, durante el periodo evaluado no hubo sintomatología alguna, ni recuperación de cepas patógenas de *M. bovis* que indicara un proceso infeccioso. Los resultados obtenidos hasta ahora no muestran diferencias claras en los parámetros considerados para la evaluación de la vacuna, no obstante ninguno de los animales de ambos grupos muestra signos de infección, por lo que se contempla el seguimiento de ellos hasta la etapa productiva en la que se espera pueda existir una mejor definición de su comportamiento inmune o resistencia a la infección. Por otro lado los resultados de tuberculinización en el área de recría del establo mostraron una reducción de la incidencia de la enfermedad del 32% al 3.7%, lo que señala un beneficio del empleo de estas vacunas en la resistencia a la enfermedad en el área de recría.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis en el ser humano continua siendo una de las principales causas de infección y muerte alrededor del mundo y, aun cuando ha sido declarada una emergencia global por la Organización Mundial de la Salud (OMS) los números de casos siguen aumentando <sup>(1)</sup>. Hoy en día, la tuberculosis se ha identificado como la principal causa de muerte en individuos infectados con el virus de VIH esto es debido a la supresión del sistema inmune por ambas enfermedades VIH y tuberculosis <sup>(2)</sup>, de tal manera que la incidencia se ha incrementando rápidamente en países africanos afectados por el VIH, seguido por Europa del Este y la antigua Unión Soviética, aunado a esta situación la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos convencionales ha aumentado <sup>(3, 4)</sup>.

La pandemia de la tuberculosis continua a pesar del extenso uso de la única vacuna disponible aprobada por los programas de inmunización de la OMS contra tuberculosis humana y del seguimiento del tratamiento, para aquellos que son diagnosticados en una fase activa de la enfermedad, debido a su larga duración puede ocurrir falla o retraso en el tratamiento incrementando las posibilidades de recaída, que a menudo resulta en la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes a los fármacos <sup>(5, 6)</sup>.

Por otro lado, la tuberculosis bovina producida por *Mycobacterium bovis* guarda importancia por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que ocasiona a la industria pecuaria, debido a su carácter enzoótico. Los programas de control de la enfermedad basados en la tuberculinización y el sacrificio de los animales que salen positivos ha sido el éxito en la erradicación, o en una marcada disminución de la enfermedad en los países industrializados. Estos programas de prueba y sacrificio solo pueden ser efectivos en países, donde no hay animales de vida salvaje que actúen como reservorios de la enfermedad <sup>(7)</sup>, debido a que *M. bovis* tiene una amplia gama de hospedadores como son: Animales de vida silvestre (búfalos, rinocerontes, chitas, tejones, mapaches, etc.), ganado (bovinos, cabras, ovinos, etc.), humanos y algunos primates <sup>(8)</sup>.

En países con alta incidencia, como el nuestro, donde la eliminación de los animales tuberculosos es económica y socialmente inaceptable, la erradicación o por lo menos la

reducción de la incidencia de la enfermedad se torna imposible, por lo tanto, justificadamente la vacunación se ha considerado una buena alternativa para lograr un mejor control de la enfermedad. Los objetivos por instaurar programas de vacunación en bovinos es prevenir la enfermedad dentro de una zona, que los animales expuestos a *M. bovis* sean capaces de resistir la infección y no reaccionen a la prueba de intradermoreacción <sup>(9)</sup>. No obstante el desarrollo de pruebas que ayuden a distinguir entre animales infectados con *M. tuberculosis* o *M. bovis* y animales vacunados con BCG podría ser de gran ayuda en el diagnóstico temprano de la infección <sup>(9)</sup>.

### **1.1 Generalidades de *Mycobacterium***

Las micobacterias se consideran como formas de transición entre las eubacterias y los actinomicetos <sup>(10)</sup>. Las micobacterias son bacilos intracelulares facultativos, aerobios estrictos, no formadoras de esporas y de crecimiento lento, el crecimiento es favorecido con una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>, con un rango de temperatura de entre 30 y 42°C. La morfología característica suele ser bacilar, ligeramente curvada <sup>(11)</sup>.

La característica química más sorprendente de las micobacterias es su alto contenido en lípidos, con cantidades que oscilan entre el 20% y 40% de su peso seco <sup>(10)</sup>. La pared celular está constituida por tres capas: Capa interna, compuesta por el peptidoglicano cuya estructura es similar a la de otras bacterias. Capa media más ancha, compuesta por polisacáridos, arabinogalactano cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos de tamaño y estructura única para las micobacterias. Capa externa de grosor variable, se le atribuye una estructura glucolípida. Tienen como característica la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos <sup>(12)</sup>.

Aunque se tiñen con dificultad una vez teñidos resisten la decoloración con ácido o alcohol y por tanto se les denomina bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Puede emplearse la técnica Ziehl-Neelsen para la coloración con objeto de identificar a los bacilos ácido alcohol resistentes <sup>(13)</sup>.

Clasificación de Runyon de las micobacterias

<b>Clasificación</b>	<b>Microorganismos</b>
Complejo Tuberculosis	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microtti</i> , <i>M. canetti</i>
Fotocromógenos	<i>M. asiaticum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i>
Escotocromógenos	<i>M. flavescens</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M.</i> <i>scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i>
No cromógenas	<i>M. avium</i> complex, <i>M. celatum</i> , <i>M.</i> <i>haemophilum</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M.</i> <i>malmoense</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M.</i> <i>shimoidel</i> , <i>M. térrea</i> , <i>M. trivale</i> , <i>M.</i> <i>ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>
De crecimiento rápido	<i>M. abscessus</i> , Grupo <i>M. fortuitum</i> , Grupo <i>M. chelonae</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M.</i> <i>vaccae</i>

www.TuberculosisTextbook.com Palomino, Leao, Ritacco. Tuberculosis 2007.

## 1.2 Impacto económico

Se ha informado que alrededor del mundo más de 50 millones de cabezas de ganado están infectadas con *M. bovis* agente causal de la tuberculosis bovina <sup>(14)</sup>. En nuestro país la prevalencia a nivel nacional de la enfermedad es de 11.1% en ganado de leche y 2.9% en ganado de carne <sup>(15)</sup>.

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 <sup>(16)</sup>.

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; las pérdidas económicas a nivel mundial se calculan que sobrepasan los 3 billones de dólares anualmente <sup>(17)</sup>. En nuestro país las pérdidas económicas se calculan en más de 250 millones de pesos anualmente <sup>(15)</sup>.

### 1.3 Salud pública

*M. tuberculosis* es agente causal de la tuberculosis humana con 8 millones de casos de la enfermedad clínica y 2 millones de muertes anualmente <sup>(18)</sup>. La epidemia de VIH y la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a los fármacos han contribuido a la reaparición de la enfermedad <sup>(19)</sup>. Mientras que, se ha informado que *M. bovis* causante de la tuberculosis bovina es responsable aproximadamente de un 6% las muertes por tuberculosis, y más del 50% de casos de linfadenitis cervical en niños <sup>(20, 21)</sup>. Asimismo más del 94% de la población mundial viven en países donde no hay o es limitado el control de la tuberculosis bovina en ganado o búfalos <sup>(22)</sup>.

Aunque la transmisión a través de la leche se ha reducido considerablemente gracias a la introducción de la pasteurización y a los programas de control en países desarrollados <sup>(23)</sup>; en países como el nuestro, esto no se ha podido llevar a cabo de una manera adecuada debido al gasto económico que esto implica y las costumbres de las personas, que una gran cantidad de la leche que se consume en nuestro país no está pasteurizada, siendo esta una de las principales vías de transmisión de la enfermedad.

### 1.4 Patología de la tuberculosis

El primer paso empieza con la inhalación del bacilo y su arribo a los alvéolos pulmonares, donde son fagocitados por los macrófagos alveolares, la destrucción de la micobacteria depende principalmente de la capacidad microbicida de los fagocitos del huésped y de los factores de virulencia propia de la micobacteria ingerida. *M. bovis* es capaz de evadir la destrucción intracelular usando varios mecanismos como: El cambio de pH del endosoma, inhibición de la apoptosis y la destrucción del superóxido tóxico. La micobacteria al multiplicarse induce una respuesta proinflamatoria localizada, que favorece el reclutamiento de células inflamatorias y monocitos que se diferenciarán en macrófagos, los cuales ingerirán de nuevo a la micobacteria pero no la destruirán. De dos a tres semanas después de la infección, se desarrolla una respuesta inmune celular en la que es evidente la presencia de linfocitos T específicos que proliferan dentro de

las lesiones tempranas o granulomas, habilitarán a los macrófagos para matar a las micobacterias intracelulares. Subsecuentemente a esta fase, el crecimiento de las micobacterias se ha detenido <sup>(24)</sup>.

El tubérculo o granuloma esta formado por un centro de macrófagos infectados, rodeados de macrófagos vacuolizados y otros fagocitos mononucleares, con un manto de linfocitos en asociación con fibras de colágeno y una matriz de componentes extracelulares que delimitan la periferia de la estructura <sup>(25)</sup>. El centro sólido necrótico de la lesión inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria, como resultado la infección se detiene. La enfermedad puede progresar, y después de la infección primaria puede llevarse acabo una diseminación hematógica, meses o años después <sup>(24)</sup>. La contención de la micobacteria usualmente falla cuando el estado inmune del huésped cambia, lo cual usualmente ocurre como consecuencia de la edad, por desnutrición o coinfecciones que reducen o deterioran las funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Seguido de dichos cambios del sistema inmune, la estructura del granuloma decae provocando la ruptura y liberación de miles de bacilos viables a las vías aéreas, facilitando la diseminación a través de aerosoles que contienen el bacilo <sup>(25)</sup>.

Formación del granuloma

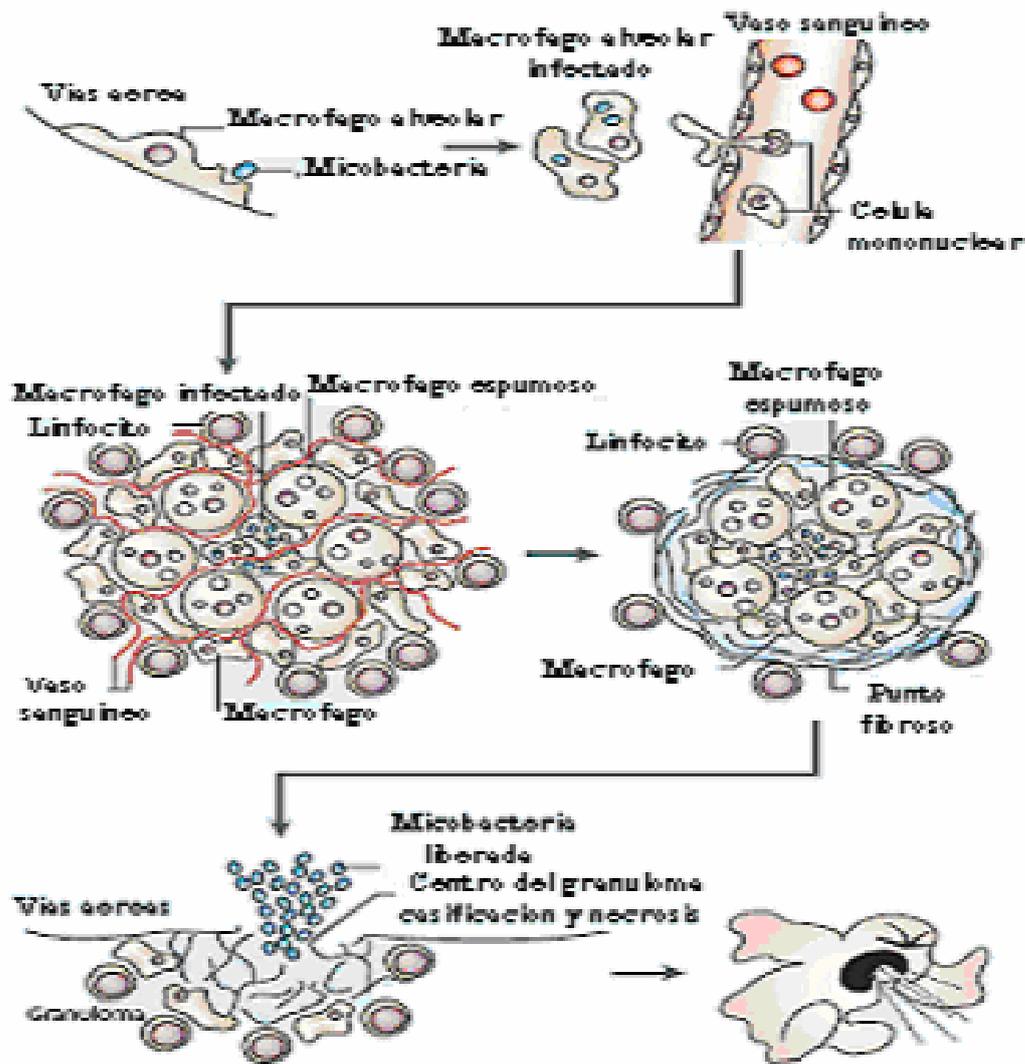


Figura 1 Quién pone el granuloma en la tuberculosis? Russell DG. Nature review. Microbiology. 5:39-47 2007.

### 1.5 Inmunidad de la tuberculosis

Dado que estos microorganismos son capaces de encontrar un nicho donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes, su eliminación precisa de mecanismos inmunitarios muy diferentes de los mecanismos de defensa frente a las bacterias extracelulares <sup>(13)</sup>. La principal respuesta inmune protectora contra bacterias intracelulares como las micobacterias es mediada por la inmunidad celular <sup>(26)</sup>, la inmunidad mediada por células consta de dos tipos de acciones: La muerte de los microorganismos fagocitados como resultado de la activación de los macrófagos por las citocinas en particular interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), derivada de los linfocitos T, y a la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> <sup>(13)</sup>. La respuesta inmunitaria

innata frente a las bacterias intracelulares depende principalmente de los fagocitos y de las células asesinas naturales (NK). Los fagocitos, inicialmente los neutrófilos y posteriormente los macrófagos ingieren e intentan destruir estos microorganismos. Las bacterias intracelulares activan a las células NK, directamente o estimulando en los macrófagos la producción de interleucina-12 (IL-12), una potente citocina activadora de las células NK <sup>(13)</sup>.

La IL-12 producida por macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, estimula específicamente la actividad de los linfocitos Th1. Estas células producen principalmente dos citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  <sup>(27)</sup>: La IL-2 es producida únicamente por células Th1, actúa de forma autocrina y paracrina sobre linfocitos T y B, células NK y macrófagos. Los receptores de IL-2 tienen cadenas alfa (CD25), beta (CD122) y gamma. Para responder a IL-2 los linfocitos T deben de ser activados antes por el antígeno e IL-12. Como se mencionó antes el IFN- $\gamma$  es producido por los linfocitos T, así como por algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK <sup>(27)</sup>. El IFN- $\gamma$  estimula la activación de los macrófagos para que produzcan diversas sustancias microbicidas, como productos reactivos de oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas. El IFN- $\gamma$  también favorece la producción de isótopos de anticuerpos que activan el complemento y opsonizan bacterias para su fagocitosis, ayudando así a las funciones efectoras de los macrófagos <sup>(13)</sup>. Otra citocina importante para el control de la enfermedad es el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es secretado por los macrófagos, las células T, B y los fibroblastos. Asimismo, actúa en forma sinérgica con el IFN- $\gamma$  para inducir la expresión de la enzima iNOS, involucrada en la producción de óxido nítrico (NO) que participa en la destrucción de *M. bovis* junto con los intermediarios de oxígeno <sup>(28)</sup>, el TNF- $\alpha$  mata a las células tumorales y produce necrosis en el centro de algunos tumores *in vivo*. Esto se debe a que estas células interpretan la unión del TNF- $\alpha$  con su receptor como una señal de apoptosis <sup>(27)</sup>. Recientemente se observó que la terapia anti-TNF- $\alpha$ , utilizada en el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, causa el desarrollo de TB diseminada como consecuencia de la reactivación de una tuberculosis latente, debido a una alteración en la formación de los granulomas existentes. Esto, indirectamente, demuestra la importancia del TNF- $\alpha$  en la formación del granuloma, que es un mecanismo de defensa para evitar la propagación de la infección y su participación en el control de la TB <sup>(28)</sup>.

Semanas después de la infección, está alcanza los ganglios linfáticos regionales, con la consiguiente activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (cooperadoras). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los dominantes en la protección, se ha visto que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) son esenciales también para el control de infecciones causadas por micobacterias. En algunos estudios se sugiere que los linfocitos CD8<sup>+</sup> contribuyen a la resolución de la infección mediante la producción de IFN- $\gamma$  y la citólisis de células infectadas <sup>(29,30)</sup>.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen un papel crítico en la defensa contra los agentes patógenos intracelulares y extracelulares que resisten a la muerte después de ser capturados por macrófagos. Estos linfocitos se activan por señales de membrana emitidas por las propias células Th1 y por el IFN- $\gamma$  secretado por ellas. Una vez activados los macrófagos pueden matar bacterias intracelulares o ingeridas. Las células Th1 producen una variedad de citocinas y moléculas de superficie que no sólo activan macrófagos infectados, sino que también matan macrófagos viejos crónicamente infectados, estimulan la producción de nuevos macrófagos en la médula ósea y reclutan macrófagos al sitio de infección <sup>(26)</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen e interactúan con células B que han unido e internalizado antígenos extraños gracias a sus inmunoglobulinas de superficie. Las moléculas que presentan el antígeno peptídico a los linfocitos T son glucoproteínas de membrana codificadas por un grupo de genes llamado complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) <sup>(31)</sup>.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos son esenciales para la defensa contra agentes patógenos que viven dentro de las células. Estos linfocitos T citotóxicos pueden eliminar cualquier célula que albergue tales patógenos, reconociendo péptidos extraños que son transportados a la superficie celular unidos a moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos llevan a cabo su función lítica liberando dos tipos de proteínas citotóxicas preformadas: Las granzimas, que son capaces de inducir apoptosis en cualquier tipo de células blanco, y la perforina que forma poros y agujeros en la célula blanco a través de los cuales entran las granzimas. El ligando FAS, una molécula unida a membrana, expresada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y por algunos CD4<sup>+</sup>, también es capaz de inducir apoptosis por unión FAS expresado en la superficie de algunas células blanco. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos también producen IFN- $\gamma$ , importante en la expresión de MHC de clase I y de la activación de los macrófagos <sup>(13)</sup>. En bovinos se ha observado que los linfocitos T

CD8<sup>+</sup> están no solo involucradas en la lisis de células específicas si no que son capaces de matar directamente a las micobacterias vía liberación de granzimas <sup>(32)</sup>.

Todos los efectos de los linfocitos T dependen de interacciones con células que contienen proteínas extrañas. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y Th1 interactúan con antígenos producidos por gérmenes patógenos que infectan a la célula blanco o han sido ingeridas por ésta <sup>(13)</sup>.

Los linfocitos que expresan el receptor  $\gamma\delta$  son un linaje distinto al de los linfocitos T que expresan  $\alpha\beta$ , que son los más numerosos. El porcentaje de linfocitos  $\gamma\delta$  varían mucho en diferentes tejidos y especies, pero en conjunto menos del 5% de los linfocitos T expresan receptores de células T (RCT)  $\gamma\delta$ . Una característica de los linfocitos T  $\gamma\delta$  es su abundancia en los tejidos epiteliales de ciertas especies; en los rumiantes constituyen hasta un 60% de la población de linfocitos T. El linfocito  $\gamma\delta$  puede lisar células infectadas por micobacterias y algunas células leucémicas. Pueden representar una primera línea de defensa contra ciertas bacterias debido a que una alta proporción reconoce proteínas de choque térmico bacterianas (HSP). Los linfocitos  $\gamma\delta$  responden de manera predominante en la reacción de linfocitos mixtos, lo cual indica que pueden reconocer antígenos del MHC extraños y también pueden ser citotóxicos <sup>(27)</sup>, esta población de linfocitos tienen un rol de protección, antiinflamatorio y de regulación <sup>(33, 34, 35, 36)</sup>.

La mayoría de las células  $\gamma\delta$  presentes en la sangre de rumiantes jóvenes expresan la molécula de diferenciación linfocitaria workshop cluster 1 (WC1), mientras que en otros tejidos como el bazo, las células  $\gamma\delta$  son WC1<sup>-</sup> <sup>(37)</sup>. En rumiantes las células T  $\gamma\delta$  se dividen en 2 subpoblaciones basada en la expresión del WC1. WC1<sup>-</sup> y WC1<sup>+</sup>. Los análisis de la expresión de genes y microarreglos sugieren que los linfocitos T  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> de ganado representan una población inflamatoria, mientras que los linfocitos T  $\gamma\delta$  WC1<sup>-</sup> son células reguladoras y comparte características con células de tipo mieloide <sup>(38,39)</sup>. Estudios en bovinos han demostrado que los linfocitos T  $\gamma\delta$  están involucrados de manera importante en infecciones con *M. bovis*. Después de la infección experimental se observó que cambia la cinética de las poblaciones de linfocitos  $\gamma\delta$  WC1<sup>+</sup> en etapas tempranas posdesafío <sup>(40)</sup>, dichos cambios están relacionados con la aparición de estas células en el desarrollo de la lesiones en etapas iniciales <sup>(41)</sup>.

## 1.6 Diagnóstico de la tuberculosis

### 1.6.1 Tuberculinización

Las pruebas de tuberculinización autorizadas por la SAGARPA y que son aplicadas por médicos veterinarios aprobados en tuberculosis bovina y/o personal oficial aprobado, son: a) Prueba en el pliegue caudal, b) Prueba cervical comparativa y c) Prueba cervical simple. Las tuberculinas autorizadas para efectos de campaña son: a) derivado proteico purificado (PPD) bovino: elaborado con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, que se utiliza en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple. b) PPD aviar: elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que se utiliza en la prueba cervical comparativa.

El procedimiento para la prueba doble comparativa se lleva a cabo de la siguiente manera: se rasura el tercio medio superior del cuello área donde se inocula la tuberculina. El sitio de aplicación superior es 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior es aproximadamente 13 cm debajo de la anterior; la prueba se efectúa aplicando intradérmicamente 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino. Previo a la inoculación, se levanta un pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procedió a medir el grosor, utilizando un vernier. El registro final de las medidas se redondea según el siguiente criterio: de 6.2 baja a 6.0, 6.3 sube a 6.5; de 6.7 baja a 6.5; de 6.8 sube a 7; debiendo registrarse los valores en los formatos para prueba cervical comparativa. El PPD aviar se inocula intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de la prueba se efectúa a las 72 h ( $\pm$  6 h), midiendo con el vernier el grosor de las reacciones, éstas fueron anotadas en el formato oficial de la prueba cervical comparativa, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda; una vez realizada la operación se procede a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección da el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial se interpretan los resultados.

Prueba cervical simple y prueba caudal simple: Estas pruebas se emplean para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*. La ventaja

de la prueba caudal simple es que no se tiene que rasurar el área ya que se hace en el pliegue ano caudal del animal.

Las reacciones se clasifican como:

Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.

Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación <sup>(42)</sup>.

### **1.6.2 Prueba de interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

Es un ensayo que permite determinar la respuesta inmune celular mediante la evaluación de IFN- $\gamma$  liberado por la estimulación *in vitro* de células sensibilizadas al antígeno tanto en cultivos de sangre completa, como en cultivo de células mononucleares separadas de sangre u otros órganos linfoides. La estimulación de cultivos de sangre empleando como antígenos el PPD bovino y el PPD aviar ha sido el método más práctico para el diagnóstico de la enfermedad en los bovinos. Se pueden emplear antígenos que ayuden a distinguir animales infectados de animales como el ESAT-6 que es un antígeno que solo se expresa en las cepas patógenas de *M. bovis* y no en las cepas vacunales de BCG. La producción de IFN- $\gamma$  inducida por el antígeno es cuantificado mediante una prueba de ensayo inmuno enzimático tipo sandwich empleando anticuerpos monoclonales. La producción de IFN- $\gamma$  correlaciona con el grado de desarrollo de la enfermedad, por lo que en animales no infectados los niveles de producción de la citocina son bajos. La especificidad de la prueba puede mejorarse mediante el uso de proteínas de secreción de la micobacteria, dichas proteínas están restringidas o sus niveles de expresión son muy diferentes entre la vacuna BCG y las cepas patógenas del complejo tuberculosis. La prueba de IFN- $\gamma$  ha demostrado ser más sensible que la tuberculinización para el diagnóstico de la enfermedad ya que puede detectar animales en estados tempranos de la infección <sup>(43)</sup>.

### **1.6.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción

enzimática cuyo producto, es un sustrato colorido puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: Es versátil, simple en su realización, económica y se consigue mediante el uso de suero.

Las cuatro fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado al enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.
2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.
4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (DO) mediante espectrofotometría <sup>(44)</sup>.

Los antígenos y proteínas de *M. bovis* más comunes que se utilizan para el diagnóstico de la tuberculosis bovina a través de ELISA son: CFP-10, ESAT-6, AcrI-MPB83, MPB59, MPB64, MPB70, MPB83, alpha-crystallin (AcrI. Rv3391), 38-kDa y filtrados de cultivo de *M. bovis* <sup>(45)</sup>.

#### **1.6.4 Reacción en cadena de la Polimerasa PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR, es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo, es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular. Tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta sensibilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar cadenas de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las cadenas de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Existen varios tipos de PCR como: PCR anidada, PCR *in situ* PCR multiplex RT-PCR y PCR tiempo real <sup>(46)</sup>.

En el caso de la tuberculosis se han utilizado como blanco para la amplificación, regiones específicas del cromosoma de microorganismos causantes de la patología, entre estas se encuentran las secuencias de inserción IS6110, IS1081, genes que codifican proteínas como MPB70 y una de 65 kDa <sup>(47, 48, 49)</sup>.

### **1.6.5 Análisis Bacteriológico e histopatológico**

Los estudios histopatológico y bacteriológico se realizan para complementar y/o confirmar el diagnóstico de la TB 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, preescapulares, 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 <sup>(42)</sup>.

Diagnóstico bacteriológico.

- 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 *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con o sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petraghani, ATS y Lowenstein Jensen <sup>(42)</sup>.

#### 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 <sup>(42)</sup>.

## 1.7 VACUNAS

Una vacuna ideal es aquella que puede ser una modificación, o una forma no patógena del agente infeccioso, que no es capaz de diseminarse como en su forma natural, pero aun así es capaz de estimular al sistema inmune. Una alternativa es usar organismos muertos como vacuna, solo que inducen una respuesta inmune de tiempo corto y no una respuesta prolongada o de larga duración <sup>(50)</sup>.

Las vacunas contra tuberculosis se pueden clasificar en cuatro categorías: Vacunas conteniendo la micobacteria viva atenuada, micobacteria muerta, vacunas compuestas de subunidades de proteínas purificadas, peptidos o polisacaridos y las vacunas de ADN. Las vacunas con la micobacteria muerta o de subunidades de proteínas combinadas con adyuvantes convencionales han mostrado que inducen una fuerte respuesta de tipo humoral y que son efectivas para estados extracelulares de la infección <sup>(51)</sup>.

### 1.7.1 Bacilo Calmette Guerin (BCG)

Albert Calmette y Camille Guérin atenuaron la cepa por un proceso al azar subcultivandola 230 veces en rebanadas de papa empapadas en bilis y glicerol por un

periodo de 13 años, hasta que quedaron convencidos de que la cepa había sido atenuada mediante la inoculación de ganado <sup>(52)</sup>. La cepa que utilizaron Calmette y Guérin deriva de una cepa virulenta de *M. bovis* aislada de una vaca con mastitis tuberculosa <sup>(53)</sup>. En humanos se administró oralmente a neonatos nacidos de madres con tuberculosis abierta con elevado riesgo de desarrollar la enfermedad, para simular una transmisión de *M. bovis* a través de la leche, y aparentemente dio una protección del 90% <sup>(54)</sup>.

Hay dos situaciones importantes acerca de la vacunación con BCG, la primera es que la eficacia de protección de la BCG varía considerablemente de una región a otra, de un 80% de protección a un 0% <sup>(55)</sup>. De hecho en algunas regiones la vacunación con BCG puede tener un efecto perjudicial sobre la protección. En segundo lugar los efectos benéficos de la vacunación se observan en los neonatos y niños contra formas no infecciosas de la enfermedad primaria como la meningitis tuberculosa y tuberculosis miliar, pero una poca o nula protección contra la infección pulmonar en la adolescencia y la etapa adulta del individuo <sup>(56)</sup>. La BCG es un arma de 2 filos, en algunas ocasiones protege, pero en otras ocasiones falla la protección o hasta predispone la activación de la enfermedad <sup>(57)</sup>. Uno de los efectos negativos del uso de una vacuna atenuada, como la BCG es que la vacunación en humanos y ganado interfiere con la prueba de intradermoreacción.

En ganado, la BCG ha sido evaluada en varios ensayos, con diferentes grados de protección contra desafíos de *M. bovis* <sup>(58,59)</sup>. La vacunación con BCG en ganado induce una reducción de la severidad de la enfermedad contra el desafío experimental, aunque la vacuna parece ser inefectiva en ensayos en campo contra la infección natural. Las bajas dosis de BCG ( $10^3$  a  $10^6$  UFC) inducen una protección <sup>(60)</sup> y dosis altas ( $10^8$  a  $10^9$  UFC) son menos efectivas. Hay evidencias que la presensibilización de los animales con micobacterias ambientales deteriora la eficacia de la BCG <sup>(61)</sup>. Aunque este efecto puede ser variable dependiendo de la cepa de la micobacteria ambiental que infecte al animal <sup>(62)</sup>.

En estudios recientes se ha demostrado que la vacunación con BCG en terneros induce niveles más altos de protección contra tuberculosis bovina que los becerros que son vacunados a los 5-6 meses de edad <sup>(63)</sup>. La revacunación de estos animales reduce los niveles de protección <sup>(64)</sup>.

Se han realizado ensayos recientes con la administración oral de BCG en becerros. La protección puede verse mejorada por esta vía de administración ya que *M. bovis* es transmitida usualmente a través de las mucosas <sup>(65)</sup>. La administración oral de la BCG disminuye la reacción a la prueba de intradermoreacción. En humanos esta vía de administración inhibe la hipersensibilidad retardada al PPD <sup>(66)</sup>.

### **1.7.2 BCG recombinante**

Una vacuna recombinante es el resultado de un proceso de ingeniería genética en el cual se introduce un gen de un microorganismo infeccioso en una bacteria transformada por un plásmido introducido por electroporación, para hacer que este vehículo produzca un antígeno capaz de inducir la formación de anticuerpos protectores al ser inoculados en un individuo o especie animal. Los antígenos de la micobacteria que han mostrado ser importantes por las características de inmunodominancia han sido considerado para el desarrollo de vacunas recombinantes, dentro de ellos el antígeno de 38 kDa (PstS-1) antes conocido como antígeno 78 ó antígeno 5 de *M. tuberculosis*, identificado como uno de los principales constituyentes del sobrenadante de cultivo de esta especie micobacteriana, no obstante, se encuentra en concentración significativa en *M. bovis*. La secuencia de aminoácidos de dicha proteína posee homología con una proteína (PhoS) relacionada con la fijación y el transporte de fósforo en *Escherichia coli*, la cual se incrementa durante la disminución de fosfato en el citoplasma. El antígeno 38 kDa de la micobacteria posee diferentes epítopes capaces de inducir la proliferación de clones de células Th1 específicas y es una molécula blanco para células T CD8<sup>+</sup>. La inmunodominancia de este antígeno en las reacciones mediadas por anticuerpos y células T se basa en su localización extracelular <sup>(67)</sup>. La proteína de 38 kDa en *M. tuberculosis* es una glicoproteína activa secretada por la micobacteria <sup>(68)</sup>. Además, se ha observado que este antígeno contiene epítopes específico para linfocitos T y B reconocidos en ratones y humanos con tuberculosis <sup>(69)</sup>. Vordermeir describe el epítope Th1 más importante identificado como péptido 38 G que en humanos con tuberculosis, no induce la respuesta proliferativa de los linfocitos T <sup>(70, 71, 72)</sup>. La inmunización con este antígeno induce un incremento en la respuesta inmune celular lo cual puede ser importante para la protección contra la tuberculosis, ya que en estudios anteriores se vio una mayor producción de IFN- $\gamma$ . La aplicación de la proteína de 38 kDa en vacunas de ADN indujo una respuesta específica contra el antígeno en linfocitos T CD8<sup>+</sup>

citotóxicos los cuales desempeñan un papel importante en la protección contra la tuberculosis <sup>(73)</sup>. Este antígeno se ha visto que también es expresado por una amplia gama de micobacterias atípicas

La vacuna BCG Phipps ha sido evaluada en modelos ratón conjuntamente con otras subcepas de la BCG, en estos estudios se observó que los ratones inmunizados con la subcepa Phipps desarrollaron áreas de neumonía menos extensas que los animales vacunados con las otras subcepas 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 subcepas de BCG y el grupo control <sup>(74)</sup>. La rBCG que expresa la proteína de 38 kDa se probó en un modelo de ratón y se obtuvieron buenos resultados ya que indujo una fuerte respuesta Th1 demostrada por los altos niveles de producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , y también IgG2. La protección que obtuvieron los ratones con la vacunación ayudó a mantener niveles de protección de hasta 6 meses después del desafío con una cepa patógena <sup>(75)</sup>.

### **1.7.3 Otras vacunas**

#### **Vacunas de micobacterias muertas**

Estas vacunas tienen la ventaja de ser más seguras que las vacunas vivas atenuadas de *M. bovis*, pero tienen la desventaja de que es una respuesta más de tipo humoral ya que hay una transformación en la respuesta de los linfocitos compatible al tipo Th2 y altos niveles de anticuerpos, este tipo de respuesta inmune no es útil contra la TB <sup>(76)</sup>.

#### **Vacunas de proteínas micobacterianas**

El motivo para el empleo de vacunas a base de proteínas de la micobacteria es porque no interfiere con la prueba de intradermorreacción y la efectividad de estas vacunas no está influenciada por la presensibilización de micobacterias ambientales <sup>(62)</sup>. Aunque la protección contra la tuberculosis requiere una fuerte inducción de una respuesta inmune de tipo celular y es difícil que el ganado alcance esta respuesta con estas vacunas <sup>(77)</sup>, se ha considerado el uso de adyuvantes e inmunoestimulantes para la inducción de una respuesta inmune celular en el ganado; inmunoestimulantes que tienen una particular aplicación en estimular una respuesta tipo Th1. Son oligodeoxynucleotidos (ODN) que

contienen CpG. Los CpG pueden ser usados para mejorar la eficacia de las vacunas de proteínas de filtrados de cultivos y vacunas de ADN <sup>(78)</sup>.

Las proteínas que se han evaluado son: proteína de choque térmico 65 kDa (hsp65), antígenos ricos en prolina 36k Da, Ag 85 A, Ag85B, Ag 85 C, proteína de 38 kDa, hsp70, 36kDa, MPT64 (23 kDa), Ag856kDa <sup>(79)</sup>.

### **Vacunas de ADN**

*Mycobacterium* agente causal de la tuberculosis ha recibido especial atención en la elaboración de vacunas a base de ADN, y varias de sus proteínas han sido evaluadas como vacunas de ADN en modelos experimentales.

Las vacunas de ADN han mostrado inducir protección contra la tuberculosis mediante la estimulación de IFN- $\gamma$ , citotoxicidad y respuesta de memoria en modelos de ratones <sup>(79)</sup>. Las vacunas de ADN MPB70 y MPB83 han sido probadas recientemente en ganado, induciendo una respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y una respuesta humoral de tipo IgG1, además de que no provocan reacción a la prueba de intradermorreacción <sup>(80)</sup>. Una de las estrategias para el uso de vacunas de ADN es la aplicación de la vacuna de ADN seguida de la aplicación de un refuerzo de BCG lo cual mejora la inmunidad contra la tuberculosis bovina en el ganado comparada con la aplicación sola de cualquiera de estas dos vacunas.

## **2. HIPOTESIS**

La vacunación empleando BCG Phipps recombinante produce una inmunidad protectora y sostenida en becerras que se vacunan a edad temprana, con la ventaja de no interferir con la prueba de tuberculina. No obstante, es posible que existan diferencias en el grado de protección, lo que podrá determinarse empleando pruebas que evalúen la respuesta celular y humoral de manera periódica.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el grado de protección ofrecido por la vacuna BCG Phipps recombinante de *M. bovis* contra la tuberculosis bovina.

## **4. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.-Evaluar la respuesta inmune humoral de becerras inoculados con la cepa BCG Phipps recombinante de *M. bovis* en un hato con prevalencia alta de la enfermedad, mediante un ELISA comparativo.
- 2.-Evaluar la respuesta inmune celular mediante la producción de IFN- $\gamma$  en células estimuladas *in vitro*, en respuesta al PPD bovinos, PPD aviar, ESAT-6 y control.
- 3.-Determinar si la vacuna interfiere en las pruebas diagnósticas de tuberculinización; simple cervical y doble comparativa

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron 20 becerras de la raza Holstein-Friesian, de entre 6-30 días de edad, provenientes de dos establos de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo, estas becerras fueron parte de un grupo de 365 becerras vacunadas con diferentes inmunógenos experimentales contra la tuberculosis dentro de los cuales esta la vacuna recombinante de BCG subcepa Phipps.

### **5.2 Diseño experimental**

Los animales se evaluaron inicialmente por medio de IFN- $\gamma$  para la detección de la inmunidad mediada por células, ELISA para la detección de anticuerpos y PCR para determinar su estatus de animal libre de la enfermedad. Todos los animales incluidos en este estudio fueron negativos a las pruebas antes mencionadas. Los animales se dividieron en 2 grupos de diez animales cada uno. El grupo 1 fue vacunado con  $10^4$  UFC de *M. bovis* BCG Phipps en 1.5 ml buffer de fosfatos (PBS) estéril vía subcutánea en la tabla del cuello y el grupo 2 se dejó como grupo control, inoculando PBS como placebo. La respuesta inmune de los animales de cada grupo se evaluó cada mes durante un periodo de 6 meses mediante la evaluación de la producción de IFN- $\gamma$ , niveles de anticuerpos y la prueba de tuberculina.

### **5.3 Obtención de la vacuna BCG Phipps recombinante**

La cepa Phipps de BCG de *M. bovis*, se creció a 30° C en medio Middlebrook 7H9 (Difco). Las bacterias se cosecharon en la fase exponencial del crecimiento y se prepararon células competentes para ser transformadas con el plasmido PMV261 que contiene el gen que codifica para la proteína de 38 kDa cuya expresión esta dirigida por el promotor de choque térmico (hsp60). Las colonias recombinantes se crecieron en Middlebrook 7H9 mas kanamicina. Posteriormente, las bacterias se cosecharon a mitad de la fase exponencial de crecimiento y se ajustó a la concentración de  $10^4$  UFC/1.5 ml para la vacunación de acuerdo al protocolo y se guardaron a -70° C en PBS hasta su uso.

Estas actividades se realizaron por el equipo de la Dra. Clara Espitia Pinzón, del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, ya que en el proyecto integral, participan ambas instituciones. La parte correspondiente a este trabajo de tesis fue probar en campo la eficacia de dicha vacuna.

#### **5.4 Estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)**

Durante los diferentes muestreos se obtuvo sangre heparinizada de cada animal se distribuyó en placas de cultivo de 24 pozos a razón de 1.5 ml por pozo combinando la sangre con los diferentes antígenos; los cultivos se estimularon con 100 µl de PPD bovino, 100 µl de PPD aviar, 1µg de ESAT-6 y un pozo quedó sin estimular como control; se incubó durante 24 horas en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Posteriormente, se obtuvo el plasma de cada uno de los cultivos y se depositó en microtubos y se congelaron a -70°C hasta su evaluación. A partir de este plasma se midió la cantidad de IFN-γ producido por el estímulo antigénico; mediante un ensayo inmuno enzimático empleando un sistema comercial. \*

#### **5.5 Prueba de IFN-γ**

En una placa de 96 pozos se depositaron 50 µl de diluyente y seguido se depositaron 50 µl de cada plasma previamente descongelado, las muestras se depositaron por duplicado. De la misma forma se depositaron 50 µl de control positivo y negativo. Se incubaron a 37°C durante 1 h. durante esto se preparó la solución buffer de lavado en una solución 1:20 con agua destilada, posterior a la incubación se decantó el contenido y se realizaron 6 lavados utilizando la solución buffer de lavado de previamente preparada.

Se preparó el conjugado conforme al instructivo de uso, colocando para cada placa de 96 pozos 12 ml de diluyente por 120µl de conjugado (anticuerpo anti-IFN-γ bovino) se colocaron 100 µl en cada pozo y se incubó por 1 h. a 37°C. Se decantó el contenido y nuevamente se realizaron 6 lavados. Se preparó el cromógeno tetrametilbencidina (TMB) más la solución buffer de enzima sustrato, que se preparó colocando 12ml de

---

\* (BOVIGAM CSL Veterinary Australia)

enzima por 120µl de cromógeno para una placa de 96 pozos; se adicionaron 100 µl a cada pozo, se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos protegidos de la luz. Se agregó solución de paro (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 450 nm.

### **5.6 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Se sensibilizaron placas (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp) de 96 pozos con 5µg/ml de extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis* y *M. avium* respectivamente con solución buffer de carbonatos adicionando 100 µl por pozo; se incubaron toda la noche en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se decantó el contenido después de las 24 h y se realizaron 5 lavados con PBS/Tween 1:1000 adicionando 100 µl por pozo. Se colocaron 100 µl por pozo de solución bloqueadora (3% de leche), se incubaron por una hora y al término de la hora se lavaron 5 veces de la misma manera que la anterior y se almacenaron en bolsas de plástico a 4° C hasta su uso.

Se añadieron 20 µl de cada suero problema diluido 1:50 en solución bloqueadora a cada pozo por duplicado así como un suero control positivo y un suero control negativo y se incubó 1h. a 37° C; posteriormente se decantó el contenido y se realizaron 5 lavados. Se agregó a cada pozo 100 µl de proteína G conjugada con peroxidasa (Protein G, recombinant – peroxidase, SIGMA, No. Lot. 98H9230) diluida 1:5000 en solución bloqueadora y se incubó por 1h. a 37° C. Se decantó el contenido y se lavó 5 veces; se añadió a cada pozo 100µl de solución de revelado y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, enseguida se paró la reacción mediante la adición de 50 µl de solución de paro y se leyó en un lector de ELISA a 492 nm.

### **5.7 Prueba intradérmica doble comparativa**

La evaluación de la respuesta inmune celular *in vivo*, se realizó por medio de la respuesta tardía (hipersensibilidad tipo IV) caudal simple y doble comparativa, con la tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña, inoculando en la tabla del cuello de lado derecho, 100µl de PPD aviar (cepa D4) en la parte superior y 100µl PPD bovino (cepa AN5) en la parte inferior, de los 2 grupos de animales.

El procedimiento de la tuberculinización fue de la siguiente manera: Se rasuraron las dos áreas donde se inocularon los PPD's, con 15 cm de distancia aproximadamente entre una y otra zona, se levantó el pliegue de la piel en el centro de las áreas rasuradas y se midió el grosor de esta utilizando un vernier, registrando los valores en milímetros. La lectura de la prueba se realizó a las 72 h, midiendo nuevamente con el vernier el grosor de la piel, los valores iniciales se restaron a los valores finales para hacer la interpretación de la tuberculinización. En cuanto a la interpretación de la prueba doble comparativa, el resultado positivo a la tuberculina se define cuando la reacción al PPD bovino es mayor de 4 mm que la reacción al PPD aviar. Se considera un animal sospechoso cuando la reacción del PPD bovino es de 3-4 mm con respecto al PPD aviar. Se considera un resultado negativo cuando la reacción el PPD bovino sea negativo o, aún siendo positiva la reacción sea igual o menor que la reacción provocada por el PPD aviar.

## **5.8 Aislamiento**

El PBS estéril donde se colocó el hisopo del exudado nasal se vació en un tubo vacutainer, y se extrajo la mayor cantidad de PBS que quedaba en el hisopo haciendo presión contra las paredes del tubo, se agregó 1 ó 2 ml de Zephiran 0.5%, se homogenizó y se dejó en reposo de 15 a 60 min, se centrifugó por 3 min a 3000 RPM y se decantó el sobrenadante, se formó un precipitado en el fondo del tubo, se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml, se disuelve el precipitado y se inoculó en tubos con medio de cultivo de Stonebrink adicionado con piruvato y se incubó a 37° C durante 6 semanas.

## **5.9 Análisis estadístico**

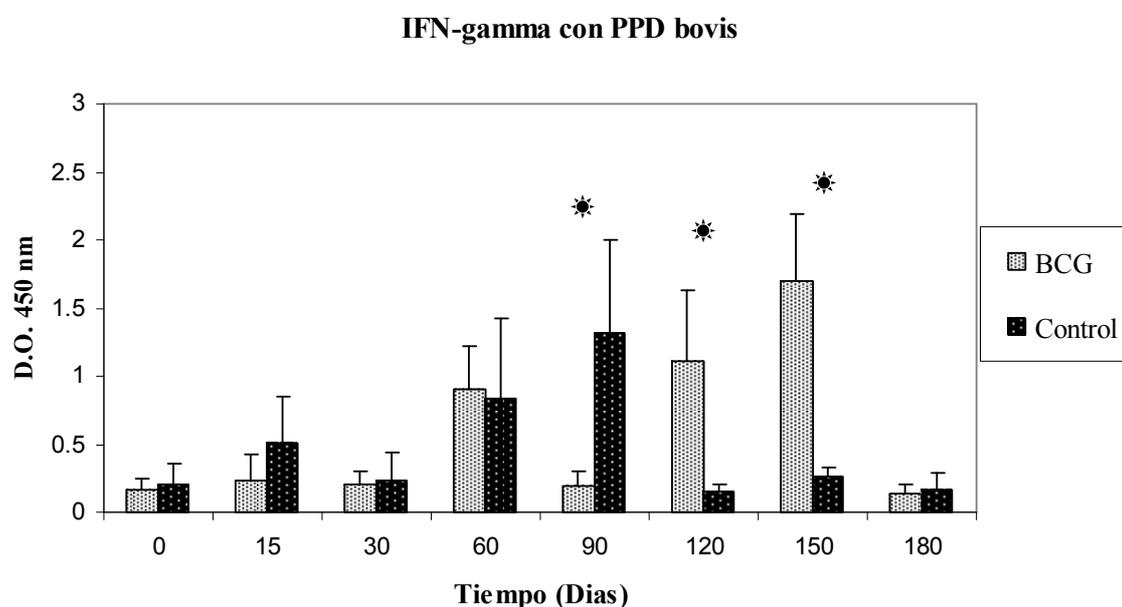
El análisis estadístico se hizo mediante una T-student independiente con el programa Sigma Plot (Jandel Scientific versión 1.02), para determinar la existencia de diferencias significativas entre los 2 grupos en cada uno de los muestreos. El valor de ( $p < 0.05$ ) fue considerando como significativo.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Resultados de la prueba de IFN- $\gamma$

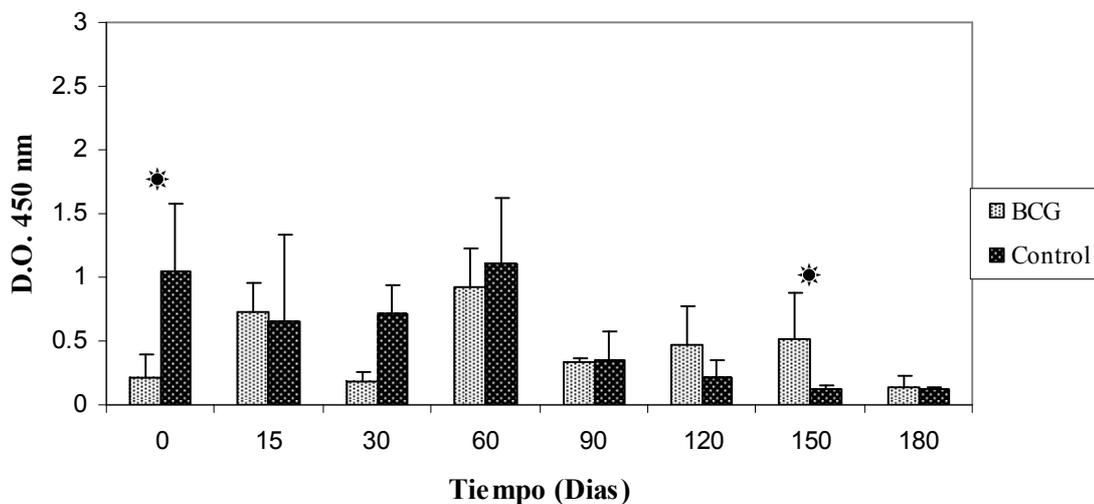
Los resultados de producción de IFN- $\gamma$  obtenidos durante el periodo evaluado en los grupos de estudio, luego de la estimulación de los cultivos de sangre heparinizada con el PPD bovino, se muestran en la gráfica 1. Al inicio del experimento ambos grupos presentaron valores similares de producción de la citocina; después de la vacunación en el primer mes de muestreo no fue apreciable un incremento importante de IFN- $\gamma$  en el grupo vacunado; no obstante, a los 60 días su producción se elevó ( $0.899 \pm 0.324$  DO,  $p > 0.05$ ), volvió a incrementarse lineal y significativamente a los 120 y 150 días alcanzando para entonces su valor pico registrado en el periodo de evaluación ( $1.702 \pm 0.483$  DO,  $p < 0.05$ ), finalmente en el último mes, hubo un descenso en su producción. En tanto que, en el grupo sin vacunar se registró un aumento significativo en los niveles de producción de IFN- $\gamma$  a los 60 y 90 días de muestreo, retornando a valores bajos al final del estudio. El valor promedio de producción de IFN- $\gamma$  obtenido para el grupo vacunado en presencia del PPD bovino, durante el periodo fue de ( $0.581 \pm 0.233$  DO,  $p > 0.05$ ); mientras que para el grupo control fue de ( $0.457 \pm 0.277$  DO).



Gráfica 1. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de IFN- $\gamma$  en densidades ópticas (DO), en el plasma obtenido de sangre estimulada *in vitro* con PPD bovino de las beceras vacunadas con BCG Phipps recombinante y las beceras no vacunadas (controles) \*Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los grupos

El seguimiento de producción de IFN- $\gamma$  registrado en los cultivos estimulados con PPD aviar se muestra en la gráfica 2, se observa que al inicio del experimento existían diferencias en los niveles de producción de la citocina para ambos grupos; el grupo control en ese momento presentó un nivel significativo de producción ( $1.041 \pm 0.537$  DO,  $p < 0.05$ ), en contraste con el que se registró para el grupo vacunado que fue de ( $0.211 \pm 0.180$  DO). El nivel de la citocina se mantuvo en valores significativos en el grupo control hasta los 60 días de muestreo, pero en los muestreos posteriores su nivel disminuye de manera progresiva. En tanto, en el grupo vacunado los niveles producción se elevó a los 15 días ( $0.721 \pm 0.227$  DO,  $p > 0.05$ ), disminuyen al los 30 días y se incrementan a los 60 días ( $0.919 \pm 0.300$  DO,  $p > 0.05$ ); apreciándose en los siguientes días una producción moderada de la citocina, que al final de la evaluación disminuyó. El valor promedio de producción de IFN- $\gamma$  obtenido para el grupo vacunado en presencia del PPD aviar, durante el periodo fue de ( $0.437 \pm 0.197$  DO,  $p > 0.05$ ); mientras que para el grupo control fue de ( $0.538 \pm 0.298$  DO).

### IFN-gamma PPD avium

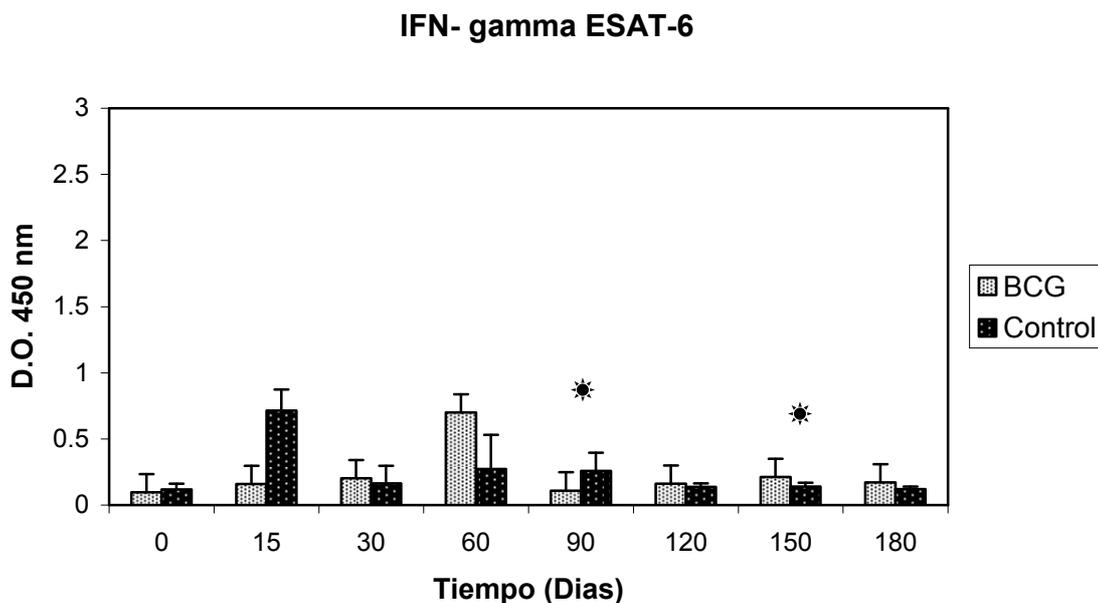


Gráfica 2. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de IFN- $\gamma$  en DO, en el plasma obtenido de sangre estimulada *in vitro* con PPD aviar de las becerras vacunadas con BCG Phipps recombinante y las becerras no vacunadas (controles) \*Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los grupos

La respuesta de producción de IFN- $\gamma$  en presencia del antígeno ESAT-6 se muestra en la gráfica 3. Al inicio del experimento la producción de la citocina en presencia del

antígeno fue baja y comparable para ambos grupos, posteriormente en el grupo sin vacunar se registró un incremento significativo a los 15 días de ( $0.713 \pm 0.160$  DO,  $p > 0.05$ ), que disminuye para el siguiente muestreo y permanece ligeramente incrementada en relación a los cultivos sin estimular para los siguientes muestreos. Mientras que, en el grupo vacunado fue apreciable un aumento de la citocina a los 60 días posvacunación ( $0.698 \pm 0.795$  DO,  $p > 0.05$ ), al igual que en el grupo control, no fue evidente una mayor producción de la citocina en presencia del ESAT-6 en los muestreos posteriores. El valor promedio de producción de IFN- $\gamma$  obtenido para el grupo vacunado en presencia del ESAT-6, durante el periodo fue de ( $0.226 \pm 0.178$  DO  $> p > 0.05$ ); mientras que para el grupo control fue de ( $0.241 \pm 0.100$  DO).

La mayor respuesta del grupo vacunado a ESAT-6 registrada a los 60 días posvacunación coincide con los incrementos observados en la producción de la citocina en la gráfica de PPD bovino y PPD aviar.

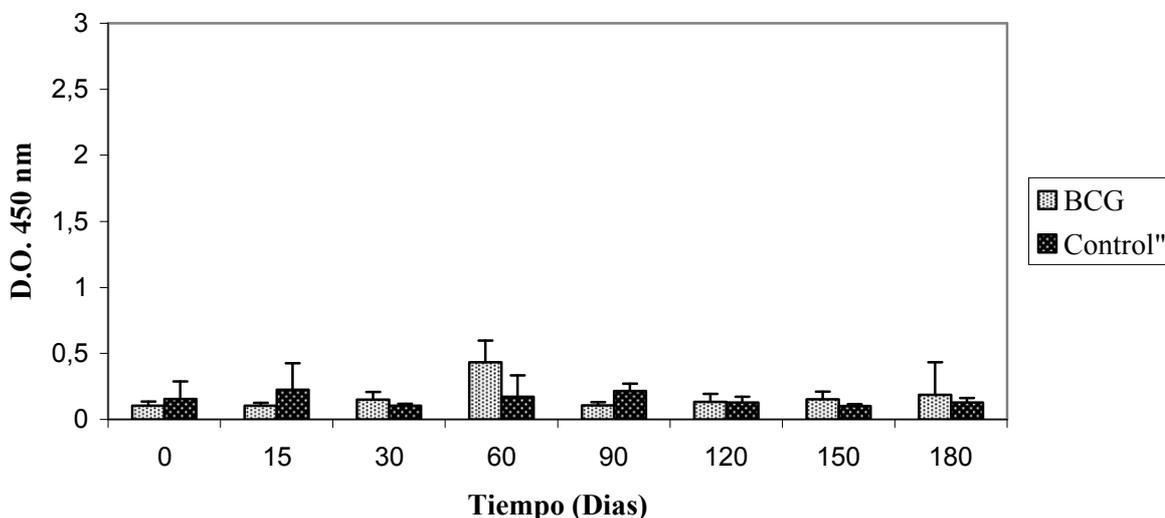


Grafica 3. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de IFN- $\gamma$  en DO, en el plasma obtenido de sangre estimulada *in vitro* con ESAT-6 de las becerras vacunadas con BCG Phipps recombinante y las becerras no vacunadas (controles) \*Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los grupos

La gráfica 4, muestra los resultados de producción de IFN- $\gamma$  registrados durante el periodo evaluado de cultivos sin estimular, no se observaron diferencias significativas

en los niveles de la citocina entre para ambos grupos. Sin embargo, el día 60 en el grupo vacunado se registró un nivel basal alto de la citocina.

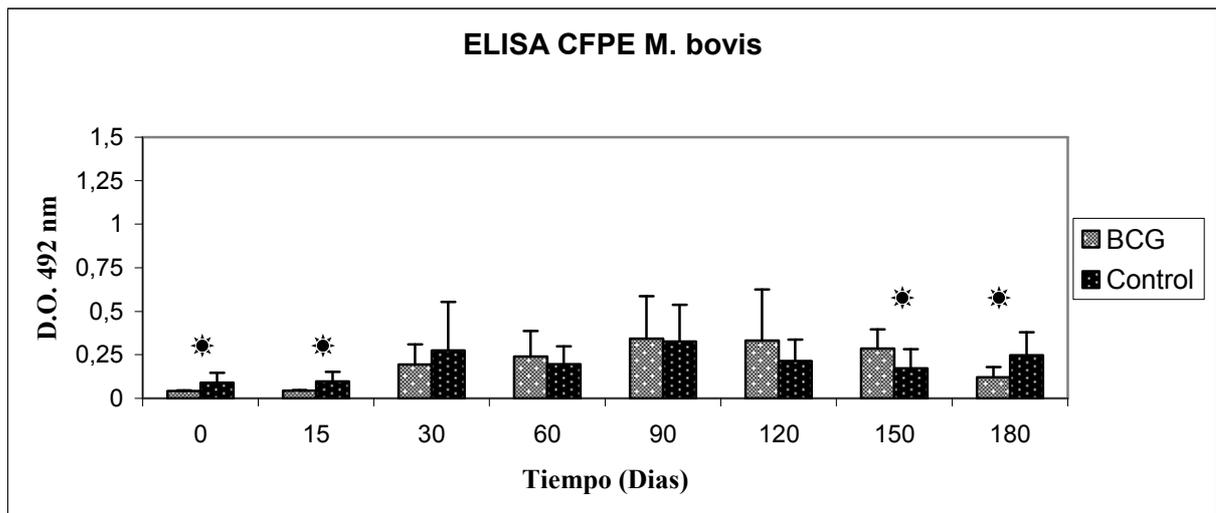
### IFN- gamma Control



Gráfica 4. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de IFN- $\gamma$  DO, en el plasma obtenido de sangre sin estimular de las becerras vacunadas con BCG Phipps recombinante y las becerras no vacunadas (controles)

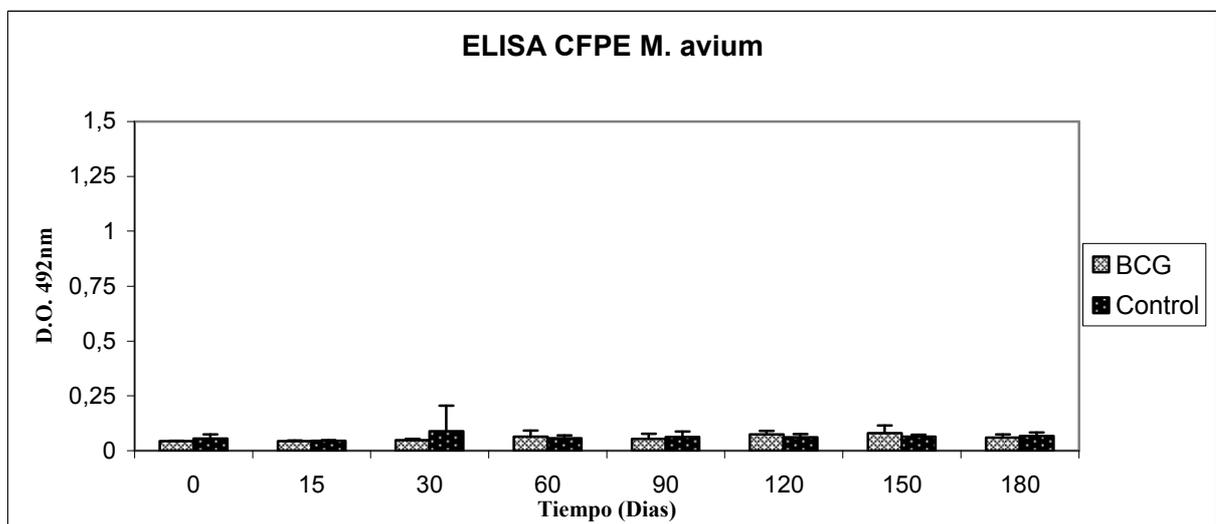
## 6.2 Resultados de la prueba de ELISA

Los resultados de producción de anticuerpos en los grupos de estudio utilizando como antígeno el CFPE de *M. bovis*, se muestran en la gráfica 5. Al inicio del experimento ambos grupos presentaron niveles similares de anticuerpos; después de la vacunación en el primer mes no fue apreciable un incremento importante de éstos en el grupo vacunado; a los 30 días se observó un aumento que se mantuvo hasta los 90 días alcanzando un nivel elevado ( $0.344 \pm 0.242$  DO,  $p > 0.05$ ), después de ese periodo, el nivel de anticuerpos disminuyó hasta alcanzar un valor de ( $0.121 \pm 0.058$  DO,  $p < 0.05$ ), en el último muestreo realizado. En tanto, en el grupo sin inmunizar se registró un aumento significativo de anticuerpos a los 30 y 90 días, en ese tiempo, se observó el nivel mas alto de anticuerpos registrado durante el experimento, que fue de ( $0.327 \pm 0.211$  DO,  $p > 0.05$ ), correspondiendo en tiempo con el valor más elevado registrado para el grupo vacunado. En los siguientes dos muestreos se observó un descenso, y finalmente en el último muestreo se registró un valor promedio mayor en este grupo que en el grupo vacunado.



Gráfica 5. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de anticuerpos (IgG) contra CFPE de *M. bovis* en DO medidos por la prueba de ELISA en bovinos vacunados con BCG Phipps recombinante y bovinos no vacunados (control) ☀ Diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los grupos

Los ensayos de ELISA realizados para determinar niveles de anticuerpos a micobacterias atípicas empleando el CFPE de *M. avium* en los grupos se muestran en la gráfica 6. Los resultados no mostraron incrementos importantes o significativos de anticuerpos durante el periodo evaluado.



Gráfica 6. Promedio  $\pm$  DS de los niveles de anticuerpos (IgG) contra CFPE de *M. avium* en DO medidos por la prueba de ELISA en bovinos vacunados con BCG Phipps recombinante y bovinos no vacunados (control)

### 6.3 Resultados de la prueba de intradermorreacción (tuberculinización)

Los resultados de la intradermorreacción (ID) se muestran en el cuadro 1, se hicieron dos pruebas una fue la simple caudal y dos meses después se hizo la doble comparativa. En el grupo vacunado hubo un animal que salió sospechoso a la prueba doble comparativa, al igual que en el grupo control donde también hubo un animal sospechoso.

**Cuadro 1. Resultados de las tuberculinizaciones**

Grupo	No. animal	1ª Tuberculinización Simple Caudal		2ª Tuberculinización Doble Comparativa			
		Lectura 72 hrs	Interpretación	Lectura inicial	Lectura 72 hrs	Diferencial	Interpretación
BCG	600	S/C	Negativo	8/6	S/C	-	Negativo
	601	S/C	Negativo	5/5	S/C	-	Negativo
	603	S/C	Negativo	9/6	S/C	-	Negativo
	606	S/C	Negativo	8/8	<b>14/17</b>	<b>3</b>	<b>Sospechoso</b>
	607	S/C	Negativo	7/5	S/C	-	Negativo
	608	S/C	Negativo	8/7	S/C	-	Negativo
	653	S/C	Negativo	6/6	S/C	-	Negativo
	654	S/C	Negativo	5/6	S/C	-	Negativo
	656	S/C	Negativo	9/6	S/C	-	Negativo
657	S/C	Negativo	9/5	S/C	-	Negativo	
Controles	573	S/C	Negativo	8/5	S/C	-	Negativo
	584	S/C	Negativo	6/5	S/C	-	Negativo
	611	S/C	Negativo	13/11	S/C	-	Negativo
	612	S/C	Negativo	7/5	S/C	-	Negativo
	613	S/C	Negativo	5/5	S/C	-	Negativo
	614	S/C	Negativo	9/5	S/C	-	Negativo
	618	S/C	Negativo	9/6	S/C	-	Negativo
	660	S/C	Negativo	7/5	<b>10/10</b>	<b>2</b>	<b>Sospechoso</b>
	620	S/C	Negativo	10/6	S/C	-	Negativo
622	S/C	Negativo	10/7	S/C	-	Negativo	

S/C sin cambios

#### **6.4 Resultados del aislamiento de *Mycobacterium bovis***

Durante todo el periodo que se evaluaron las becerras no hubo aislamiento positivos de *Mycobacterium bovis* a partir de los exudados nasales obtenidos en los diferentes muestreos.

## 7. DISCUSIÓN

La inmunidad protectora contra la tuberculosis es esencialmente de tipo celular, por lo que es deseable que las vacunas desarrolladas contra la enfermedad, sean capaces de estimular y sostener este tipo de inmunidad, en la cual, participan de manera relevante los linfocitos Th1 específicos, productores de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. El IFN- $\gamma$  liberado por estas células actúa de manera paracrina sobre los macrófagos, aumentando sus propiedades fagocíticas y bactericidas contra las micobacterias intracelulares, logrando su eliminación y con ello, el control del progreso de la enfermedad <sup>(13)</sup>.

En la evaluación de vacunas contra la tuberculosis, la cuantificación y seguimiento de la producción de esta citocina por las células T específicas, es un parámetro relevante que nos permite determinar el establecimiento de la inmunidad protectora. De acuerdo a ello, los resultados obtenidos en la cinética de evaluación del IFN- $\gamma$  en el presente estudio, señalan en promedio una aparente mayor producción de ésta en los animales del grupo vacunado con, ( $0.581 \pm 0.233$  DO,  $p > 0.05$ ) en presencia del PPD bovino, en relación al grupo de animales control ( $0.457 \pm 0.277$  DO) aunque las diferencias no son significativas, indicando con ello el establecimiento de una inmunidad de tipo celular. No obstante, se observaron variaciones importantes aunque no significativas en la producción de la citocina en ambos grupos, señalando igualmente la influencia que ejerce la exposición continua a micobacterias atípicas ambientales en la respuesta inmune de los animales o las propias cepas de campo de *M. bovis* circulantes. A pesar de esta situación, la respuesta de producción de IFN- $\gamma$  en el grupo vacunado muestra ser específica hacia los antígenos de *M. bovis* tal como lo señala su mayor producción en los cultivos de células estimulados con los antígenos del PPD bovino más que con los del PPD aviar, ( $0.581 \pm 0.233$  DO y  $0.437 \pm 0.197$  DO) respectivamente. En contraste en el grupo control la producción promedio de la citocina fue más alta en los cultivos estimulados con PPD aviar más que con el PPD bovino, ( $0.538 \pm 0.298$  DO y  $0.457 \pm 0.277$  DO) respectivamente.

Un estudio realizado por Buddle y cols. <sup>(81)</sup> con la finalidad de evaluar el efecto de la dosis de vacuna BCG en el establecimiento de resistencia a la infección bajo condiciones controladas muestran una producción similar de IFN- $\gamma$ . En el estudio

referido se mostró que el empleo de dosis mayores a  $6 \times 10^6$  a pesar de que inducen una elevada producción de IFN- $\gamma$  en animales vacunados, la respuesta al desafío fue menos eficiente considerando número y grado de lesión que la de animales vacunados con una dosis menor. Si bien, en el presente estudio no hubo un desafío experimental de los animales, si hubo una exposición natural a las cepas de campo de *M. bovis* considerando la elevada prevalencia de tuberculosis existente en el hato, y a la respuesta transitoria que presentaron varios de los animales de ambos grupos al antígeno ESAT-6. Pollock y Anderson <sup>(82)</sup>, reportan que este antígeno solo esta presente en cepas de campo de *M. bovis* y no en la cepa vacunal BCG. De igual modo, esta situación se refleja en la cinética de anticuerpos determinada para ambos grupos a los antígenos de la micobacteria, en la cual se observan variaciones significativas tipo memoria durante el periodo evaluado, mostrando con ello, la exposición continua a la que estuvieron sometidos los animales en el campo. Aunado a lo anterior, la respuesta de anticuerpos (IgG) mostró ser específica a *M. bovis* tal como lo muestra la baja respuesta observada a los antígenos de *M. avium* en los dos grupos. Buddle y cols. <sup>(81)</sup>, reportan que la vacunación en bovinos empleando dosis bajas de la vacuna BCG, muestran el desarrollo de menos anticuerpos en los animales vacunados más que un incremento de estos <sup>(58)</sup>, tal como fue observado en los primeros dos meses en el presente ensayo.

La ID con tuberculina se aplicó en ambos grupos en dos ocasiones, a los nueve y once meses después de la vacunación. En la primera tuberculinización ningún animal vacunado o del grupo control resulto positivo; mientras que en la segunda, aplicando la ID doble comparativa un animal de cada grupo resultó sospechoso, indicando con ello que al menos durante el periodo que duró el estudio ningún animal desarrollo enfermedad. Lo cual también se confirma por los resultados negativos de aislamiento de la micobacteria en los diferentes muestreos realizados a los animales. Estas observaciones además señalan que la prueba de la tuberculina no se muestra comprometida con la dosis empleada de vacuna, situación que para fines prácticos resulta conveniente y provechosa en la identificación de animales tuberculosos mediante el empleo de ésta prueba diagnóstica. Contrario a lo observado por Castillo y cols. <sup>(74)</sup> en estudios de vacunación empleando dosis más altas de vacuna BCG de  $10^6$  a  $10^8$  UFC, donde muchos de los animales mostraron reactividad a la prueba después de haber sido vacunados. Además, se observó que el grado de protección fue menor en los animales vacunados que mostraron reactividad a la ID. A este respecto, Orme y Cooper <sup>(83)</sup>

comentan que la ID y la respuesta mediada por células son fenómenos totalmente distintos mientras que la ID es mediada por quimiocinas, la resistencia a la enfermedad esta mediada por citocinas.

Estudios realizados por diferentes investigadores en modelos murinos muestran que dosis bajas de BCG ( $\leq 10^4$  UFC), inducen preferentemente una respuesta Th1 que se confirma por el aumento significativo en la producción de las citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que dosis altas de  $10^6$  a  $10^8$  UFC favorecen el desarrollo de una respuesta Th2 caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10, respuesta que no es eficaz contra el patógeno intracelular <sup>(84, 85, 86)</sup>. Sin embargo, Wedlock y cols. <sup>(87)</sup> observaron que la vacunación en bovinos induce una mezcla de respuestas Th1/Th2, y que las respuestas no van separadas como en los humanos y en los ratones, donde citocinas de una respuesta Th2 son antagonistas de las citocinas Th1. Aún no es claro como es que logran funcionar las dos respuestas en los bovinos ya que, las citocinas de una respuesta inhiben a las citocinas de la otra, hacen falta estudios sobre el comportamiento de las respuestas.

Por otro lado, después de la autorización y distribución de la vacuna BCG en humanos a nivel mundial, y antes del establecimiento del sistema lote-semilla, la vacuna fue preservada por mucho tiempo por subcultivo, produciendo posteriormente la derivación y diversificación de subcepas hijas de la vacuna original BCG. Estas cepas hijas se ha mostrado han perdido regiones genéticas que han afectado su antigenicidad y con ello su eficacia en la protección como reportan Behr <sup>(88)</sup> y Mahairas y cols. <sup>(89)</sup>. Es así que en un estudio realizado en México por Castillo y cols. <sup>(74)</sup> con el propósito de evaluar el grado de protección ofrecido por varias subcepas de la vacuna BCG en modelo ratón, mostró que al desafío empleando una cepa patógena de *M. tuberculosis*, los ratones inmunizados con las subcepas Birkhaug, Tice, Danish y Moreau, mostraron zonas amplias de neumonía y una fuerte respuesta a la ID; mientras que, las subcepas Sweden, México y Frappier aunque mostraron una reducción de las áreas de neumonía, una menor cantidad de UFC recuperada de tejidos y una moderada respuesta a la prueba de ID, su eficacia fue menor a la que se registró con la subcepa Phipps.

En la actualidad no se ha autorizado el uso de vacunas para el control de la tuberculosis en bovinos aunque se han logrado progresos importantes en la elaboración de nuevas

vacunas, hasta el momento ninguna ha sido superior a la BCG. El uso de la vacuna de la tuberculosis en animales domésticos depende entre otras circunstancias del desarrollo de pruebas de diagnóstico que permitan diferenciar animales vacunados de animales infectados, ya que como se explicó anteriormente algunas vacunas pueden inducir la respuesta de hipersensibilidad tardía, lo cual dificultaría la discriminación entre animales infectados de vacunados. Dos de las pruebas de diagnóstico más usadas para la identificación de bovinos tuberculosos están basadas en la detección de la respuesta inmune mediada por células: Hipersensibilidad retardada la cual se detecta mediante la prueba de tuberculina o ID, o la síntesis *in vitro* de IFN- $\gamma$  en cultivos de sangre completa estimulados con antígenos micobacterianos como el PPD <sup>(90)</sup>. Monaghan y cols. <sup>(91)</sup> documentan que ambas pruebas diagnósticas tienen una sensibilidad de 65 al 95% y son parcialmente efectivas en distinguir el ganado infectado del ganado sano. Hope y cols. <sup>(92)</sup> reporta que uno de los mayores factores que disminuyen la sensibilidad de ambas pruebas, es el previo contacto del ganado con micobacterias ambientales que comparten antígenos con *M. bovis* y la respuesta no específica de las células NK en animales jóvenes. Wu y cols. <sup>(93)</sup> observan que en animales neonatos, la exposición a una variedad nueva de antígenos resulta en un alto grado de activación de los linfocitos de sangre periférica. Estas células pueden desencadenar más fácilmente la liberación de IFN- $\gamma$  en respuesta a los antígenos micobacterianos o a otros antígenos de reacción cruzada. Las células que secretan altos niveles de IFN- $\gamma$  puede que no se desarrollen como células de memoria. Tal situación se demuestra en el presente estudio por las frecuentes variaciones en los niveles de IFN- $\gamma$  determinados para ambos grupos, vacunado y control, las cuales estuvieron relacionadas tanto con la exposición de los animales a las cepas de campo de *M. bovis*, como a las micobacterias atípicas ambientales de acuerdo a la respuesta de IFN- $\gamma$  observada en los cultivos estimulados con PPD aviar. En este sentido el empleo de antígenos específicos para distinguir animales infectados de vacunados ha considerado la utilidad del antígeno de secreción temprana de *M. bovis* (ESAT-6) debido a que este antígeno solo se encuentra presente en las cepas *M. bovis* y *M. tuberculosis* patógenas y no en las cepas vacunales BCG. Aunque Pollock y Anderson <sup>(82)</sup> han observado que la reactividad a este antígeno puede no estar presente en todos los animales infectados con *M. bovis*. Aunado a ello, Hope y cols. <sup>(94)</sup> muestran que la producción de esta citocina por este antígeno se encuentra afectada por la previa sensibilización del ganado a micobacterias ambientales. Buddle y cols. <sup>(95)</sup> refieren que en estados tempranos de la enfermedad existe un fuerte

reconocimiento a antígenos de masa molecular baja como el ESAT-6 y el CFP-10, mientras que en estados avanzados de la enfermedad se reconocen antígenos con distintas masas moleculares.

Es así que, los estudios experimentales de vacunación que se han realizado muestran que la efectividad y grado de protección de la vacuna BCG esta relacionada con la cepa vacunal utilizada, dosis de vacuna, edad de los animales y sensibilización de los mismos a micobacterias atípicas. La importancia del presente estudio estriba en la aplicación y evaluación de la eficacia de la vacuna BCG cepa Phipps recombinante en condiciones de campo en un hato con elevada prevalencia de la enfermedad, que de acuerdo a los parámetros inmunológicos evaluados fue capaz de inducir una respuesta inmune celular, caracterizada por una baja pero significativa producción de IFN- $\gamma$ , junto con bajos niveles de anticuerpos; lo cual es deseable que se logre en el desarrollo de resistencia contra la enfermedad mediante el empleo de vacunas. Este escenario se ha mostrado no solo en los estudios de vacunación contra tuberculosis bovina, sino también para otros patógenos intracelulares como *Leishmania major*, donde se ha reportado que la dosis de antígeno administrada es crucial para determinar el tipo de respuesta inmune inducida, dosis bajas antígeno preferentemente inducen una respuesta inmune celular, en tanto que dosis altas inducen además la producción de anticuerpos que no favorecen la resistencia la infección.

En la resistencia a la tuberculosis como en otras infecciones por microorganismos intracelulares en los bovinos, los anticuerpos del isotipo IgG2 ofrecen mayor protección que los del isotipo IgG1, ya que ofrecen mayor capacidad opsonizante, y son mejores inductores de la fijación de complemento, por tanto favorecen mayormente la eliminación de la micobacteria. La producción de anticuerpos específicos de este isotipo es favorecida primordialmente por el IFN- $\gamma$ , principal citocina involucrada en la respuesta inmune celular.

Los resultados obtenidos hasta ahora no muestran diferencias claras en los parámetros considerados para la evaluación de la vacuna, no obstante ninguno de los animales de ambos grupos muestra signos de infección, por lo que se contempla el seguimiento de ellos hasta la etapa productiva en la que se espera pueda existir una mejor definición de su comportamiento inmune o resistencia a la infección. No obstante, los resultados de

tuberculinización en el área de cría del establo mostraron una reducción de la incidencia de la enfermedad del 5.3% que se tenía antes del programa de vacunación a un 1.5% después de la vacunación, mientras que las vaquillas que entran al área de producción se tenían una incidencia del 32% y se redujo a 3.7%, lo que señala un beneficio del empleo de las vacunas en la resistencia a la enfermedad en el área de cría.

## 8. CONCLUSIONES

- 1.- La vacunación de becerros recién nacidos con la BCG recombinante indujo una respuesta inmune celular mediada por la inducción de IFN- $\gamma$ .
- 2.- La dosis de vacuna empleada no favoreció el desarrollo de una hipersensibilidad tardía, mostrando su no interferencia con el diagnóstico de animales enfermos mediante la prueba de tuberculina.
- 3.- Los resultados obtenidos no muestran diferencias claras en los parámetros considerados para la evaluación de la vacuna, ya que ninguno de los animales de ambos grupos mostró signos de infección durante el periodo evaluado.
- 4.- Es probable que en la etapa productiva de los animales pueda existir una mejor definición de la eficacia o grado de protección de la vacuna, luego de que es en esta etapa cuando los animales están expuestos a situaciones de estrés y al desafío natural de *Mycobacterium bovis*.
- 5.- Es recomendable que en estudios posteriores se contemple el desarrollo de métodos de diagnóstico específicos y sensibles, que en su momento permitan la diferenciación de animales infectados de vacunados.

## **9. ANEXO 1 SOLUCIONES**

### **SOLUCION DE FIJADO.**

Buffer de Carbonatos 0.06 M pH 9.6

Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 3.8gr/l

Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.93gr/l

Agua destilada 1l

### **SOLUCION DE LAVADO.**

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

Fosfato disodico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1gr/l

Fosfato sodico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32gr/l

Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l

Tween 20 0.5ml/l

Agua destilada 1l

### **SOLUCION BLOQUEADORA.**

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

Fosfato disodico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1gr/l

Fosfato sodico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32gr/l

Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l

Tween 20 0.5ml/l

Leche descremada en polvo 1.5 gr/100ml

Agua destilada 1l

### **SOLUCION DE REVELADO.**

Buffer citratos pH 4.5

Acido citrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) 4.6 gr/l

Citrato trisodico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 7.4 gr/l

Agua destilada 1l

Agregar al momento de su empleo:

Ortofenildiamina 4 $\mu$ g/10ml

Agua Oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 4 $\mu$ g/10 ml

## BIBLIOGRAFIA

- (1) World Health Organization. TB a global emergency. Geneva: World Health Organization, 1994.
- (2) Hopewell PC. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features management and control of tuberculosis. Clin. Infect. Dis. 1992. 15:540-547.
- (3) Raviglione MC. Tuberculosis trends in eastern Europe and former USSR. Tuberc. Lung Dis. 1994. 75:400-416.
- (4) Maher D. Tuberculosis deaths in countries with high HIV prevalence: what is their use as an indicator in tuberculosis programme monitoring and epidemiological surveillance? Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005. 9:123-127.
- (5) Sudre P, Dam T, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull. World Health Organ. 1992. 70:149-159.
- (6) Hopewell P. Evaluation of new anti-infective drugs for treatment and prevention of infections caused by *Mycobacterium avium* complex. Infectious Diseases Society America and the Food and Drug Administration. Clin. Infect. Dis. 15:296-306
- (7) Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res. Vet. Sci. 2003. 74:1-15.
- (8) O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animal and man: a review. Tubercle Lung. Dis. 1995. (Suppl 1) 1-46.
- (9) Buddle MB, Pollock MJ, Skinner AM, Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int. J. Parasitol. 2003. 33:555-566.

(10) Davis D., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H. TRATADO DE MICROBIOLOGIA 2da ed. España: Ed Salvat 1978: 869, 874.

(11) Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. MICROBIOLOGIA MÉDICA 16a ed. México D.F: Ed Manual Moderno.1999:343.

(12) [www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf)

(13) Abbas A. Lichtman, A. INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR 4ta ed. España: Ed McGraw Hill 2003: 354-360.

(14) Steele JH, Regional and country status report..In C O Thoen, Steele JH(ed). *Mycobacterium bovis* infection in animals and human. Iowa State University Press. Ames. 1995. 169-172

(15) SENASICA, SAGARPA; Dirección General de Salud Animal; Cuestionario FAO/OIE/OMS – 2002. México

(16) Krebs JR Bovine tuberculosis in cattle and badgers. Ministry Agriculture, Fisheries and Food Publications, London, United Kingdom. 1997.

(17) 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.

(18) Raviglione, MC, Zinder DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemia. JAMA 1995. 273; 220-226.

(19) Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for control of animal tuberculosis. Br. 1993. Vet. J. 149; 405-417.

(20) Cosivi O, Meslin FX, Daborn CJ, Grange JM. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. Rev. Sci. Technol. 1995.14:733-746.

(21) Hardie RM, Watson JM. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: past, present and future. *Epidemiol. Infect.* 1992. 109:23-33.

(22) Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev. Sci. Tech.* 2001. 20:71-85.

(23) Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins DV, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis* 4:59-70

(24) Crevel Rv, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* *Rev. Clin. Microbiol.* 2002. 294-309

(25) Rusell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis?. *Microbiology* 2007. 5:39-47

(26) Kaufmann S H. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today.* 1995. 16:338-342

(27) Tizard IR. *Inmunología veterinaria*. 5ta ed. Ed McGraw Hill Interamericana, México 1996.

(28) Herrera BTM, Torres RM, Juárez CE, Sada DE. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005 18:327-336

(29) De Libero G, Flesch I, Kaufmann S H. Mycobacteria-reactive Lyt-2<sup>+</sup> T cell lines. *Eur J Immunol.* 1988. 18:59-66.

(30) Mohaghehpour N, Gammon D, Kawamura L M, van Vollenhoven A, Benike C J, Engleman E G. CTL response to *Mycobacterium tuberculosis*: identification of an immunogenic epitope in the 19-kDa lipoprotein. *J Immunol.* 1998. 161:2400-2406.

(31) Jareway Ch, Travers P. *Inmunología: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2° ed, Ed. Masson. España 2003.

(32) Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, ThomasUszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, and Modlin RL. An antimicrobial activity of cytotoxic mediated by granulysin. *Science* 1998. 282: 121-125.

(33) Batoni G, Esin S, Harris RA, Kallenius G, Svenson SB, Anderson R, Campa M, Wigzell H.  $\gamma\delta$ + and CD4+  $\alpha\beta$ + human T-cell subset responses upon stimulation with various *Mycobacterium tuberculosis* soluble extract. *Clin. Exp. Immunol.* 1998. 112:52-62.

(34) D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for  $\gamma\delta$  T lymphocytes in acquired immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1997. 158:1217-1221.

(35) Kaufmann SHE, Blum C, Yamamoto S. Crosstalk between  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\delta$  T cells *in vivo*: activation of  $\alpha\beta$  T cells responses after  $\gamma\delta$  T cells with monoclonal antibody GL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993. 90:9620-9624.

(36) Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kauffmann SHE. Protective role of  $\gamma\delta$  T cells and  $\alpha\beta$  T cells in tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25:2877-2881.

(37) MacHugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR. Identification of two distinct subset of bovine  $\gamma\delta$  with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 1997. 92:340.

(38) Hedges JF, Cockrell D, Jackiw L, Meissnes N, Jutila MA. Differential mRNA expression in circulating  $\gamma\delta$  T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. *J. Leukocyte Biol.* 2003. 73:306.

(39) Meissner N, Radke J, Hedge JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abramhansen M, Jutila MA. Serial analysis of gene expression of gene expression in circulating  $\gamma\delta$  T cells subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J. Immunol.* 2003. 170:356.

(40) Pollack JM, Pollack DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, Mackie DP. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996. 87:236-241.

(41) Cassidy JP, Bryson DG, Cancela MMG, Forster F, Pollock JM, Neill SD. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesion. *J. Comp. Pathol.* 2001. 124:46-51.

(42) <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/031zoo.pdf>

(43) Kit bovigam.

(44) <http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>

(45) Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. and Vaccine Immunol* 2006. 13:387-394.

(46) [http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa)

(47) Bigi F, Espitia C, Alito A. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiol.* 1997. 143:3599-3605.

(48) Miller J, Jenny A, Rhyan J, Saari D, Suarez D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Vet Diagn Invest.* 1997. 9:244-249.

(49) Talbot E, Williams D, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 1997. 35:566-569.

(50) Brown, F. Gordon, D., VACCINE DESIGN. Ed Molecular Inglaterra: Medical Science Series 1993 24:74-75.

(51) Nossal GJV. Vaccines. In: Paul WE (Ed.) Fundamental Immunology, Lippincott-Raven, Philadelphia PA 1999. 1382-1425

(52) Guerin C. The history of BCG: early history. In: Rosenthal SR, ed. BCG vaccination against tuberculosis. London: Churchill. 1953.

(53) Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience; implication for future vaccines against tuberculosis. 1994.

(54) Weil-Hallé B, Turpin R, Premiers essais de vaccination antituberculeuse de l'enfant par le bacille Calmette-Guérin (BCG). Bull Mem Soc Med HOP Paris 1925. 14:1589.

(55) Colditz GA, Berkley CS, Mosteller F. The efficacy of bacillus Calmette-Guérin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis. Pediatrics 1995. 96:29-35.

(56) Styblo K, Meijer J. Impact of BCG vaccination programmes in children and young adults on tuberculosis problem. Tubercle 1976. 57:17-43.

(57) Springett VH, Sutherland I. A re-examination of variations in the efficacy of BCG vaccination against tuberculosis in clinical trials. Tubercle Lun Dis. 1994. 75:227-233.

(58) Buddle BM, de Lisle GW, Pfelfer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccines. 1995. 13:1123-1130.

(59) Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy R, Heslop J, de Leslie GW, Stanford JL, Aldwell FE. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. Res. Vet. Sci. 1995. 59:10-16.

(60) Skinner MA, Wedlock DN, Buddle BM. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. Rev. Sci Tech. 2001. 20:112-132.

(61) 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.

(62) Brandt L, Feino CJ, Weinreich OA, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. Infect. Immun. 2002. 70:672-678.

(63) Hope JC, Thorn ML, Villareal- Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induce protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. Clin. Exp. Immunol. 2005. 139:48-56

(64) Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LA, de Leslie GW, Skinner MA, Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduce the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. Infect. Immun. 2003. 71:6411-6419.

(65) Buddle BM, Aldwell FE, Skinner MA, de Leslie GW, Denis M, Vordermeier HM, Hewinson RG, Wedlock DN. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. Vaccine. 2005. 23:3581-3589.

(66) Holt DF, Brown RM, Belshe RB. Mucosal bacilli Calmette-Guerin vaccination of humans inhibits delayed-type hypersensitivity to purified protein derivative but induce specific interferon- $\gamma$  responses. Clin. Infect. Dis. 2000. 30:S217-222.

- (67) Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation.. Clin. Exp. Immunol 1989. 77:373-377.
- (68) Harboe M, Wiker HG. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. J Infect Dis 1992. 166:874-884.
- (69) Vordermeir HM, Harris DP, Roman, Lathigra R, Moreno C, Ivanyl J. Identification of T cell stimulatory peptides from the 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 1991. 147:1023-1029.
- (70) Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, Narayanan PR, Raja A. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38 kDa antigen in pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edin) 2001. 81:249-253.
- (71) Ramalingam B, Uma DK, Swaminathan S, Raja A. Isotype specific antibody response in childhood tuberculosis against purified 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J Trop Pediatr 2002. 48:188-199
- (72) Vordermeir HM, Harris DP, Friscia G. T cell repertoire in tuberculosis: selective energy to an immunodominant epitope of the 38 kDa antigen in patient with active disease. Eur J Immunol 1992. 22:2631-2637.
- (73) Dora PA, Fonseca J, Benaissa TB, Van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AFM. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of 38-Kilodalton protein. Infection & Immunity. 2001. 69:4839-4845.
- (74) 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.

(75) Castañon AM, Lopez VY, Espitia PC, Hernández PR. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2005. 85:115-126.

(76) Griffin JF, Mackintosh CG, Slobbe L, Thomson AJ, Buchan GS. Vaccine protocols to optimize the protective efficacy of BCG. *Tubercle Lung Dis*. 1999. 79:135-143

(77) Wedlock DN, Keen DL, McCarthy AR, Anderson P, Buddle BM. Effect of different adjuvant on the immune responses of cattle vaccinated with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2002. 86:79-88.

(78) Babiuk LA, Babiuk SL, Loehr BI, van Drunen Little van den Hurk S. Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality *Vet. Immunol. Immunopathol*. 2000. 76:1-23.

(79) Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tacson RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. 1997. 15:834-838.

(80) Vordermeier HM, Cockle PJ, Whelan AO, Rhodes S, Chambers MA, Clifford D, Huygen K, Tascon R, Lowrie D, Colston MJ, Hewinson RG. Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. *Vaccine*. 2001. 19:1246-1255.

(81) Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG *Vaccine*. 1995. 13:1123-1130.

(82) Pollock JM, Anderson P, The potential of ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect*. 1997 175:1251-1254.

(83) Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascade in immunity to tuberculosis *Immunol Today* 1999. 7:307-312

(84) Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev Immunol.* 2001. 19:93-129

(85) Hernandez PR, Orozco HA, Sampieri AL, Pavon LC, Velasquillo CJ, Larriva-Sahd J, Alcocer M, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and the pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996. 89:26-33.

(86) Power CA, Wei G, Bretscher PA, 1998. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous. Or intradermal route. *Infect. Immun.* 1998. 66:5743-5750.

(87) Wedlock ND, Denis M, Skinner MA, Koach J, de Leslie GW, Vordermeier HM, Hewinson RG, Druenen littel-van den Hurk SD, Babiuk LA, Hecher R, Buddle MB. Vaccination of cattle with a CpG Oligodeoxynucleotide- formulated mycobacterial protein vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG induces level of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. *Infect Immun.* 2005. 73 6:3540-3546

(88) Bher MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand. J. Infect. Dis.* 2001. 33:249-252

(89) Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. Bovis*. *J. Bacteriol.* 1996. 178:1274-1282.

(90) Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edin)* 2001. 81:147-155.

(91) Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet. Microbiol.* 1994 40:111-124.

(92) Hope JC, Sopp P, Howard CJ. NK-like CD8(+) cells in immunologically naïve neonatal calves that respond to dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* BCG. J Leukoc. Biol. 2002. 71:184-194.

(93) Wu CY, Kirman JR, Rotte MJ, Davey DF, Perfetto SP, Rhee EG, Freidag BL, Hill BJ, Douck DC, Seder RA. Distinct lineages of TH1 cells have differential capacities for memory cell generation *in vivo*. Nat, Immunol. 2002. 3:852-858.

(94) Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeir HM, Hewinson RG, Howard CJ. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis disease in cattle. Clin Exp Immunol. 2005. 141:432-439.

(95) Buddle BM, Parlane NA, Keen DI, Aldwell FE, Pollock MJ, Lightbody K, Andersen P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated and *M. bovis* infected cattle by using recombinant Mycobacterial antigens. Cl Diag Lab Immunol. 1999 Jan:1-5.