



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO PROTEINICO DE
FILTRADO DE CULTIVO DE *M. bovis* Y UNA VACUNA
RECOMBINANTE DE *M. vaccae* EN BECERRAS
CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
MARÍA DEL ROSARIO MARTÍNEZ CRUZ

ASESOR:

DR. FERNANDO DÍAZ OTERO

COASESORES:

M. en C. LAURA JARAMILLO MEZA

M.V.Z. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

EVALUACION DEL EXTRACTO PROTEINICO DE FILTRADO DE CULTIVO DE
M. bovis Y UNA VACUNA RECOMBINANTE DE M. vaccae EN BECERRAS
CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA


que presenta la pasante: María del Rosario Martínez Cruz
con número de cuenta: 40101267-9 para obtener el título de :
Medica Veterinaria Zootecnista

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Abril de 2008

PRESIDENTE	<u>MSC. Germán González López</u>	
VOCAL	<u>Dr. Juan Antonio Montaréz Crespo</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Rafael Pérez González</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Luis Rodolfo Vázquez Huante</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. C. Frank Díaz Ayala</u>	

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Teresita y Liborio por apoyarme todos estos años, por su infinito amor, cariño y comprensión, por ayudarme a que este momento llegara; gracias a ustedes soy lo que soy, no tengo forma para agradecerles por eso quiero dedicarles este trabajo y mi profesión con todo mi amor, respeto y admiración.

A MIS HERMANOS

Rodrigo y Rolando por su apoyo incondicional, por su compañía, tolerancia, y por sus críticas y correcciones que me hicieron ser una mejor persona.

A MI ABUELO

Raymundo, en memoria a un ser inolvidable en mi vida, por su confianza, orientación y por esas palabras de aliento y apoyo que siempre me brindó. Gracias por ser una fuente constante de motivación y por creer en mí; nunca te voy a olvidar.

A MIS TRES INOLVIDABLES AMIGOS

Indio, Zeus y Hamlet a su memoria, por darme tantas alegrías, por haber sido mis compañeros incondicionales a lo largo de mi vida, por estar conmigo cuando mas los necesite, y por haber influido positivamente en mis estudios profesiones.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por haberme dado la fortaleza para seguir adelante con mis metas y por las personas que puso en mi camino.
- A mis padres quienes han sido un sostén moral y económico para lograr este fin.
- A Violeta y Ruy, mi cuñada y sobrinito por su ayuda, tolerancia y comprensión.
- A mi gran amiga, Elena Camacho Miranda por todos los momentos inolvidables que hemos vivido, porque creyó en mi y porque siempre tuvo las palabras exactas en cada momento que las necesite; gracias por tu amistad y consejos.
- A mi asesor externo Dr. Fernando Díaz Otero, que es una de las personas a las que más admiro por su inteligencia y conocimientos, a quien le debo la realización de este proyecto, gracias por su orientación y asesoría.
- A mi asesor interno, M. V. Z. Rafael Pérez González, por su paciencia y consejos, gracias por su enseñanza y amistad.
- M. en C. Laura Jaramillo, por brindarme su ayuda y asesoría en la elaboración de esta tesis.
- M. V. Z. Fernando Diosado, por su gran apoyo para la realización del análisis estadístico.
- M. en C Dante González, por su colaboración desinteresada.
- A mis amigos del Instituto, Xochitl, Angel y en especial a mi compañero de practicas Ulises agradecimientos infinitos por su compañía y tolerancia estos años.
- A mi grupo de amigos de la universidad, en especial a Iván, Enrique y Xochitl, por brindarme su apoyo incondicional y confianza.
- A la UNAM, por permitirme ser parte de ella, gracias.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del CENID – Microbiología Animal 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 D-43244–Z SEP–CONACYT y 12314 de SAGARPA– COFUPRO–CONACYT.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Historia de la tuberculosis	4
1.2 Tuberculosis bovina (TBb) en México	5
1.3 Importancia en salud pública y económica	6
1.4 Características de las micobacterias	7
1.5 Patología de la TBb	9
1.6 Inmunidad de la TBb	10
1.6.1. Inmunidad en neonatos	12
1.7 Diagnóstico de la TBb	14
1.7.1 ID	14
1.7.2 IFN- γ	15
1.7.3 ELISA	16
1.7.4 PCR	17
2. VACUNAS	18
2.1 Vacuna de CFPE de <i>M. bovis</i>	18
2.2 Vacuna recombinante de <i>M. vaccae</i>	20
2.3 Vacuna BCG	21
2.4 Vacuna de ADN	21
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL	24
5. OBJETIVOS PARTICULARES	25

6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Obtención de CFPE <i>de M. bovis</i> AN5 para vacuna	26
6.2 Obtención de la <i>M. vaccae</i> recombinante como vacuna	26
6.3 Animales de estudio	27
6.4 Diseño experimental	27
6.5 Esquema de vacunación	27
6.6 Prueba de IFN- γ	28
6.7 Prueba de ELISA	28
6.8 Prueba de ID	29
6.9 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Resultados de FN- γ	30
7.2 Resultados de ELISA	34
7.3 Resultados de ID	36
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	41
10. ANEXO 1 REACTIVOS	42
11. ABREVIATURAS	44
12. BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

La TBb es una de las enfermedades más antiguas e importantes del ganado bovino por sus consecuencias económicas que llegan a ser de 450 millones de dólares anuales tan solo en México y de salud pública que se ha ido incrementando a lo largo de estos últimos años por la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Desgraciadamente los programas para el control de la TBb que se usan hoy en México no son completamente efectivos, lo que da lugar a la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para la erradicación de la enfermedad. La vacunación podría llegar a ser una de las herramientas más efectivas para lograr esta finalidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de protección conferido por la vacuna de extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE) de *Mycobacterium bovis* y una vacuna recombinante de *Mycobacterium vaccae* contra la TBb en becerras menores de 45 días de edad provenientes de una explotación lechera con 34% de prevalencia de la enfermedad, que contaba al momento de realizar el estudio con 385 becerras de diferentes edades. Se seleccionaron para este estudio 30 becerras Holstein de entre 10 y 45 días de edad, es importante mencionar que todas las becerras fueron vacunadas con diferentes inmunógenos para la prevención de la enfermedad, los cuales fueron CPFE de *M. bovis*, la vacuna recombinante de *M. vaccae* y una recombinante BCG Phipps, ambas con el gen de la proteína PstS-1 de 38 kDa. Las becerras seleccionadas fueron negativas a la prueba de ELISA e IFN- γ y provenientes de madres negativas a la prueba de intradermoreacción (ID) doble comparativa. Se dividieron en 3 grupos de 10 animales; el primer grupo fue vacunado con CFPE de *M. bovis*, el segundo grupo con *M. vaccae* y el tercer grupo no fue vacunado quedando como control. La respuesta inmune celular se evaluó mediante la producción de IFN- γ en plasma obtenido de cultivo de sangre completa estimulada con PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6 este último con la finalidad de poder diferenciar animales vacunados de infectados; mientras que la inmunidad humoral se evaluó a partir de una ELISA comparativa empleando CFPE de *M. bovis* y *M. avium* para detectar los niveles de anticuerpos; ambas pruebas se monitorearon a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días después de la vacunación. A los tres grupos se les realizó la prueba de ID simple 10 meses después de la vacunación y 2 meses después se hizo la prueba de ID doble comparativa.

Con respecto a la producción de IFN- γ de plasma obtenido de sangre completa, estimulada con PPD bovino los animales vacunados con CFPE mostraron los niveles más elevados de la citocina en el menor tiempo (15 días); en el caso de la sangre estimulada con PPD aviar desde el día cero se mostró una diferencia entre el grupo control y los grupos vacunados y para la sangre estimulada con ESAT-6 el grupo control mostró los niveles de producción de IFN- γ más elevados. En cuanto a la respuesta humoral el grupo vacunado con CFPE manifestó una mayor producción de anticuerpos a *M. bovis*, seguido del grupo vacunado con *M. vaccae*. En ninguno de los 3 grupos se mostró un nivel de producción de anticuerpos importante al CFPE de *M. avium*. Los resultados de la prueba de ID simple fueron negativos en los tres diferentes grupos por otro lado los resultados arrojados en la prueba de ID comparativa fueron de un animal sospechoso por grupo; si se considera que la reactividad es debida a una posible infección por cepas de *M. bovis* de campo, podemos pensar que al lo largo del monitoreo ninguno de los animales se encontraba infectado, sin embargo los resultados obtenidos hasta este momento no revelaron diferencias claras en los parámetros considerados para la evaluación de la vacuna, no obstante ninguno de los animales de los tres grupos muestra signos de infección, por lo que se propone el seguimiento de estos animales hasta la etapa productiva en donde se espera que pueda haber una mejor interpretación en sus parámetros para la evaluación de las vacunas. Por otro lado los resultados globales de la prueba de ID mostraron una reducción en la prevalencia de la enfermedad del 34% al 11%, por lo que se puede concluir que existe un beneficio al emplear estas vacunas en la resistencia de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

La TBb es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, provocada por el agente causal *M. bovis*, que se caracteriza por la formación de granulomas principalmente en nódulos linfáticos, pulmones, hígado, intestino, bazo, pleura y peritoneo. Es una de las enfermedades más importantes del ganado bovino, por sus consecuencias económicas para el país ya que su incidencia limita el desarrollo del sector pecuario, afectando primordialmente a la ganadería lechera, provocando una deficiencia en su condición física y productiva del animal; además de representar un riesgo para la población humana, ya que sus productos son una de las principales fuentes alimentarias en México (1, 2). Existen factores que favorecen la presentación de la TBb como son: la desnutrición, la inmunodepresión, el estrés y el uso de corticosteroides, además los estudios han demostrado que los animales de vida salvaje son una fuente de contagio importante para el ganado. Existen programas para el control de la TBb, estos programas se basan principalmente en la detección de animales infectados y sacrificio inmediato de estos, desgraciadamente estos programas han sido solo efectivos en países desarrollados que son capaces de costearlos y donde no hay animales de vida salvaje que actúen como reservorios de la enfermedad (3). Para aquellos países que no son capaces de solventarlos como el nuestro, la vacunación puede llegar a convertirse en un instrumento práctico para luchar contra la TBb (4).

Se ha determinado que la inmunidad protectora en contra de la TBb es la inmunidad celular, que esta mediada principalmente por interacciones entre células T específicas, por antígenos micobacterianos y por los macrófagos activados, cuya actividad fagocítica y bactericida se incrementa como resultado de su activación por el interferón gamma (IFN- γ) producido por las células NK (células asesinas naturales) y el linfocito T, cuya diferenciación a linfocitos cooperadores 1 (Th1) se favorece por las mismas citocinas (5, 6).

Para las estrategias del desarrollo de mejores y nuevas vacunas hacia la TBb, se parte de identificar aquellos antígenos capaces de estimular y activar linfocitos T con un perfil

de secreción de citocinas tipo Th1, que se caracterizan por producir cantidades significativas de IFN- γ , interleucina-2 (IL-2) e IL-12, citocinas que se asocian con la resistencia micobacteriana en algunos modelos experimentales (7, 8).

Hoy en día se están evaluando nuevas vacunas con diferentes antígenos micobacteriales como el MPB70, MPB83 y el Ag85A. Las observaciones han demostrado que el antígeno MPB83 induce una fuerte respuesta celular, caracterizada por un predominio de células T CD4 sensibilizadas específicamente que inducen una producción significativa de IFN- γ , así como una inmunidad humoral caracterizada por la producción de anticuerpos específicos de la clase IgG2; mientras que el empleo del antígeno MPB70 como vacuna ha mostrado ser menos eficaz (9). Una cualidad que debe tener la vacunación contra la TBb es que primordialmente no induzca la hipersensibilidad tardía ya que esta interfiere en el diagnóstico de la TBb al no poder diferenciar animales vacunados de aquellos que están infectados naturalmente; para esta finalidad se han descrito dos proteínas, el antígeno de secreción temprana (ESAT-6) y la proteína CFP-10, producto del genoma únicamente de cepas patógenas de campo de *M. bovis* (10).

1.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que afecta a seres humanos y animales, se estima que tiene una antigüedad de 15,000 a 20,000 años. Se cree que las micobacterias evolucionaron de otros microorganismos más primitivos dentro de su propio género *Mycobacterium*, además de que en algún momento dado de la evolución, alguna especie de micobacteria traspasara la barrera biológica por presión selectiva y pasara a tener un reservorio en animales, esto posiblemente dio lugar a *M. bovis*, que es aceptada por muchos como la más antigua de las especies del complejo tuberculosis (11).

En el siglo XVI la “enfermedad perlada” del bovino se consideró como una forma de tisis humana. A mediados del siglo pasado el padecimiento se transmitió en numerosos experimentos en humanos y en bovinos a conejos y cobayos, atribuyendo entonces su aparición a un agente transmisible específico. En el año de 1882, Robert Koch describe por

primera vez a *M. tuberculosis* como agente de la tuberculosis del hombre y de los animales al utilizar una nueva técnica de tinción, además de que fue capaz de cultivar y reproducir la enfermedad; más tarde Koch opinó que la tuberculosis humana era distinta de la bovina y debido a ello suponía que no era necesario proteger al hombre contra la “enfermedad perlada del bovino”, este punto de vista lo refutaron numerosos experimentos, según el resultado de los cuales los agentes de la tuberculosis humana y de los animales son variedades de una misma especie de bacteria (12). Koch empleó el bacilo muerto como vacuna desafortunadamente, no inducía protección en los pacientes no infectados y al inyectarlo de forma intravenosa en personas infectadas ocasionaba reactivación de la enfermedad; sin embargo después se reveló su importancia para el diagnóstico de la enfermedad; Koch subrayó en 1891 sus observaciones con la frase: “La piel de un cobayo tuberculoso se comporta de otra manera que la piel de uno sano frente a la inyección intradérmica de tuberculina” (13).

En Gran Bretaña en el año 1937 se comprobó la importancia de *M. bovis* en el desarrollo de la enfermedad en humanos. En el año de 1940 Lansteiner y Chase demostraron que la inmunidad contra la tuberculosis es mediada por células y no por los mecanismos humorales del sistema inmune (7, 11).

1.2 Tuberculosis bovina (TBb) en México

La tuberculosis en humanos se ha incrementado de manera alarmante en los últimos 10 años, en México no se conoce con precisión el número de casos de tuberculosis en humanos atribuibles a *M. bovis* debido a la carencia de laboratorios especializados en la caracterización de cepas (14), en el caso del ganado es bastante grave ya que causa pérdidas económicas a los productores mexicanos provocando el cierre de fronteras y el sacrificio de animales infectados con una prevalencia a nivel nacional del 11.1% en ganado de leche y 2.9% en ganado de carne, representando una pérdida económica de 450 millones de dólares anuales (2, 4, 15).

En México las estrategias a seguir para el control de la TBb están dirigidas por la Dirección General de Salud Animal, dependencia adscrita a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), donde se menciona que en zonas de baja prevalencia (ganado de carne), las medidas son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos y la constatación de hatos libres. En zonas de mediana y alta prevalencia (Ganado lechero y doble propósito) son: el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactores, cuarentena de hatos positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados (15).

1.3 Importancia en salud pública y económica

En la actualidad la tuberculosis es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, ya que 2.9 millones de personas mueren de los 8 millones de casos clínicos reportados cada año (16).

En el año de 1970 en diferentes países se registró un descenso importante en la presentación de casos en humanos por lo que se pensó que la enfermedad estaba controlada; pero en 1980, tras ese periodo de descenso comenzaron a reportarse varios casos, este aumento se debió a la aparición del VIH, por lo que se consideró a la tuberculosis como una epidemia global creciente de alto riesgo (17). Además del VIH existen otros factores que han influido en el incremento de la tuberculosis en humanos como: la diabetes *mellitus*, la desnutrición, inmunodepresión y la zoonosis, esta última considerada como una de las más importantes vías de transmisión por el consumo de leche sin hervir ya que el 40% de la leche que se consume en nuestro país no es pasteurizada (18); se estima que *M. bovis* es responsable del 10% de tuberculosis en humanos, razón suficiente que justifica su control (19, 20, 21).

La TBb aparte de causar grandes estragos en salud pública, cobra gran importancia por sus repercusiones económicas a nivel mundial que se calcula sobrepasan los 3 billones de dólares anuales. Origina perjuicios al ganadero limitando el comercio internacional;

además de provocar disminución de la fertilidad hasta de un 6%, merma la producción láctea en un 17%, baja conversión alimenticia que conduce a un lento aumento de peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia), decomisos de carne, y desecho prematuramente obligado de los animales afectados, además de causar disminución en la inmunidad aumentando la susceptibilidad a otras enfermedades (22).

Los principales animales afectados por TBb son los destinados a la producción de leche, ya que son sometidos a situaciones de estrés constante como lo es la alta producción de leche, el hacinamiento, la mala ventilación de los establos y cambios bruscos de temperatura, pero además existen otros factores predisponentes como la resistencia individual, la virulencia de la cepa de *M. bovis* causante de la infección, carga antigénica y grado de hipersensibilidad del animal (23, 24).

1.4 Características de las micobacterias

Las micobacterias son, aerobios obligados, bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), intracelulares con una anchura aproximada de 0.5 μm y una longitud variable, no forman esporas y de crecimiento lento, se han considerado como bacterias gram positivas, pero no se tiñen con dicha tinción, se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias debido a que la estructura de su pared celular es inusual ya que esta constituida por 4 polímeros: peptidoglicano, arabinogalactano, ácidos micólicos y lipoarabinomano (LAM). Este último tiene una gran cantidad de funciones inmunorreguladoras, como la activación de las células T e inhibición de la activación de los macrófagos; la pared incluye además lípidos de superficie como los micósidos y sulfolípidos que son importantes para su patogenicidad. Su pared celular contiene 60% lípidos, 10% péptidos-glicosados, a partir de éstos se determinan los caracteres de la colonia, además de asegurar la supervivencia de las bacterias en el interior de los macrófagos (25). La cera D y varias tubérculoproteínas inducen una reacción de hipersensibilidad retardada, que es detectada en la prueba de ID. Se tiñen por el método Ziehl-Neelsen, su crecimiento puede ser en medios sintéticos simples favorecidos con una atmósfera de 5-10% de CO_2 con una temperatura de 30 a 42°C, pero en el caso particular de *M. bovis* su desarrollo se inhibe en presencia de glicerol. El cultivo de

M. tuberculosis y *M. bovis* en este tipo de medios no se consigue hasta la 8 semana de incubación (12).

Las micobacterias que son capaces de producir tuberculosis están agrupadas en el complejo tuberculosis, dentro de este complejo se encuentran *M. bovis* (bovinos), *M. tuberculosis* (humano), *M. africanum* (de África), *M. microtti* (roedores) y más recientemente descrita *M. canetti* (26).

Dentro del complejo tuberculosis, *M. bovis* muestra un amplio espectro de hospederos, se ha aislado en: bovinos, cerdos, cabras, gatos, camellos, perros, llamas, ciervos, tejones, zarigüeyas, marsupiales, liebres europeas, elefantes, caballos y humanos (27).

La transmisión de *M. bovis* puede ser de varias formas, la más común e importante es por la formación de aerosoles (aerógena) con un 90% - 95% de los casos y la vía oral se presenta en un 10% - 5% siendo una ruta menos eficiente porque se requiere de un gran número de microorganismos para penetrar la mucosa intestinal (28).

En general *M. bovis* es resistente ya que puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo si las condiciones ambientales son favorables, en heces o suelo estéril si se encuentra protegido de la luz puede vivir varios meses, en moco traqueal conservan su viabilidad hasta 40 días, en el agua de bebida estancada puede guardar su poder infectante hasta 18 días después de su contaminación, en la leche mueren mediante la pasteurización; la desecación y la luz solar también son eficaces (19).

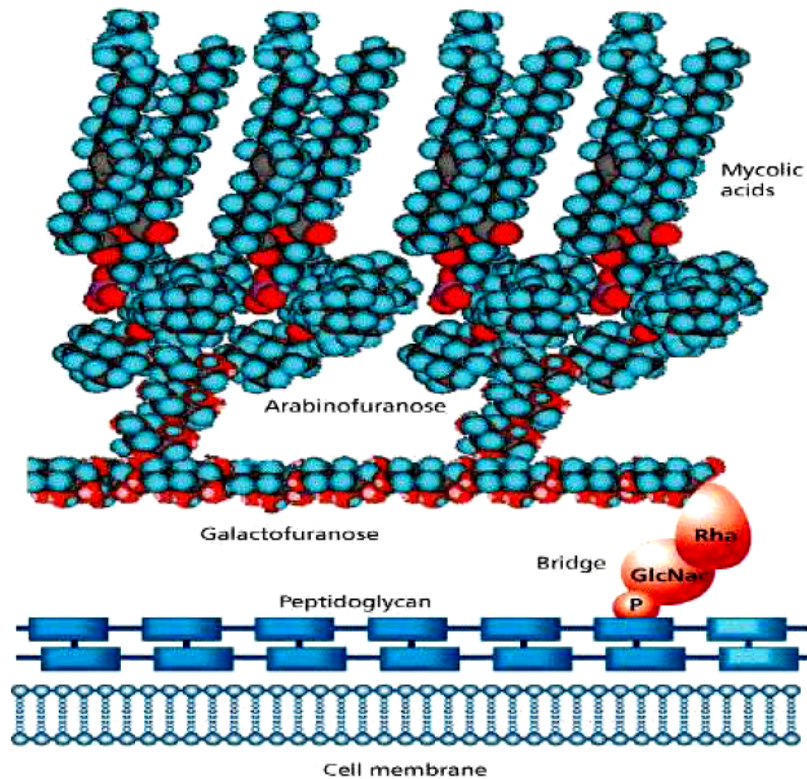


Figura 1. Representación molecular de la estructura de la pared celular de *M. bovis*.

1.5 Patología de la TBb

Para explicar la reacción del organismo frente a la micobacteria ingresada es necesario puntualizar que existen diferencias dependiendo de la vía de invasión y si es la primera vez que se tiene contacto con la micobacteria; si es el primer contacto con la micobacteria los animales no disponen de ninguna resistencia específica a diferencia de aquellos animales que ya tuvieron un contacto previo (29).

Si es la primera vez que tiene contacto el animal con la micobacteria y la vía de entrada es aérea, el bacilo tendrá acceso a los alvéolos donde será ingerido por los macrófagos, estos macrófagos infectados entran a la circulación y llegan a linfonodos regionales; los macrófagos intentan destruir al bacilo aunque en la mayoría de los casos los bacilos evitan la destrucción intracelular cambiando el pH del endosoma o inhibiendo la apoptosis; la micobacteria se multiplica intracelularmente destruyendo al fagosoma lo que produce 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. Entre los 15 y 21 días después de la infección se desarrolla la inmunidad mediada por células, dirigida principalmente por los linfocitos T específicos que proliferan en el granuloma.

El tubérculo o granuloma esta constituido en su centro de macrófagos infectados y células gigantes de Langhans dando lugar a una necrosis caseosa seguida de calcificación, esta área esta rodeada de células epiteliales, linfocitos y algunos granulocitos, las fibras de colágeno y componentes extracelulares delimitan la zona de lesión del tejido normal; en la mayoría de los casos esta reacción es suficiente para impedir la posterior difusión de la bacteria en todo el organismo, pero esto va a depender del estado inmunitario del animal y de la virulencia de la bacteria, ya que en ocasiones si el animal esta inmunodeprimido le es difícil contener la micobacteria superando la resistencia local, logrando de esta forma invadir a todo el organismo, esta generalización conduce a la tuberculosis miliar. Si la entrada de la micobacteria fuera por vía oral las lesiones primarias se encontrarían en amígdalas, intestino grueso, intestino delgado ganglios linfáticos mesentéricos y ganglios linfáticos faríngeos.

Aquellos animales que tuvieron un contacto previo con la micobacteria su efectividad se limita a las superficies de los canales anteriormente establecidos, a este curso se le conoce como tuberculosis crónica ya que la bacteria se disemina muy lentamente. Los animales con un contacto previo a la micobacteria pero que están inmunodeprimidos ya sea por el parto, deficiencias nutricionales, uso de corticosteroides o alguna enfermedad viral, la resistencia del animal puede disminuir provocando la invasión a todo el organismo, a este curso se le conoce como generalización tardía o forma de derrumbamiento (25, 12, 29).

1.6 Inmunidad de la TBb

Durante la infección con *M. bovis*, tanto la inmunidad celular, como la inmunidad humoral participan para combatir a la bacteria, de hecho la inmunidad celular predomina en estados tempranos de la enfermedad, pero esta disminuye y es eventualmente remplazada por la inmunidad humoral ya en estados avanzados de la enfermedad (30).

Se han establecido 3 fases en el desarrollo de la TBb. La primera fase es la de reconocimiento, donde el animal inhala al bacilo y los macrófagos alveolares lo fagocitan; la segunda fase es la de activación, donde los monocitos de sangre y otras células inflamatorias son atraídas al sitio de infección, además los monocitos se diferencian en macrófagos pudiendo así liberar citocinas y la última fase es la efectora donde se instaura la respuesta inmunitaria específica, que es beneficiosa para el organismo además de presentarse la reacción de hipersensibilidad tardía (31).

En el año 1986 se reportó que las células T se dividen en dos subpoblaciones Th1 y Th2; los Th1 que producen IFN- γ , IL-2 e IL-12 y los Th2 que producen IL-4, que inhibe la producción de IFN- γ , IL-5 que estimula la producción de IgE e IL-6. Estudios recientes han comprobado la importancia del IFN- γ contra la TBb, por esto se concluye que la inmunidad protectora en la TBb va a depender de la respuesta inmune celular dada por los linfocitos T y la respuesta Th1 (32).

Cuando los macrófagos alveolares ingieren al bacilo, se convierten en macrófagos activados, este tipo de macrófago tiene diferentes características ya que son más grandes, tienen mayor gasto metabólico, mayor contenido en lisosomas y enzimas, realizan con mayor eficacia funciones digestivas, bactericidas y procesamiento de antígenos para su presentación a las células T, los macrófagos secretan factor de necrosis tumoral (TNF) que activa a los neutrófilos y a las células dendríticas. Hay producción de IL-12 por las células fagocíticas, esta interleucina es importante en la inducción de IFN- γ , además de regular la respuesta innata con la respuesta adaptativa e inducir la inmunidad tipo Th1 (33).

Después de 2 a 3 semanas se activa la inmunidad adquirida en la que participan en forma importante los linfocitos T CD4 y los T CD8. Los linfocitos T CD4 se activan después de ser estimulados con el bacilo, estos liberan citocinas como IFN- γ que tiene función protectora en contra de la TB, al activar a los macrófagos. Las células T CD4, también secretan IL-2, que activa a las células NK, este tipo de células es importante porque se consideran que son las principales productoras de IFN- γ , IL-12 e IL-18. Las células T CD8 al activarse liberan enzimas que son capaces de destruir a las células

infectadas. Una vez que se establece la respuesta inmune específica beneficiosa para el organismo, también lo hace la reacción de hipersensibilidad tardía (34).

Las micobacterias pueden ser opsonizadas por moléculas del componente C3b del complemento, inmunoglobulinas (IgG), así como por el factor surfactante A (SpA); esto ayuda a la bacteria a ingresar al macrófago de manera eficiente. La eliminación del bacilo va a depender de la interacción entre los macrófagos infectados y los linfocitos T (35).

1.6.1 Inmunidad en neonatos

Los neonatos nacen con un sistema inmune competente; el número de linfocitos B circulantes hallados en terneros se aproxima al 30% del hallado en los adultos, y no es sino hasta los 20 días de vida cuando las concentraciones encontradas en los terneros son similares a la de los adultos (36).

La respuesta inicial, conocida como respuesta primaria, se caracteriza por que se tarda en presentar y tiende a tener una baja concentración de anticuerpos por lo tanto es necesario el apoyo inmunológico materno para que el recién nacido no sucumba ante posibles infecciones (37, 38). La calostrogénesis es una etapa diferenciada y de duración limitada, donde la madre le transfiere inmunoglobulinas a su cría. Esta parece estar bajo la influencia de hormonas lactogénicas y mecanismos locales dentro de la glándula mamaria. Durante este período se transmiten IgG que constituyen el 85.5% de las inmunoglobulinas totales presentes en el calostro. Los anticuerpos derivados del calostro tienen una vida media de 15 - 16 días en el sistema neonatal (39).

Las secreciones mamarias contienen cuatro tipos de células: linfocitos, neutrófilos, macrófagos, y células epiteliales. Los linfocitos representan más del 30%, los macrófagos y neutrófilos son los predominantes; es importante aclarar que los linfocitos T superan a los linfocitos B en todos los estadios de la lactación. Dentro de los linfocitos T, se encuentran: linfocitos CD4 y CD8 que participan en los procesos de mediación de la respuesta inmunitaria celular. Las células T CD4 participan mediante la producción de diferentes

citocinas, mientras que las concentraciones incrementadas de las células T CD8 intervienen en las propiedades inmunosupresoras del calostro y la leche, lo cual permitiría una activación más controlada del sistema inmunitario neonatal. Los linfocitos B representan alrededor del 24% de las células del calostro, su papel principal es la síntesis de la IgA (40).

Los linfocitos del calostro cumplen un papel protector contra enfermedades en el recién nacido y podrían reducir la evolución de enfermedades específicas. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), esta presente en la leche durante la lactación pero su cantidad disminuye entre la 4 y 6 semana después del parto. El calostro contribuye a regular el crecimiento neonatal y puede amplificar las respuestas inmunitarias neonatales tempranas. El calostro se absorbe por pinocitosis no selectiva, la absorción es iniciada por la presencia de macromoléculas y su eficiencia disminuye a lo largo de las primeras 24 horas de vida. La masa de inmunoglobulina absorbida por el ternero será inversamente proporcional a la concentración de macromoléculas no inmunoglobulinas presentes en el lumen intestinal (41). El concepto de fracaso de la transferencia pasiva se ha empleado en gran medida para describir situaciones en las cuales el recién nacido no absorbe los niveles adecuados de inmunoglobulinas (42).

Existe una relación entre niveles más elevados de IgG y menor incidencia de enfermedad, por lo tanto la concentración de inmunoglobulina contribuye a la resistencia a la enfermedad. Las inmunoglobulinas transferidas en forma pasiva pueden causar supresión específica e inespecífica de la inmunidad neonatal, la inhibición se ilustra por el hallazgo de que la producción endógena de anticuerpos aparece antes y alcanza concentraciones pico más elevadas en terneros privados de calostro, estos efectos inhibidores inespecíficos del calostro pueden persistir hasta 4 meses. La alimentación con calostro puede disminuir la capacidad humoral de los terneros, el calostro contiene elementos con actividad inmunológica que podrían afectar la respuesta inmunitaria de estos. Una consecuencia práctica importante de los efectos inmunomoduladores del calostro es su efecto potencial sobre la respuesta a las vacunas (43).

1.7 Diagnóstico de la TBb

Actualmente la prueba más usada para el diagnóstico de la TBb es la prueba de ID, la cual presenta algunos inconvenientes como su baja sensibilidad (70%) y especificidad (50-60%), y al igual que ésta existe una gran variedad de pruebas, pero ninguna es 100% efectiva lo que hace necesario investigar los fenómenos que presentan la variabilidad de las pruebas y buscar nuevas alternativas (44).

1.7.1 ID

También conocida como prueba de tuberculina, esta prueba ha sido aceptada universalmente, evalúa la inmunidad celular *in vivo*, basándose en la respuesta de hipersensibilidad tipo IV o respuesta tardía. Se utiliza para determinar si existe una exposición previa a los antígenos y para determinar la prevalencia aparente de TBb en un hato. Además ha sido utilizada en los programas de erradicación de la enfermedad desde hace casi un siglo en Europa y Estados Unidos (45).

La principal limitación de la prueba es su baja sensibilidad. Esta falla en la sensibilidad de la prueba origina que un cierto número de animales enfermos queden sin detectarse en los hatos, siendo esta situación un gravísimo inconveniente para la erradicación de la enfermedad, especialmente en los animales anérgicos o recientemente infectados, también es importante considerar que pueden variar los resultados por el uso de antiinflamatorios, tras el parto y la edad del animal. Su especificidad es relativamente alta, aunque a veces se presentan falsos positivos, que se atribuyen a la sensibilización con micobacterias diferentes a *M. bovis*, principalmente *M. avium* (micobacteria atípica). La Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995) regida por la SAGARPA, autoriza el uso del purificado proteico purificado (PPD) bovino elaborado con *M. bovis* cepa AN5, y el PPD aviar elaborado con *M. avium* cepa D4 (46).

Actualmente se usan dos tipos de pruebas de ID: 1) Prueba de ID simple y 2) la prueba de ID doble comparativa (confirmativa). La prueba de ID simple, se realiza en el

pliegue anocaudal de la cola o en el cuello aplicando PPD bovino a una dosis de 0.1 ml en forma intradérmica, la lectura se realiza a las 72 horas y las reacciones se clasifican como positivas cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación; la reacción será negativa cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación (15); otro criterio de lectura es medir el grosor de la piel con un vernier, la reacción se considera positiva si es 3 mm o mayor y menos de 3 mm el animal será considerado negativo (4). Esta prueba es la primera que se hace de las 2 existentes, cuando un animal sale positivo a esta prueba se debe realizar la prueba de ID doble comparativa (15), ya que es utilizada para realizar un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *M. bovis* de aquellos sensibilizados por exposición a otras micobacterias principalmente *M. avium*. Esta prueba consiste en la inyección intradérmicamente del PPD bovino y PPD aviar en diferentes puntos de la tabla del cuello. La lectura se realiza a las 72 horas y la dosis del PPD usada es de 0.1 ml de PPD bovino y aviar respectivamente. La distancia entre la aplicación del PPD bovino y aviar deberá ser entre 12 y 15 cm. La interpretación será positiva cuando la diferencia de PPD bovino sea de 4 mm mayor que el PPD aviar, por otra parte será considerado un animal negativo cuando no hay reacción al PPD bovino o cuando la reacción sea igual o menor que el PPD aviar; cuando la diferencia del PPD bovino es 2 mm mayor que el PPD aviar será considerado un animal sospechoso y se recomienda hacer la prueba de ID otra vez, pero se recomienda esperar al menos 60 días después de la primera prueba de ID que se realizó (47).

1.7.2 IFN- γ

La inmunidad celular hacia la micobacteria puede medirse *in vitro*, mediante la cuantificación del IFN- γ liberado por las células T sensibilizadas después de la estimulación por antígenos específicos. El kit de BOVIGAM es una prueba de ELISA tipo sandwich que emplea anticuerpos monoclonales que reaccionan solo con los epítopes del IFN- γ , evitando que haya una reacción cruzada con los IFN- α o β . Sus ventajas son: que es de rápida realización, es capaz de detectar pequeñas cantidades de IFN- γ y se puede usar en bovinos, ovinos, caprinos y otros miembros de la familia *Bovidae*.

Para la detección del IFN- γ se usa el plasma obtenido de cultivos de sangre completa estimulados con PPD bovino y PPD aviar, aunque existen antígenos más específicos como es el ESAT-6, y la proteína del filtrado de cultivo (CFP-10) su especificidad se basa en que solo se encuentran en las cepas patógenas de *M. bovis* y no en las cepas vacúnales. Los linfocitos T sensibilizados presentes en el cultivo secretan IFN- γ que es evidenciado mediante una prueba de ELISA de captura; la producción de IFN- γ correlaciona con el grado de desarrollo de la enfermedad, por lo que en animales no infectados sus niveles son bajos. Esta prueba tiene un 93% de sensibilidad cuando se usa sola, pero si se usa en conjunto con la prueba de ID su sensibilidad puede llegar a ser de un 95.2% (48).

1.7.3 ELISA

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se basa en una reacción antígeno – anticuerpo y puede detectar anticuerpos IgA, IgM, e IgG contra antígenos de *M. bovis*, así como algunas proteínas como ESAT-6, CFP-10, 38-kDa entre otras, empleando el conjugado apropiado, la intensidad de color obtenida al final de la reacción es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra de suero. Las pruebas serológicas no han dado resultados dignos de confianza para su uso en la rutina diagnóstica por su baja sensibilidad (60%). Pero esta prueba ha mostrado ser muy útil para determinar anticuerpos de *M. bovis* en estados muy avanzados de la enfermedad cuando ya no se manifiesta la reacción de tipo celular, como en el caso de los animales anérgicos otras ventajas de esta prueba son que es muy económica y de fácil realización (49).

La prueba de ELISA más usada para el diagnóstico de la TBb es la de tipo sandwich comparativa, que nos permite diferenciar entre *M. bovis* y *M. avium*. La prueba de ELISA puede llegar a ser una herramienta muy práctica siempre y cuando se haga además con otras pruebas de diagnóstico (50).

1.7.4 PCR

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene como objetivo amplificar las cadenas de ADN blanco con la ayuda de la ADN polimerasa hasta lograr millones de copias de un segmento específico que cuando llegué a cierto numero de copias sea posible visualizarlo por medio de una electroforesis en geles de agarosa. Esta prueba se basa en la utilización de oligonucleótidos específicos que marcan la región del gen blanco a amplificar (51). La región blanco que más se ha utilizado en el caso de tuberculosis es aquella que amplifica el gen que codifica la proteína MPB70, ya que es específica de *M. bovis* (9)

Existen varios tipos de PCR como: PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR *in situ*. Esta prueba tiene muchas ventajas entre las principales, es que se puede realizar en diferentes tipos de muestras biológicas como: sangre, exudado nasal, leche, tejidos, entre otros, además de tener una alta sensibilidad (90.06%) y una especificidad (99%), pero tiene algunos inconvenientes como su alto costo, además de requerir personal capacitado y laboratorios equipados (52, 53).

2. VACUNAS

El objetivo principal de vacunar al ganado contra la TBb, es la de prevenir que se establezca la infección en los animales. Una vacuna ideal debe ser segura, que ofrezca un alto grado de protección a fin de reducir la diseminación de *M. bovis*, estable, económica y que no intervenga en la prueba de ID, pero desgraciadamente las vacunas candidatas son deficientes en una o varias de sus cualidades, sin embargo pueden ser funcionales (54).

Avances en el conocimiento de los procesos involucrados en la respuesta inmune protectora hacia *M. bovis* y avances en las técnicas de la biología molecular junto con la complementación de la secuencia del genoma de *M. bovis*, han dado oportunidad para desarrollar y mejorar nuevas vacunas contra la TBb. Se han estudiado numerosos tipos de vacunas, las basadas en microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos, subunidades vacunales compuestas con proteínas purificadas y vacunas de ADN, pero por ahora se encuentran en una etapa de desarrollo experimental y de ensayo en animales (54, 55).

El conocimiento de los mecanismos inmunes involucrados en la resistencia a la enfermedad, y la identificación de los antígenos capaces de inducir una respuesta celular protectora son las bases fundamentales para conseguir el éxito en el desarrollo de una vacuna eficiente contra la TBb (56).

2.1 Vacuna de CFPE de *M. bovis*

La BCG ha sido la vacuna más usada en el mundo desde 1928 en humanos contra la tuberculosis, logrando reducir el riesgo de diseminación de esta enfermedad entre la población; sin embargo su uso en los bovinos ha mostrado varias limitaciones, debido a que sus mecanismos de protección no han sido completamente entendidos; y a que su eficacia en estudios experimentales es variable y controversial (57); por estas razones se ha buscado desarrollar nuevas y mejores vacunas contra la TBb, considerando entre las candidatas las vacunas preparadas con CFPE de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, de las cuales se ha observado

no interfieren con las pruebas de diagnóstico y no se ve comprometida su efectividad por una presensibilización de micobacterias ambientales, además se ha observado que contienen proteínas que son capaces de estimular a las células T, lo que se traduce como una buena protección contra la TBb (58).

Estudios realizados en ratones y cobayos con vacunas elaboradas con CFPE de *M. tuberculosis* y *M. bovis* han mostrado que pueden inducir protección contra desafíos aerógenos de cepas patógenas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Numerosas proteínas micobacterianas han sido aisladas y caracterizadas de los CFPE, algunas de las cuales se encuentran asociadas a la célula bacteriana y otras son secretadas. Los antígenos que evocan la inmunidad protectora de los linfocitos Th1, aun no son completamente identificados; sin embargo se han observado que las micobacterias vivas son eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con la generación de micobacterias muertas, así los antígenos secretados presentes en los extractos de filtrado de cultivo micobacterianos, producido por el metabolismo activo de la bacteria son esenciales para inducir la inmunidad protectora contra la TBb (59).

Existe además, una fuerte evidencia de que los antígenos del CFPE son altamente reconocidos durante la infección en varios modelos animales. La proteína MPB70 de *M. bovis* es un antígeno inmunodominante de la bacteria además de ser uno de los principales componentes del filtrado de cultivo, capaz de evocar una respuesta en estados tempranos de la tuberculosis pulmonar en los bovinos (60, 61).

Estudios recientes han mostrado que la vacunación con CFPE en bovinos produce una fuerte respuesta humoral, y una casi imperceptible respuesta celular (58), pero se ha demostrado que si los animales se vacunan con CFPE y con los correctos adyuvantes como CpG oligodeoxynucleotides, IFN- γ , interleucina 2, entre otros habrá una respuesta celular elevada, además de mantener su respuesta humoral. Esta misma protección se observa en animales que han sido vacunados con CFPE y revacunados con BCG (58, 62).

2.2 Vacuna recombinante de *M. vaccae*

La bacteria *M. vaccae* es un micobacteria no patógena, de rápido crecimiento y habitante normal del suelo; la cual ha sido usada en varias pruebas como agente inmunoterapéutico para el tratamiento de la tuberculosis y como inmunomodulador en otras enfermedades (63).

Cuando *M. vaccae* es usada a dosis apropiadas provoca una respuesta inmune Th1 (64), aunque al añadirle el gen inserto de la proteína PstS-1 del antígeno 38 kDa aumenta y enriquece la producción de esta respuesta. Además se ha comprobado que confiere beneficios profilácticos y terapéuticos en desafíos intratraqueales con *M. tuberculosis* en roedores. La disponibilidad de los sistemas genéticos para la expresión de antígenos recombinantes en *M. vaccae* proporciona una ventaja adicional, particularmente en relación con los antígenos de *M. tuberculosis* (65, 66).

El antígeno 38 kDa (PstS-1) de *M. tuberculosis* involucrado en la incorporación de fósforo inorgánico, es uno de los principales constituyentes del sobrenadante de cultivo de esta bacteria, no obstante, se encuentra en concentración significativa en *M. bovis*. El antígeno posee diferentes epítopes capaces de inducir la proliferación de células Th1 específicas que nos dan la inmunidad protectora contra la TBb, además de ser una molécula blanca para las células T CD8 (67).

La inmunodominancia de este antígeno en las reacciones mediadas por anticuerpos y células T se basa en su localización extracelular. Debido a su relevancia antigénica su utilidad como inmunógeno empleando una recombinante de *M. vaccae* para la prevención de la tuberculosis producida por *M. tuberculosis* fue evaluada en un modelo de ratón con resultados satisfactorios al momento del desafío con una cepa virulenta del microorganismo; además existe un efecto inmunomodulador por los componentes de la pared celular de *M. vaccae*, que beneficia una respuesta tipo Th1, necesaria para el control de las infecciones por micobacterias (68).

2.3 Vacuna BCG

La vacuna BCG esta hecha con el bacilo atenuado de *M. bovis* de Calmette-Guerin. Albert Calmette y Camile Guerin asilaron la cepa de una vaca con mastitis tuberculosa, esta cepa fue cultivada en medio de papa glicerinizada con bilis de bovino y después de 232 pases presentó cambios en la morfología colonial, además de disminuir su virulencia. Algunas de sus características son: segura, relativamente estable y barata; estas cualidades la hacen deseable para su uso, pero desgraciadamente tiene una gran desventaja y es que al vacunar al ganado dan positivo a la prueba de tuberculina (54), sin embargo esto no siempre sucede ya que existen experimentos que han mostrado lo contrario (4).

La vacuna BCG induce un nivel de protección contra la infección experimental de TBb, pero es inefectiva contra infecciones de campo. Los factores que pudieron haber contribuido a su fracaso es el empleo de dosis altas de 10^6 – 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC), usada para vacunar, los recientes estudios han sido optimistas en su eficacia a dosis de 10^4 – 10^6 UFC, además han mostrado que al administrarse subcutáneamente induce niveles de protección al desafío con *M. bovis* y no presenta reactividad a la prueba de ID (69, 58).

Por otro lado, se ha observado que la vacunación al nacimiento muestra una eficacia casi del 100% en la prevención del desarrollo de lesiones de TBb, mientras que animales vacunados a las 6 semanas de edad muestran una eficacia del 90% solamente. En pruebas donde la BCG fue usada en animales de 5-8 meses su eficacia en cuanto a prevenir lesiones fue del 0-68% en bovinos y en el humano de un 41% (69, 70).

2.4 Vacuna de ADN

Gracias a los avances en la tecnología se han podido desarrollar nuevas vacunas como las de ADN contra la TBb. Estas han mostrado ser muy prometedoras por sus características deseables como que no interfiere en las pruebas de ID e IFN- γ , ser protectivas durante los desafíos con *M. bovis* y *M. tuberculosis* y dar una respuesta de memoria. Es importante puntualizar que estas vacunas están en etapa experimental (9, 71, 72).

Existen diferentes tipos de vacunas de ADN; estas van a depender del tipo de proteína micobacteriana que expresen; pueden ser de MPB70, MPB83, Hsp65, Hsp70 y Apa (9, 72).

La vacunación en ganado con este tipo de vacunas ha mostrado resultados muy variados, pero a la vez muy prometedores. La vacuna con MPB83, provoca una fuerte respuesta celular y humoral, la primera caracterizada por células T CD4 y alta producción de IFN- γ , la segunda caracterizada por IgG1, además se ha comprobado que reduce el número de lesiones durante los desafíos con *M. bovis* (9).

Cuando las vacunas de ADN se usan solas han mostrado resultados decepcionantes, sin embargo al combinarla con ESAT-6 hay una estimulación de células T CD8, que inducen protección y disminución de lesiones en desafíos con *M. bovis*, en contraste de aquellos animales que solo son vacunados con ADN sin adyuvantes (72, 73).

Los adyuvantes maximizan la efectividad de este tipo de vacunas, en el caso de los bovinos pueden ser el ESAT-6, CpG oligodeoxynucleotides y la misma BCG al revacunar; los mejores resultados se dan cuando se vacuna primero con ADN y se revacuna con BCG, mostrando una reducción en los parámetros patológicos y microbiológicos aun mejor que la BCG sola (62).

3. HIPÓTESIS

La vacunación empleando CFPE de *M. bovis* o la vacuna recombinante de *M. vaccae* evocan una inmunidad protectora alta y sostenida en becerras que se vacunan a edad temprana, bajo condiciones naturales de desafío a cepas de campo durante su etapa productiva; con la ventaja de no interferir con la prueba de tuberculina. No obstante, es posible que existan diferencias en el grado de protección entre ambas vacunas, lo que podrá determinarse empleando pruebas que evalúen la respuesta celular y humoral de manera periódica.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el grado de protección ofrecido por el CFPE de *M. bovis* y el de una vacuna recombinante de *M. vaccae* contra la tuberculosis bovina en becerras vacunadas a edad temprana bajo condiciones de campo en un hato con elevada prevalencia de la enfermedad.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inmunizar y comparar la respuesta inmune de bovinos inoculados con CFPE, con aquellos inoculados con *M. vaccae* recombinante en un hato con prevalencia alta de tuberculosis.
2. Evaluar la cinética de producción de IFN- γ en células estimuladas *in vitro*, en respuesta al PPD bovino, PPD aviar, ESAT-6 y control.
3. Determinar si las vacunas interfieren en la prueba de ID de la tuberculina dentro del primer año de haber sido aplicada.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de CFPE de *M. bovis* AN5 para emplear como vacuna

Para la obtención del CFPE se empleo la cepa *M. bovis* AN5, la cual fue cultivada en medio liquido sintético de Dorser-Henley a 37° C durante 6 semanas, al termino los cultivos se filtraron obteniendo el medio liquido libre de bacterias. Las proteínas presentes en los filtrados se precipitaron con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) a una saturación final del 80%, con agitación constante a 4° C por 24 horas, el precipitado resultante se centrifugó a 15 000 x g por 1 hora, posteriormente se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 y se dializó exhaustivamente contra H₂O y PBS. El material así obtenido se denominó como extracto proteínico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína del CFPE se determinó por el método de Bradford (74).

6.2 Obtención de *M. vaccae* recombinante para emplear como vacuna

La cepa Stanford de *M. vaccae*, se cultivó a 30° C en medio de Middlebrook 7H9 (Difco). Las bacterias se cosecharon en la fase exponencial del crecimiento y se prepararon células competentes para ser transformadas con el plásmido pCAP 3 que contiene el gen que codifica para la proteína pstS-1 (Rv0934) de *M. tuberculosis* cuya expresión esta dirigida por el promotor de choque térmico HSP60 de *M. tuberculosis*. Las colonias recombinantes se crecieron en 7H9 – higromicina. Posteriormente, las bacterias se cosecharon a mitad de la fase exponencial de crecimiento y se ajustó a la concentración de 10⁴ UFC/1.5 ml requerida para la vacunación de acuerdo al protocolo y se guardaron a – 70° C en solución salina fisiológica hasta su uso. Estas actividades fueron realizadas por el equipo de la Dra. Clara Espitia Pinzon, del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. La parte correspondiente en este trabajo de tesis fue el probar en campo la protección de dicha vacuna.

6.3 Animales de estudio

Se consideraron 30 becerras de la raza Holstein, entre 10-45 días de edad, provenientes de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo pertenecientes a un hato con prevalencia del 34% de tuberculosis y con un historial de dos años atrás de reactividad a la prueba de ID, estas becerras fueron parte de un grupo de 385 becerras vacunadas con diferentes inmunógenos.

6.4 Diseño experimental

Los animales fueron evaluados inicialmente para determinar su estado inmune a la enfermedad mediante las pruebas de IFN- γ y ELISA comparativa. Todos los animales incluidos en este estudio fueron negativos a las pruebas antes mencionadas y provenían de madres negativas a la prueba de ID doble comparativa. Los animales se dividieron en tres grupos de diez animales cada uno, los cuales se mantuvieron estabulados. El grupo 1 se vacunó con 300 mg/ml del CFPE de *M. bovis*, inoculado subcutáneamente en la tabla del cuello. El grupo 2 fue inoculado con 10^4 UFC en 1.5 ml de la vacuna recombinante de *M. vaccae* vía subcutánea y el grupo 3 permaneció como grupo control, inoculando PBS como placebo. Todos los animales fueron evaluados periódicamente a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días posteriores a la vacunación con la prueba de IFN- γ y ELISA; 10 meses después de la vacunación se realizó la prueba de ID simple, dos meses después la prueba de ID doble comparativa.

6.5 Esquema de vacunación.

Grupo	No. de animales por grupo	Inmunógeno	Dosis	Vía de inmunización
1	10	CFPE	300 mg	subcutánea
2	10	<i>M. vaccae</i>	1×10^4 UFC	subcutánea
3	10	PBS	1 ml	subcutánea

6.6 Prueba de IFN- γ

De cada animal se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre con heparina para su evaluación a los diferentes tiempos. La sangre completa se distribuyó en placas de cultivo de 24 pozos en condiciones de esterilidad a razón de 1.5 ml de sangre por pozo estimulados con 100 μ l de PPD bovino; 100 μ l de PPD aviar (ambos PPD a 0.3 mg/ml) ESAT-6 1 μ l/ 1 ml y un pozo sin estimular como control; las placas se incubaron durante 24 horas en estufa de CO₂ al 5% a 37° C. Al término de la incubación se obtuvo el plasma de los diferentes cultivos en los cuales se evaluó la protección de IFN- γ inducido por el estímulo antigénico.

El ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante¹, brevemente 100 μ l de cada uno de los plasmas colectados diluidos 2:1, se adicionaron por duplicado a los pozos respectivos de las placas de microtitulación sensibilizadas con el primer anticuerpo monoclonal específico para el IFN- γ bovino; después de una incubación de una hora y un lavado exhaustivo, se adicionó 100 μ l del segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa, incubándose nuevamente por una hora, posteriormente las placas se lavaron para eliminar el conjugado no ligado y finalmente se adicionó el sustrato enzimático (H₂O₂) y el cromógeno tetrametilbencidina (TMB), incubándose por 30 minutos antes de detener la reacción. Las placas se leyeron en un lector de ELISA marca BIO- RAD Benchmark Plus empleando un filtro de 450 nm.

6.7 Prueba de ELISA

Se sensibilizaron placas² de 96 pozos con 5 μ g/ml de CFPE de *M. bovis* y *M. avium* respectivamente diluido en buffer de carbonato–bicarbonato 0.1 M adicionando 100 μ l de esta solución por pozo; se incubaron toda la noche en estufa de CO₂ al 5% a 37° C. Se decanto el contenido pasadas las 24 horas y se realizaron 5 lavados con PBS/Tween adicionando 100 μ l por pozo. Se colocaron 100 μ l por pozo de solución bloqueadora (PBS–

¹ Bovine γ Interferón Test Kit

² Nunc – Immuno Plate MaxiSorp

Tween–leche descremada al 3%), se incubaron por una hora y al término se añadieron 100 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, incubando una hora 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 peroxidasa³ diluida 1:5000 en solución bloqueadora y se incubó por una hora a 37° C. Se decantó el contenido y se lavó nuevamente; 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 (75).

6.8 Prueba de ID

La prueba de ID simple se realizó inoculando 0.1 ml de PPD bovino intradérmicamente en el pliegue anocaudal de la cola, después de 72 hrs. se realizó la lectura y se siguieron los criterios antes mencionados para evaluar los resultados de la prueba; 2 meses después se realizó la prueba de ID doble comparativa; primero se midió el grosor de la piel de la tabla del cuello con un vernier, y se aplicó 0.1 ml de PPD bovino en el tercio medio de la tabla del cuello, luego a 12 cm de la inoculación del PPD bovino se midió el grosor de la piel y se aplicó 0.1 ml de PPD aviar, en ambos casos la zona se limpió y se afeitó previamente a la inoculación. La lectura se realizó a las 72 horas midiendo el grosor de la piel. Para la interpretación de resultados se siguieron los criterios antes mencionados para este tipo de prueba (15).

6.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico considerando cuatro variables: 1) Prevalencia de TB, 2) Tratamientos, 3) Niveles de anticuerpos y 4) Niveles de IFN- γ ; mediante una T – Student independiente con el programa Sigma Plot (Jandel Scientific versión 1.02) para determinar si hay una diferencia significativa entre los 3 grupos. $P < 0.05$ hay significancia, con un índice de confiabilidad del 95%.

³ Protein G, recombinant – peroxidase Labeled, SIGMA, No. Lot. 98H9230

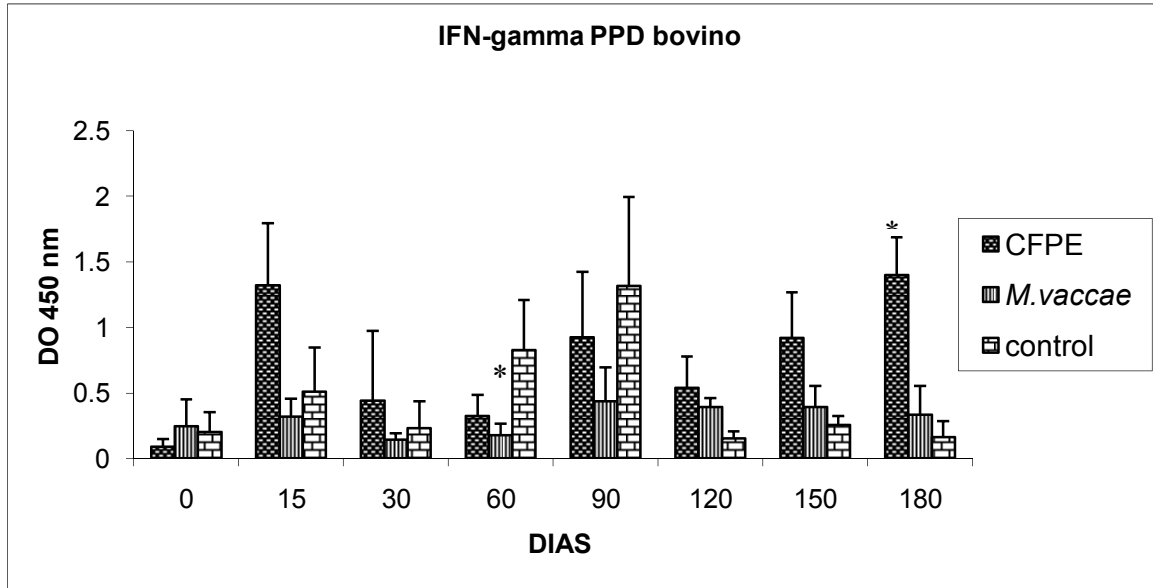
7. RESULTADOS

Las becerras que se incluyeron en este estudio fueron evaluadas por IFN- γ (inmunidad celular) y por ELISA (inmunidad humoral), previo a la vacunación (día cero), siendo todas negativas a ambas pruebas. Los tres grupos fueron monitoreados periódicamente después de la vacunación a los 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días. Además a los 10 meses posvacunación se les realizó la prueba de ID simple y a los 12 meses la prueba de ID doble comparativa con la finalidad de valorar la inmunidad celular, definir el estado inmune de los animales y determinar si la vacuna induce la hipersensibilidad retardada.

7.1 Resultados de IFN- γ

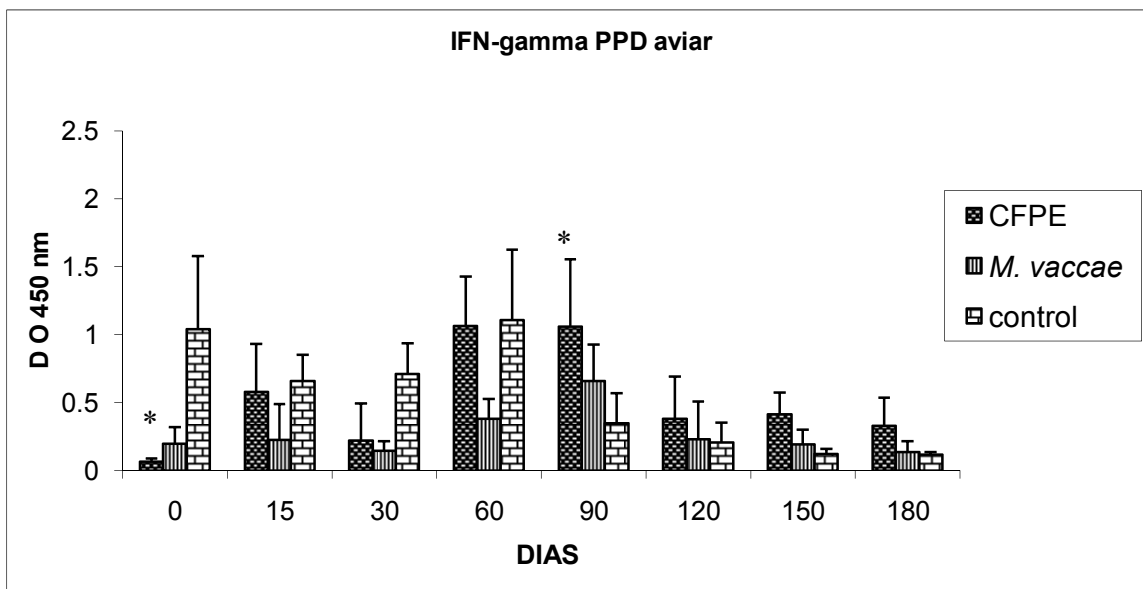
Se evaluó la inmunidad celular *in vitro* determinando la producción de IFN- γ de las becerras usando como antígenos PPD bovino, PPD aviar, ESAT-6 y un control sin estimular.

En la gráfica 1 (pág. 31), se muestran los resultados de producción de IFN- γ de plasma obtenido de sangre estimulada con PPD bovino durante el monitoreo de los grupos. Al inicio del experimento los tres grupos tuvieron valores bajos de IFN- γ ; después de la vacunación, el grupo vacunado con CFPE alcanzó un nivel de producción significativo 1.3231 ± 0.0629 densidades ópticas (D.O) ($P > 0.05$), no manteniéndose en los dos siguientes muestreos, e incrementándose a los 90 días alcanzando un nivel de producción 0.9234 ± 0.5012 D.O ($P > 0.05$), disminuyendo a los 120 días, pero volvió a incrementarse gradualmente y significativamente a los 150 y 180 días, siendo su valor más alto registrado en el periodo de evaluación 1.400 ± 0.2864 D.O ($P > 0.05$). Dentro del grupo de *M. vaccae*, se registró un aumento significativo en la producción de IFN- γ a los 90 días a 0.4349 ± 0.2631 D.O ($P > 0.05$), manteniendo la producción de la citocina sin variación al final del periodo evaluado. En el caso del grupo control se observó un aumento significativo en la producción de IFN- γ a los 60 y 90 días de muestreo, exponiendo su valor más alto de 1.3168 ± 0.6773 D.O ($P > 0.05$), tomando valores bajos para el final del monitoreo. El valor promedio de producción de IFN- γ obtenido para el grupo vacunado con CFPE en presencia de PPD bovino, durante el monitorio fue de 0.7447 ± 0.3257 D.O; para el grupo vacunado con *M. vaccae* fue de 0.3055 ± 0.1487 D.O y para el grupo control fue de 0.4575 ± 0.2498 D.O.



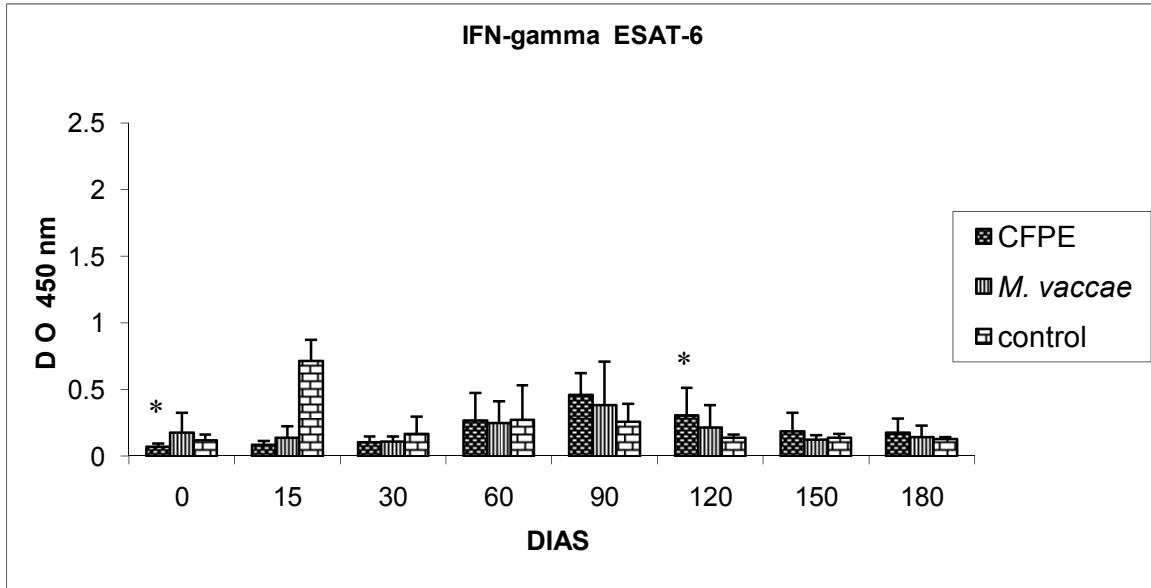
Gráfica 1. Promedios del nivel de producción de IFN- γ en plasma obtenido de sangre estimulada con PPD bovino a 450 nm, en los tres diferentes grupos. * Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

En la gráfica 2 (pág. 32), se observa la producción de IFN- γ en plasma de sangre estimulada con PPD aviar; donde se muestra que hay diferencia en los niveles de producción de IFN- γ entre los grupos vacunados y el grupo control al inicio de la evaluación, ya que el grupo control alcanzó un nivel de producción 1.0415 ± 0.5379 D.O ($P < 0.05$ CFPE, $P > 0.05$ *M. vaccae* recombinante) en contraste a los grupos vacunados. El nivel de IFN- γ en el grupo control se mantuvo alto hasta los 60 días, no obstante para los 90 días su producción declinó gradualmente y significativamente hasta el final del periodo evaluado. Para el grupo vacunado con CFPE se registró un aumento significativo en la producción de IFN- γ a los 60 días 1.1074 ± 0.5165 D.O ($P > 0.05$), manteniéndose para el siguiente muestreo, teniendo valores bajos al final del periodo evaluado. En el caso del grupo vacunado con *M. vaccae* se registró un aumento en la producción del IFN- γ a los 90 días, teniendo valores bajos para el final del monitorio. El valor promedio de producción de IFN- γ obtenido del grupo vacunado con CFPE en presencia de *M. avium* durante el periodo evaluado fue de 0.5132 ± 0.2740 D.O, para el grupo vacunado con *M. vaccae* fue de 0.27 ± 0.1671 D.O y para el grupo control fue de 0.5381 ± 0.2377 D.O.



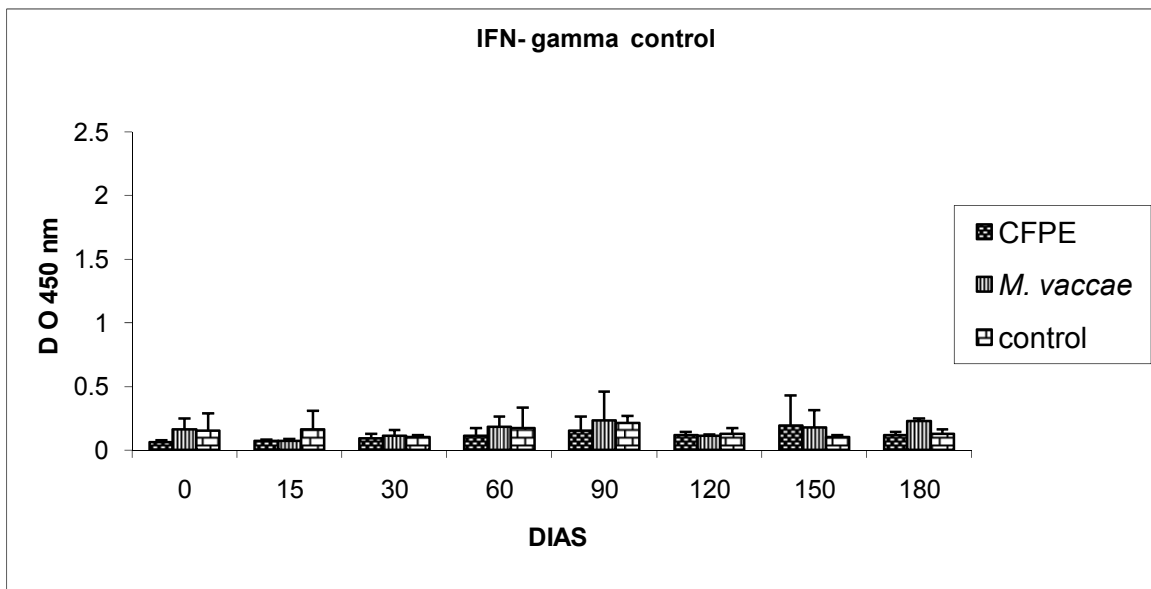
Gráfica 2. Promedios del nivel de producción de IFN- γ de plasma obtenido de sangre estimulada con PPD aviar a una DO 450 nm. * Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

En la gráfica 3 (pág. 33), se muestra el nivel de producción de IFN- γ en plasma de sangre estimulada con ESAT-6 durante el monitoreo de los tres diferentes grupos. Al inicio de la evaluación los tres grupos presentan valores bajos de producción de la citocina, no obstante para los 15 días únicamente el grupo control alcanzó niveles significativos de producción 0.7134 ± 0.1602 D.O ($P > 0.05$), no manteniéndose los muestreos siguientes, viendo valores de producción bajos hasta el fin de la evaluación. El grupo vacunado con CFPE a los 90 días alcanza el valor de producción de IFN- γ de 0.4610 ± 0.1627 D.O ($P > 0.05$) disminuyendo gradualmente a partir de los 120 días hasta el final de la evaluación. En el caso del grupo vacunado con *M. vaccae* siempre mantuvo nivel bajos de producción de la citocina, mostrando únicamente un incremento significativo a los 90 días. El valor promedio de producción de IFN- γ obtenido para el grupo vacunado con CFPE en presencia del ESAT-6 durante todo el período de evaluación fue de 0.2071 ± 0.1153 D.O, para el grupo vacunado con *M. vaccae* fue de 0.1929 ± 0.1309 D.O y en el caso del grupo control fue de 0.2415 ± 0.1004 D.O.



Gráfica 3. Promedios del nivel de producción de IFN- γ en plasma obtenido de sangre estimulada con ESAT-6 a una DO 450 nm. * Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

En la gráfica 4 (pág. 33), se muestran los niveles de producción del IFN- γ en cultivos de células sin estimular durante la evaluación. Se observa que en los tres grupos desde el inicio hasta el periodo final mantuvieron niveles de producción de IFN- γ bajos y fueron muy similares entre los grupos.



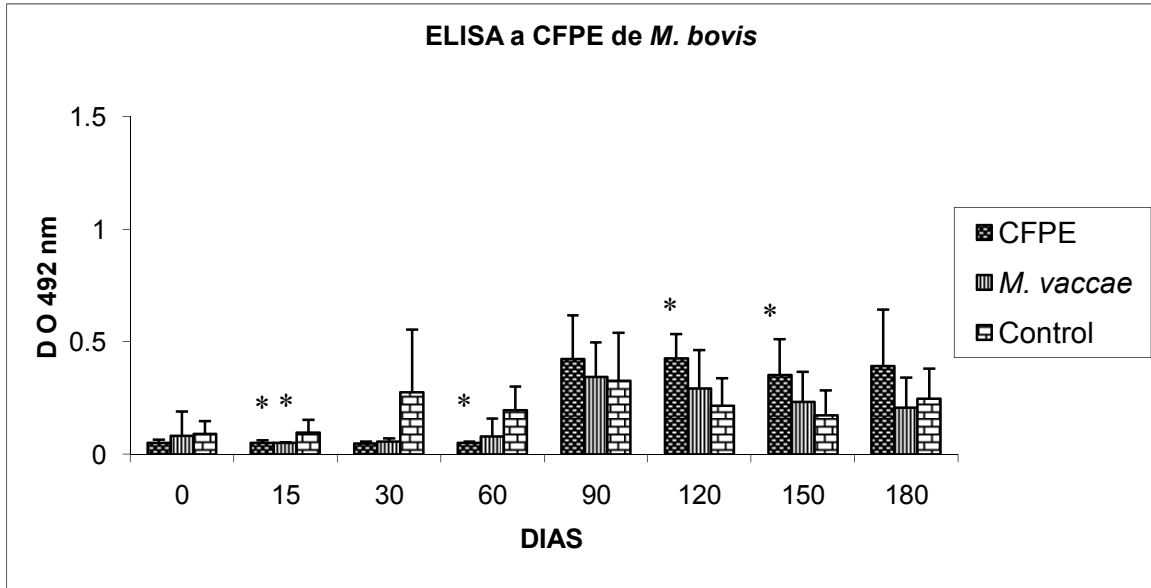
Gráfica 4. Promedios de producción de IFN- γ en plasma obtenido de sangre sin estimular a una DO 450 nm.

*Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

7.2 Resultados de ELISA

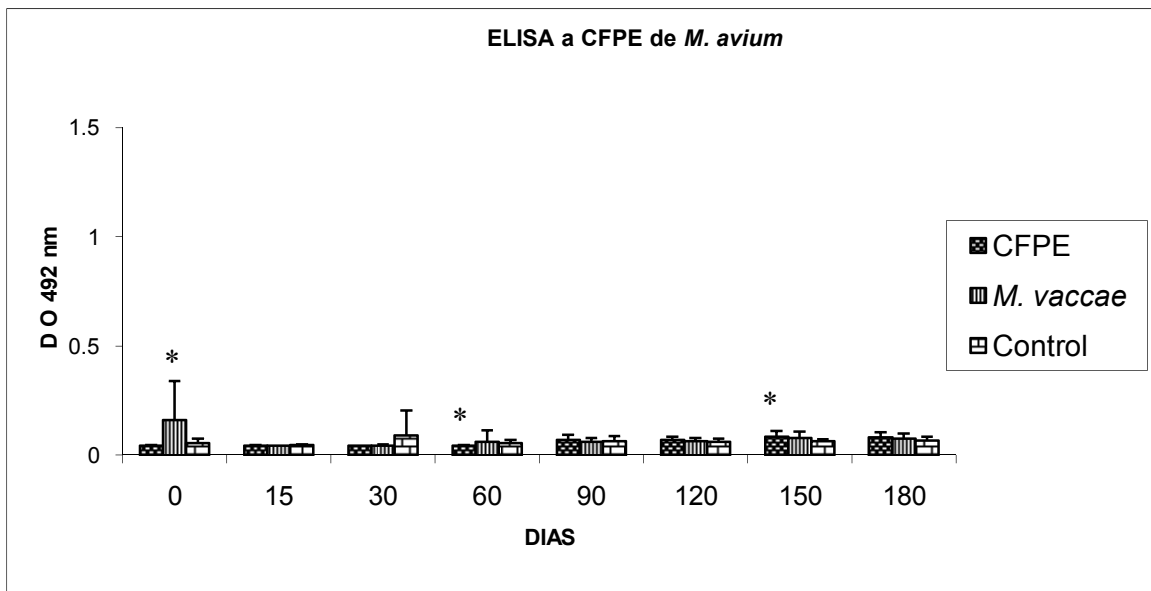
Se evaluó la inmunidad humoral de las beceras inmunizadas con las diferentes vacunas y el grupo control respectivamente a, partir de la prueba de ELISA doble comparativa, con placas sensibilizadas con CFPE's de *M. bovis* y *M. avium*.

En la gráfica 5 (pág. 35), se muestra el nivel de producción de anticuerpos en suero, empleando placas sensibilizadas con CFPE de *M. bovis* a lo largo de la evaluación. Se observó que al inicio del experimento los tres grupos presentaron valores similares en los niveles de anticuerpos. Después de la vacunación en los primeros 60 días no se apreció un incremento significativo en la producción de anticuerpos en el grupo vacunado con CFPE, sin embargo para los 90 días su producción alcanzó un nivel significativo 0.4238 ± 0.1941 D.O ($P>0.05$), que se mantuvo en valores similares hasta el final de la evaluación; de igual forma *M. vaccae* alcanzó niveles significativos de producción de anticuerpos a los 90 días con valores 0.3425 ± 0.1549 D.O ($P>0.05$), no manteniéndose al siguiente muestreo y fue disminuyendo gradualmente para el final del monitoreo. El grupo control alcanzó su nivel más alto de producción de anticuerpos a los 90 días 0.3275 ± 0.2110 D.O ($P>0.05$), manteniéndose a lo largo de la evaluación. El valor promedio de producción de anticuerpos obtenido para el grupo vacunado con CFPE en placas sensibilizadas con CFPE de *M. bovis* fue de 0.2238 ± 0.0939 D.O, para el grupo vacunado con *M. vaccae* fue de 0.1673 ± 0.1001 D.O y para el grupo control fue de 0.2024 ± 0.1343 D.O.



Gráfica 5. Promedios de lo de los niveles de producción de anticuerpos en placas sensibilizadas con CFPE de *M. bovis* a una DO 492 nm. *Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

En la gráfica 6 (pág. 35), se muestra el monitoreo en cuando a la producción de anticuerpos evaluado en suero con placas sensibilizadas con CFPE de *M. avium*. Al inicio del monitoreo los tres grupos mostraron niveles bajos de anticuerpos manteniéndose durante el final de la evaluación. Sin embargo al tiempo cero el grupo de *M. vaccae* mostró tener mayor nivel de anticuerpos contra *M. avium*.



GRAFICA 6. Promedios de los niveles de anticuerpos con placas sensibilizadas con CFPE de *M. avium* a una DO 492 nm. *Diferencias significativas entre la media del grupo no vacunado con respecto al grupo vacunado.

7.3 Resultados de ID

En la tabla 1 (pág. 37) se muestran los resultados de la prueba de ID simple que se realizó 10 meses después de la vacunación y los resultados de la prueba de ID doble comparativa que se realizó a 12 meses después de la vacunación. Las pruebas de ID se realizaron con el objetivo de observar si la vacuna de CFPE y la vacuna recombinante de *M. vaccae* interfieren en estas.

En la prueba de ID simple todos los animales salieron negativos. En la prueba de ID doble comparativa solo hubo 3 sospechosos, un animal por cada grupo.

TABLA 1. Resultados de la prueba de ID simple y doble comparativa de los tres diferentes grupos, además se anexa la diferencia de la D.O entre *M. bovis* y *M. avium* de la prueba de IFN- γ de la misma fecha que las pruebas de ID.

GRUPO	No. Animal	PBA. ID SIMPLE		PBA. DE ID DOBLE COMPARATIVA			
		Lectura final	Resultado	Lectura inicial (mm)	Lectura final (mm)	Diferencial	Resultado
CFPE	644	S/C ⁴	Negativo ⁵	13/9	S/C	-	Negativo
	645	S/C	Negativo	9/7	S/C	-	Negativo
	646	S/C	Negativo	9/6	10/10	3	Sospechoso
	592	S/C	Negativo	7/5	S/C	-	Negativo
	593	S/C	Negativo	9/7	S/C	-	Negativo
	591	S/C	Negativo	9/5	S/C	-	Negativo
	648	S/C	Negativo	5/5	S/C	-	Negativo
	649	S/C	Negativo	6/5	S/C	-	Negativo
	650	S/C	Negativo	9/6	S/C	-	Negativo
	598	S/C	Negativo	9/8	S/C	-	Negativo
<i>M. vaccae</i>	572	S/C	Negativo	6/5	S/C	-	Negativo
	580	S/C	Negativo	8/7	S/C	-	Negativo
	641	S/C	Negativo	6/5	S/C	-	Negativo
	581	S/C	Negativo	10/7	11/10	2	Sospechoso
	582	S/C	Negativo	9/7	S/C	-	Negativo
	586	S/C	Negativo	8/7	S/C	-	Negativo
	587	S/C	Negativo	6/5	S/C	-	Negativo
	643	S/C	Negativo	7/6	S/C	-	Negativo
	583	S/C	Negativo	8/7	S/C	-	Negativo
	585	S/C	Negativo	11/7	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	10/10	2	Sospechoso
	620	S/C	Negativo	10/6	S/C	-	Negativo
	622	S/C	Negativo	10/7	S/C	-	Negativo

⁴ S/C. sin cambios aparentes

⁵ Negativo. No hubo induración

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se consideró el empleo de CFPE de *M. bovis* como una vacuna, ya que se ha puesto de manifiesto, la importancia de las proteínas de secreción de *M. bovis* y *M. tuberculosis* en el desarrollo de una inmunidad protectora, siendo esta fundamentalmente dirigida por los linfocitos T CD4, productores de IFN- γ , IL-2, e IL-12, que actúan sobre los macrófagos para mejorar su capacidad fagocítica y bactericida, a su vez también el CFPE es altamente reconocido por los linfocitos T de memoria (58), no interfiere en la prueba de ID y no se ve afectada su eficacia por una previa sensibilización a micobacterias ambientales (76). Por otro lado se consideró el empleo de *M. vaccae* recombinante (38kDa) como vacuna, primordialmente por ser una micobacteria apatógena, de rápido crecimiento y que no induce reactividad a la prueba de ID (61). El empleo de bajas dosis (10^4 UFC) se seleccionó porque se ha observado que dosis bajas inducen preferentemente la respuesta inmune protectora contra *M. bovis* (77). El antígeno 38 kDa, se eligió por ser una proteína de secreción que se encuentra en concentraciones significativas en el CFPE de *M. bovis*, el cual es un fuerte inductor de la proliferación de linfocitos Th1 específicos, además de que el antígeno 38 kDa es una molécula blanco para los linfocitos T CD8 (66, 67).

Aunque en estudios anteriores se ha observado que la vacuna de CFPE de *M. bovis*, tiende a inducir una respuesta de tipo humoral y en menor grado una respuesta de tipo celular en bovinos (58). En nuestro estudio se observó primordialmente una respuesta de tipo celular a los 15 días postvacunación al incrementarse considerablemente el IFN- γ al PPD bovino a diferencia del grupo control permitiéndonos suponer la existencia de la inmunidad protectora; el grupo de CFPE no mostró al inicio ninguna sensibilización con *M. bovis*, *M. avium*, ESAT-6 y sus niveles de anticuerpos hacia CFPE de *M. bovis* y *M. avium* eran nulos, por lo que se consideró que esta respuesta se debió a la vacunación. Se observó que este grupo nuevamente respondió a los 90 días, explicando que esta respuesta muy probablemente se encontró influenciada por una exposición natural a *M. bovis* cepa de campo, ya que el grupo control al mismo tiempo manifestó una muy fuerte respuesta al PPD bovino al inducir una importante producción de IFN- γ ; con respecto al grupo vacunado con *M. vaccae* recombinante, no indujo una eficiente respuesta de tipo celular

como se esperaba, fue de igual forma hasta los 90 días que se vio un ligero aumento en la producción de IFN- γ al PPD bovino manteniéndose hasta los 180 días; probablemente por un desafío a *M. bovis* de campo (78). También se observan variaciones en la producción de la citocina al PPD aviar en los tres grupos poniéndonos de manifiesto la exposición continua a micobacterias atípicas. Es importante mencionar que los animales vacunados con *M. vaccae* recombinante, después de dos años se evaluaron ante el antígeno de 38 kDa y no fueron capaces de producir IFN- γ , indicándonos posiblemente la pérdida de la capacidad de secreción de este antígeno por *M. vaccae*.

En el presente trabajo no hubo un desafío experimental de los animales, la intención es que hubiera una infección natural a partir de cepas de campo de *M. bovis* sin embargo esto último no es posible asegurarlo dado que la prueba de ID comparativa resultó negativa en nueve de diez animales del grupo control y la producción de IFN- γ a partir del antígeno ESAT-6 solo aparece positivo en uno de ocho muestreos, pero por otro lado el hato tiene una alta prevalencia de TBb aunado a esto los tres grupos mostraron niveles muy significativos de anticuerpos, es decir 0.424 ± 0.194 D.O ($p > 0.05$), 0.342 ± 0.154 D.O ($p > 0.05$) y de 0.327 ± 0.211 D.O ($p > 0.05$) respectivamente a los grupos de CFPE, *M. vaccae* recombinante y el grupo control, considerando que el uso de dosis bajas vacúnales muestran menor cantidad de anticuerpos (77, 79), por lo tanto se considera que los resultados obtenidos hasta este momento no revelan diferencias claras en los parámetros considerados para la evaluación de las vacunas; por lo que se propone dar seguimiento a los animales hasta su etapa productiva donde se espera que pueda haber una mejor interpretación de los parámetros para la evaluación de las vacunas.

La prueba de ID se realizó en 2 ocasiones, a los 10 y 12 meses después de la vacunación. En la prueba de ID simple los tres diferentes grupos salieron negativos, y en la prueba doble comparativa salió un animal positivo por grupo, mostrando con esto que los grupos vacunados con CFPE y con *M. vaccae* recombinante no comprometen dicha prueba. Otro dato importante es que los resultados globales obtenidos de la prueba de ID doble comparativa muestran una reducción en la prevalencia de la enfermedad del 34% al 11%, por lo que se presume puede haber un beneficio al emplear estas vacunas en la resistencia

contra la enfermedad. Es importante aclarar que la prueba de ID es mediada por quimiocinas, mientras que la inmunidad mediada por células (resistencia a la enfermedad) es mediada por citocinas (80).

Es trascendente el poder diferenciar animales vacunados de infectados, por el hecho de que nos permitiría reducir el riesgo de que aquellos animales infectados sean identificados y segregados de la explotación con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad. Por lo tanto, se consideró el empleo del antígeno de secreción temprana de *M. bovis* (ESAT-6) el cual ya se mencionó es capaz de diferenciar animales vacunados de infectados ya que solo se encuentra en las cepas de *M. bovis* patógenas (10). También se ha reportado que el empleo de los antígenos ESAT-6 y CFP-10, no siempre presentan reactividad en los animales infectados y que además se ve afectada su producción por una previa sensibilización del ganado a micobacterias ambientales (81). Con respecto a nuestros resultados únicamente el grupo control presentó niveles de producción de IFN- γ a ESAT-6 a los 15 días postvacunación, debido posiblemente a la presencia de micobacterias atípicas, ya que al día cero, se observó un nivel alto de IFN- γ a PPD aviar.

9. CONCLUSIONES

- La vacuna de *M. vaccae* recombinante y de CFPE no interfieren en las pruebas de ID simple y doble comparativa.
- La vacuna de CFPE puede inducir una respuesta de tipo celular cuando se administra a una edad temprana sin necesidad de coadyuvantes, sin dejar de inducir una respuesta inmune de tipo humoral.
- Es importante considerar dar seguimiento a los animales ya que los resultados obtenidos hasta el momento no muestran diferencias claras en los parámetros para evaluar las vacunas.

10. ANEXO 1 reactivos

- SOLUCION DE PEGADO. Buffer de Carbonatos 0.06 M pH 9.6
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 3.8gr/l
Carbonato de sodio (Na₂CO₃) 1.93gr/l
Agua destilada 1l
- SOLUCION DE LAVADO. Buffer Fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.4 con NaCl y 0.1 % de Tween 20
Fosfato disódico hidrogenado (Na₂HPO₄) 1.1gr/l
Fosfato sódico dihidrogenado (NaH₂PO₄) 0.32gr/l
Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l
Tween 20 0.5ml/l
Agua destilada 1l
- SOLUCION BLOQUEADORA. 1.5% de leche descremada en PBS y 0.1% de Tween 20
Fosfato disódico hidrogenado (Na₂HPO₄) 1.1gr/l
Fosfato sódico dihidrogenado (NaH₂PO₄) 0.32gr/l
Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/l
Tween 20 0.5ml/l
Leche descremada en polvo 1.5 gr/100ml
Agua destilada 1l
- SOLUCION DE REVELADO. Buffer citratos pH 4.5
Acido cítrico (C₆H₈O₇) 4.6 gr/l
Citrato trisódico (Na₃C₆H₅O₇) 7.4 gr/l
Agua destilada 1l
Agregar al momento de su empleo:
Ortofenildiamina 4μg/10ml
Agua Oxigenada (H₂O₂) 4μg/10 ml
- CONTROL POSITIVO BOVINO DEL IFN-γ
0.01 % p/v thimerosal

- CONTROL NEGATIVO BOVINO DEL IFN- γ
0.01 % p/v thimerosal
- DILUYENTE VERDE. Diluyente para plasma
0.01 % p/v thimerosal
- BUFFER DE LAVADO. Concentración 20 X
0.01 % p/v thimerosal
- CONJUGADO. Concentración 100 X
Horseradish peroxidase labeled antibovine IFN- γ
0.01 % p/v thimerosal
- DILUYENTE AZUL. Diluyente para el conjugado
Concentración 5 X
0.05 % p/v thimerosal
- BUFFER ENZIMA-SUSTRATO
 H_2O_2
- CROMOGENO. Concentración 100 X
TMB en DMSO
- SOLUCIÓN DE PARO.
0.5 M H_2SO_4

11. ABREVIATURAS

BAAR	–	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	–	Bacilo Calmett Guerin
CD	–	grupo de diferenciación
CFP	–	Filtrado proteico de cultivo
CFPE	–	Extracto proteínico de filtrado de cultivo
DO	–	Densidades ópticas
ELISA	–	Inmuno ensayo ligado a enzimas
ESAT-6	–	Antígeno de secreción temprana
ID	–	Intradermoreacción
IFN	–	Interferón gamma
IgA	–	Inmunoglobulina A
IgG	–	Inmunoglobulina G
IgM	–	Inmunoglobulina M
IL	–	Interleucina
LAM	–	Lipoarabinomananos
NK	–	Células asesinas naturales
OMS	–	Organización Mundial de la Salud
PCR	–	Reacción en cadena de la polimerasa
PPD	–	Derivado proteico purificado
SAGARPA	–	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación
SpA	–	Factor surfactante
TBb	–	Tuberculosis bovina
Th1	–	Linfocito cooperador 1
THF	–	Factor de necrosis tumoral
UFC	–	Unidades formadoras de colonias
VIH	–	Virus de inmunodeficiencia humana

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Revista digital del Centro Nacional de Investigadores Agropecuarios de Venezuela 2004
http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/ne/arti/clavijo_a/arti/clavijo_a.htm
2. Periodismo de ciencias y tecnologías. Octubre del 2000
<http://www.invdes.com.mx/antiores/octubre2000/htm/vaca.html>
3. www.cuautitlan2.unam/2/. 2006
4. Padilla UJ. Evaluación de la respuesta inmune celular y humoral en bovinos inmunizados con proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium bovis*, inmunomodulados con interferón gamma y BCG contra la tuberculosis bovina (tesis licenciatura). México, Cuautitlán Izcalli: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM; 2004.
5. Kawamura I, Tsukada H, Yoshikawa H, Fujita M, Nomoto K, Mitsuyama M. IFN- γ producing ability as a possible marker for protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. J Immun 1992; 148: 2887-2893.
6. Stenge S, Modin RL. T-cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Current Opinion in Microbiol 1999; 2: 89-93.
7. Anderson P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. Infect. Immun 1994; 62: 2536-2544.
8. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, Orme IM. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Immun 1995; 85: 502-508.
9. Vordermier HM, Cockle PJ, Whelan AO, Rhodes S, Chambers MA, Clifford D, Huygen K, Tascon R, Lowrie 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 2000; 19(9-10) 200 1246-1255.
10. Van PLA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin Diagn. Lab. Immun 2000; 7: 155-160.
11. Seevatsan S, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionary recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 9869-9874.

12. Carter GR, William GC, Lemus GA. Bacteriología y microbiología veterinarias: Aspectos esenciales. México D.F: El manual moderno; 1982: 361-377.
13. Landsteiner K, Chase MW. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. Proc Soc Exp Biol Med 1942: 688.
14. Enarson DA, Riederer HL. The importance of *Mycobacterium bovis* to the Tuberculosis Epidemic in humans. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. In Thoen CO, Steele JH editors. Iowa State University Press/Ames USA XIX-XXI 1995.
15. Norma Oficial Mexicana. NOM- 031-Z00-1995. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria (CONAPROZ), Normas Oficiales Mexicanas en materia de Salud Animal en URL:
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/mrni/Doc222/2004>
16. Olvera CR. Tuberculosis: Enfermedad del presente o tuberculosis enfermedad del siglo XXI. Rev Ins Nac Enferm Resp Mex 1998; 11: 5-6.
17. Dolin PJ, Raviglioni MC, Kochi MC. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Org 1994; 172:211-220.
18. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev Sci Tech 2001; 20:71-85.
19. World Health Organization. 2002. Fact, Sheet No. 104
20. Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis: specificity, systemic and local native, and associated macrophage enzymes. Bacteriological reviews 1993: 85-182.
21. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 59-70.
22. Boletín SENASA noticias. Erradicando la brucelosis y tuberculosis bovina. Año 2 1999 febrero: 2-3.
23. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.
24. Acha PN, Boris S. Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3ª edición; 2001.
25. Ernst LB, Yuan CZ. Tratado de microbiología veterinaria. Zaragoza España: Acribia 1990: 229-240.

26. Ashford E, Whitney PR, Cosivi O. Epidemiology of selected micobacteria that infect humans and other animals en review scienfitic et thecnique. OIE/OMSA. Editado por Board – consejo editorial 2001; 20: 325-337.
27. Thoen OC, Hchzermeyer H, Himes ME. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis In: Thoen CO, Steele JE, editors. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Iowa: Iowa state University Press; 1995: 63-72.
28. Dirección General de Salud Animal
http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud-animal/campanas_zoosanitarias/tuberculosis_bovina.html
29. Schulz JA. Tratado de enfermedades del Ganado vacuno. Zaragoza España: ACRIBA, Tomo II: 104-115.
30. Reinout VC, Tom HM, Ottenhoff, Jos WM Van der Merr. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews* 2002: 294-309.
31. Dannenberg AM, Rook GA. Phatogenesis of pulmonary tuberculosis an interplay between tissue-damaging and macrophage-activating immune responses. In B.R. Bloom editor Washington D.C. 1994: 459-484.
32. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Inmun* 2001; 19:4089-4098.
33. Dunlap N, Briles D. Inmunología de la tuberculosis clínica médicas de Norteamérica. Interamericana Vol. VI tuberculosis 1993: 1.305-1.319.
34. Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of citotoxic and helper T-cell functions. *Annual Review of inmun* 1989; 7:309-337.
35. Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y, *et al.* Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2005; 2:142-153.
36. Michal JJ, Heirman LR, Wong TS, et al. Modulatory effects of dietary β -carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 1408-1421.
37. Bielefeldt OH. Role of cytokines in the pathogenesis and treatment of respiratory disease. Marcel Dekker New York 1995: 291-332.

38. Quinn P. Mechanisms of actions of some immunomodulators used in veterinary medicine. In Blecha F, Charley B editors. Immunomodulation in domestic food animals. Orlando: Academic Press 1990: 43-99.
39. Blecha F. In vivo use of interleukins in domestic food animals. In Blecha F, Charley B editors. Immunomodulation in domestic food animals. Orlando: Academic press; 1990: 231-252.
40. Kehrlí ME, Roth JA. Chemically induced immunomodulation in domestic food animals. Immun 1990: 103-109.
41. Morsey MA, Cox GJM, Van KAG, et al. Interleukin-2. In Myers MJ, Murtaugh MP editors. Cytokines in animals health and disease. New york, Marcel Dekker; 1995: 89-119.
42. Blecha F. Immunology. In Mesmann HJ, Pond WG editors. Biology of the domestic pig. Ithaca NY: Cornell University Press; 2000: 688-711.
43. Robert A, Smith DVM. Clínicas veterinarias de Norteamérica, práctica clínica en animales de producción: Inmunología. Buenos aires, Argentina: Inter-medica; 2004.
44. Fifist T, Corner LA, Rothel JS, Wood PR. Cellular and humoral immune responses of cattle to purified Mycobacterium bovis antigens. Scand J Imuno 1994; 39: 267-274.
45. Corvert J, Splitter G. Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4 lymphocytes by reverse transcriptase polymerase Chain reaction. Vet Immunol. Immupathol 1995; 49 (1-2): 39-50.
46. Dannenberg AM Jr. Delayed-Type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immun Today 1991; 12: 229-223.
47. <http://www.monografias.com/trabajos11/tubo/tubo.shtml/> julio/2007
48. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM™: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis 2001; 81:147-155.
49. Rittaco V, De Cantor IN, Barrera L, Errico F. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Res Vet Sci 1991; 50: 365-367.
50. Plackett P. An ELISA for detection of anergic tuberculosis cattle. Aus Vet J 1989: 66.
51. Fuentes XA, Castineiras MJ, Queralto JM. Bioquímica y patología molecular 2nded. Reverte Vol 1 1998.
52. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Grow BL. Use of polimerase Chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J Microbiol 1992; 30:255-258.

53. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, et al. Direct detection of *Mycobacterium bovis* from tissue samples: improvement of a DNA extraction method for PCR amplification. In: Tuberculosis in wildlife and domestic animals. Dunedin, Nueva Zelanda Ed University of Otago Press 1995: 60-63.
54. Buddle M, Bryce JM, Pollock MA, Skinner, Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *International Journal for Parasitology* 2003: 555-566.
55. Donnelly JJ, Umer JB, Shiver JW.. DNA vaccines. *Annu Rev Immun.* 1997; 15: 617-648.
56. Lenzini L, Rottoli P, Rottoli L. The spectrum of human tuberculosis. *Clin Exp Immun* 1997; 27:230-237.
57. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702
58. Wedlock DN, Vesoky B, Skinner MA, Lisle GW, Orme IM, Budle BM. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis*, culture filtrate proteins and interleukin -2 for protection against bovine tuberculosis. *Infectec Immun* 2000; 68:5809-5815.
59. Bosio CM, Orme IM. Effective, nonsensitizing vaccinations with culture filtrate protein against virulent *Mycobacterium bovis* infections in mice. *Infect Immun* 1998; 66:5048-5051.
60. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M et al. Mice that lack the interferon-g receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guérin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 178: 1.435-1.440.
61. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R et al. A Mutation in the interferon-g-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J.*
62. Wedlock. DN., Skinner MA, Lisle GW, et al. Vaccination of cattle with *Mycobarterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2005.
63. Stanford, J.L., At el. *Mycobacterium vaccae* in immunoprophylaxis and immunotherapy of leprosy and tuberculosis. *Vaccines* 1990. 8:525-530
64. Hernandez-Pando, R., and G. A. W. Rook. The role of TNF- γ in T- cell mediated inflammation depends on the TH1/TH2 cytokine balance. *Immunology* 1994. 82:591-595

65. Rook, G.A. W., R. Hernandez-Pando. The patogénesis of the tuberculosis. *Annu. Rev Microbiol.* 1996. 50:259-284.
66. Espitia C, Cervera I, González R, Mancilla R. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immun* 1989; 77(3):373-377.
67. Vordermeier HM, Harris DP, Friscia G, Román E, Surcel HM, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. T cell repertoire in tuberculosis: selective anergy to an immunodominant epitope of the 38-kDa antigen in patients with active disease. *J Immun Eur* 1992; 22(10):2631-2637.
68. Castañon AM, López V, Espitia PC, Hernández PR. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2005; 85(1-2):115-26.
69. Budle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldewll FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium* 1995.
70. Wedlock DN, Keen DL, McCarthy AR, Andersen P, Buddle BM. Effect of different adjuvants on the immune responses of cattle vaccinated with *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *Vet Immun Immunopathol* 2002; 86: 79-88.
71. Vordermeier HM, Chambers MA, Cocle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70:3026-3032.
72. Buddle BM, Wedlock DN, Denis M. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. Wallaceville Research centre, New Zealand 2006; 112:191-200.
73. Balwin SL, D'Souza C, Roberts D, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, Ulmer JB, Huygen K, McMurray DM, Orme IM. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66:2951-2959.
74. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
75. Walravens K, Marche S, Rosseels V, et al. Interferon- gamma diagnosis tests in context of bovine mycobacterial infections in Belgium. *Vet Immun Inmonopathol* 2002; 87: 401-406.

76. Brandt L, Conha JF, Weinreich J, Olsen AW, Chilma B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental *Mycobacterium* block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002; 70:672-678.
77. 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.
78. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jawett G, McCarthy AR, Heslop J, De Lisle GW. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. *Veterinary Science* 1995; 59:10-16.
79. 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.
80. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascade in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999; 7:307-312.
81. Sopp P, Howard CJ, Hope JC. Flow cytometric detection of gamma interferon can effectively discriminate *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated cattle from *M. bovis* – infected cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. United Kingdom 2006; 12:1343-1348.