



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL
EXTRACTO PROTÉICO DE *Mycobacterium bovis* DE VACAS
VACUNADAS CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA,
Y DE VACAS TUBERCULOSAS.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTÉCNISTA**

P R E S E N T A

MIRIAM HERNÁNDEZ MENDOZA

DIRECTORES: M en C LAURA JARAMILLO MEZA

Dr. FERNANDO DIAZ OTERO

MVZ RAFAEL PEREZ GONZALEZ



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.



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

UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

**ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa 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:

ANALISIS DE PERFIL DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO AL EXTRACTO
PROTEICO DE Mycobacterium bovis DE VACAS VACUNADAS CONTRA
LA TUBERCULOSIS BOVINA Y DE VACAS TUBERCULOSAS.

Que presenta la pasante Miriam Hernández Mendoza.

Con número de cuenta: 097347329 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 2 de Febrero de 2011.

PRESIDENTE MVZ. Humberto Gustavo Arellano Sánchez.

VOCAL MVZ. José Antonio Licea Vega.

SECRETARIO MVZ. Rafael Pérez González.

1er SUPLENTE MVZ. José Francisco Morales Álvarez.

2º SUPLENTE MVZ. Eusebio Valentino Villalobos García.

Humberto Arellano Sánchez
José Antonio Licea Vega
Rafael Pérez González
José Francisco Morales Álvarez
Eusebio Valentino Villalobos García

El presente trabajo se realizó en Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y pecuarias (INIFAP), como parte de las investigaciones que se desarrollan en el área de "Tuberculosis Bovina".

Trabajo parcialmente financiado por los proyectos de investigación:

SAGARPA-CONACYT, No. 12314

Fondos Fiscales del INIFAP, No. 3216943P

Becaria del proyecto de investigación SAGARPA-CONACYT, No. 12314.

DEDICATORIAS

A ti Dios por haberme dado la oportunidad de vivir, por la familia maravillosa que me prestaste y por tantas bendiciones a lo largo de mi vida.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido formar parte de ella; y forjar paso a paso mi formación académica y personal.

A Macario Hernández †, por ser el mejor padre, ya que con tus esfuerzos, tus enseñanzas y tu amor hiciste de mí una mujer profesionalista. No pudiste ver este logro, pero se que estas muy orgulloso de tu cachorro y que hoy eres mi fortaleza. Gracias

A María de los Ángeles Mendoza, por ser la mejor madre; tu autoridad es fértil hoy en mí, gracias por estar en todo momento conmigo... por esas risas y aquellas lágrimas que nos han unido. Por los consejos que enriquecen mi vida y me hacen seguir adelante. Gracias...

A ti Leonardo Macario, hijo mío; este es uno de los tantos logros que te dedicare, porque eres la luz de mi vida, mi energía para luchar mil batallas mas. Gracias por el amor y la inocencia que irradas para mí.

A mis amigos, Juanita, Xochitl, Héctor, Cuautli, Armando, Alfredo, Steve, Osvaldo; por que han vivido conmigo etapas de mi vida que nunca olvidare.

A mi familia perruna y gatuna: A ti teckel, porque me has dado tus atenciones y cariño incondicional. A ti Luna, por brindarme tú cálida y alegre compañía. A Yaki, Victoria, Tulio, Palomo, Kimba, Tomy, Kity, por soportarme y darme su cariño. A Pequeña †, Katy †, Tigre †, Terry †, Andy †, Bonita †, Thor †, Golondrina, Camila †, Tobi, Lucky †, Níko , Leo, Bebe, Duqueza, Karla, Duque, y si olvido algún nombre es porque eran tantos! Gracias, por que siempre estuvieron para mí.

A To, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias

A todos mis Tíos, Tías, Primos y Primas; mencionar a unos... sería olvidar a otros...

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la M en C. Laura Jaramillo, por su amistad, por darme la oportunidad de realizar este trabajo; por la paciencia que me tuvo... Gracias por todo su tiempo y su conocimiento.

A mi asesor el Dr. Rafael Pérez, por brindarme su confianza y amistad, gracias por todo lo que he aprendido de usted.

A mi asesor el Dr. Fernando Díaz, por su amistad, por todas las facilidades que me brindo para este trabajo; y por el tiempo, paciencia y confianza que deposito en mí.

A Xochitl Gonzales, por tu amistad y por toda la paciencia que me tuviste... Gracias por todos los conocimientos que compartiste conmigo.

A El Dr. Fernando Osnaya, por su amistad y por el tiempo que me brindo para el trabajo estadístico.

A El Dr. Humberto Arellano, por su amistad, paciencia y consejos que me brinda.

A mis sinodales:

*Dr. Humberto Arellano,
Dr. José Licea,
Dr. Rafael Pérez,
Dr. Francisco Morales,
Dr. Valentino Villalobos; Por su tiempo y observaciones que me dedicaron para finalizar este trabajo.*

A El Dr. Liborio Carrillo por su valiosa amistad, gracias por los consejos y las enseñanzas que ha dejado en mí.

INDICE GENERAL

	Resumen	1-2
1.	Introducción	3-4
1.1	Taxonomía y características del género <i>Mycobacterium</i>	5-6
1.2	Estructura de la envoltura celular micobacteriana	7-11
1.3	Impacto económico	12-13
1.4	Salud pública	13-15
1.5	patología de la tuberculosis	15-16
1.6	Respuesta inmune a la infección por <i>Mycobacterium bovis</i>	17-21
1.7	Relevancia de los antígenos del extracto proteico de <i>Mycobacterium bovis</i>	21-26
1.8	Diagnóstico de la tuberculosis	27
1.8.1	Tuberculina	27-28
1.8.2	Análisis Bacteriológico e histopatológico	28-29
1.8.3	Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	29-30
1.8.4	Prueba de INF- γ	30
1.9	Vacunas	31
1.9.1	Características de la vacuna "ideal"	31
1.9.2	Prevención de la TB mediante vacunación	31-32
1.9.3	Vacuna del Bacilo de Calmette Guerin (BCG)	32-33
1.9.4	Vacuna Subcelular a base del Extracto Proteico del Filtrado de Cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i> .	33-34
1.9.5	Inmunomodulación	34-35
2.	Justificación	36
3.	Hipótesis	36
4.	Objetivo general	37
5.	Objetivos particulares	37
6.	Materiales y métodos	37-38
6.1	Estudio de vacunación contra la tuberculosis bovina.	38
6.1.1	Animales de experimentación.	38
6.1.2	Diseño experimental	38-39

6.1.3	Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular.	39
6.2	Selección de animales infectados reactivos.	39
6.3	Selección de animales no reactivos.	39
6.4	Obtención de los Extractos Proteicos del Filtrado de Cultivo.	40
6.5	Técnica de ELISA	40-41
6.6	Prueba de interferón gamma (IFN- γ)	41
6.7	Análisis electroforético del CFPE de <i>M. bovis</i> .	41-42
6.8	Análisis de Inmunotransferencia.	42
6.8.1	Electrotransferencia	42-43
6.8.2	Inmunotransferencia	43
6.9	Análisis Estadístico	43
7.	Resultados	44-67
8.	Discusión	68-77
9.	Conclusiones	78-79
10.	Bibliografía	80-90
11.	Anexos	91-94
12.	Glosario	95-105

INDICE DE AUXILIARES		pag.
Cuadro I	Clasificación del genero <i>Micobacterium</i>	5
Cuadro II	Clasificación de las Micobacterias de acuerdo a su velocidad de crecimiento, según Runyon	6
Cuadro III	Especies micobacterianas y animales que afectan	11
Figura 1 A	Estimaciones de tuberculosis humana en Latinoamérica	14
Figura 1 B	Estimaciones de tuberculosis bovina en Latinoamérica	14
Figura 2	Formación de un granuloma en la tuberculosis.	16
Cuadro IV	Principales proteínas antigénicas de <i>Mycobacterium bovis</i> .	26
Figura 3	Electroforesis del CFPE de <i>M. bovis</i> cepa AN5 en geles SDS-page al 11.5 %.	44
Gráfica 1	Valores promedio de producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con el PPD de <i>M. bovis</i> .	46
Gráfica 2	Valores promedio de producción de IFN - γ en cultivos de sangre completa estimulados con el PPD de <i>M. avium</i> .	47
Gráfica 3	Valores promedio de los niveles de anticuerpos al CFPE de <i>M. bovis</i> , evaluados por ELISA.	48
Gráfica 4	Valores promedio de los niveles de anticuerpos al CFPE de <i>M. avium</i> , evaluados por ELISA.	49
Gráfica 5	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con BCG	53
Gráfica 6	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con CFPE	53
Gráfica 7	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con CFPE + IFN γ	54
Gráfica 8	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo control	54
Figura 4	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 0, en los diferentes grupos y grupo control	55

Figura 5	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 61, en los diferentes grupos y grupo control	55
Figura 6	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 103, en los diferentes grupos y grupo control	55
Figura 7	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 173, en los diferentes grupos y grupo control	56
Figura 8	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 43 posdesafío, en los diferentes grupos y grupo control	56
Figura 9	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 72 posdesafío, en los diferentes grupos y grupo control	56
Cuadro V	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> al día 0, antes de la vacunación en los diferentes grupos	57
Cuadro VI	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> a los 61 días posvacunación en los diferentes grupos	57
Cuadro VII	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> a los 103 días posvacunación en los diferentes grupos	58
Cuadro VIII	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> a los 173 días posvacunación en los diferentes grupos	58
Cuadro IX	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> a los 43 días posdesafío en los diferentes grupos	59
Cuadro X	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> a los 72 días posdesafío en los diferentes grupos.	59
Cuadro XI	Prueba de χ^2 en los grupos vacunados y control para los antígenos del CFPE de <i>M. bovis</i> , etapas prevacunación y posvacunación.	60
Cuadro XII	Prueba de χ^2 en los grupos vacunados y control para los antígenos del CFPE de <i>M. bovis</i> , etapas posvacunación y posdesafío.	60
Cuadro XIII	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con BCG, en los diferentes muestreos.	61
Cuadro XIV	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con CFPE, en los diferentes muestreos.	61
Cuadro XV	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo vacunado con CFPE +IFN, en los diferentes muestreos	62

Cuadro XVI	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo control, en los diferentes muestreos	62
Cuadro XVII	Resultados de las pruebas de tuberculina, ELISA e IFN - γ en el grupo reactor	64
Figura 10	Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> del grupo positivo.	64
Cuadro XVIII	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo reactor (positivo)	65
Cuadro XIX	Porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo negativo	65
Gráfica 9	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo de bovinos reactivos.	66
Gráfica 10	Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo de bovinos negativos a la prueba de tuberculina.	66
Cuadro XX	Intensidad de reconocimiento antigénico al CFPE de <i>M. bovis</i> en el grupo reactor.	67
Cuadro XXI	Prueba de χ^2 para los grupos reactivos y no reactivos a la tuberculina a los antígenos del CFPE de <i>M. bovis</i>	67

RESUMEN

La tuberculosis bovina es uno de los problemas más graves a los que se enfrenta la ganadería nacional, sobre todo en ganado destinado a la producción de leche donde la enfermedad muestra mayor incidencia. Debido a ello, la vacunación junto con un diagnóstico y manejo adecuados deben de considerarse la mejor estrategia de prevención y control. Con ese propósito la cepa vacunal BCG se ha utilizado a nivel experimental en los bovinos considerando variables como: vía de inoculación, cepa vacunal, dosis y edad de los animales, con resultados variables. Para las estrategias del progreso de mejores vacunas se parte de identificar aquellos antígenos capaces de estimular y activar linfocitos Th1, que se caracterizan por producir cantidades significativas de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), citocinas que se asocian con la resistencia anti-micobacteriana. En relación a la búsqueda de este tipo de antígenos se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de protección contra la enfermedad; este hecho se ha utilizado como argumento para sostener que los antígenos secretados durante el metabolismo activo de la micobacteria, y que están presentes en los extractos de filtrado de cultivo (CFPE) de *Mycobacterium bovis* son esenciales para el propósito buscado. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil de reconocimiento antigénico al CFPE en vaquillas vacunadas contra la tuberculosis bovina y vacas tuberculosas; y realizar un estudio comparativo de la respuesta inmune entre los grupos vacunados con BCG o con el CFPE; de igual modo se determinó el efecto inmunomodulador del IFN- γ exógeno en la respuesta de bovinos vacunados con el CFPE. Para lo cual se utilizó un grupo de 24 becerras Holstein de 8 a 12 meses de edad, divididas en cuatro grupos. El primer grupo se inmunizó con 300 μ g del CFPE de *M. bovis*; el segundo grupo con la misma dosis del CFPE, pero dos días antes de la vacunación recibieron 200 ng de IFN- γ bovino recombinante vía subcutánea; el tercer grupo con la vacuna BCG cepa danesa 1×10^6 UFC/ml; y el cuarto grupo, permaneció sin inmunizar. Posteriormente se revacunaron a los 21 días y a los 6 meses posvacunación se desafiaron intratraquealmente con 10^5 UFC de una cepa de campo. A los 5 meses posdesafío se sacrificaron para evaluar el grado de protección. La respuesta inmune celular se monitoreó a intervalos de 21 días mediante la producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con el PPD bovino y el PPD aviar. Para evaluar la respuesta humoral se efectuó un ELISA comparativo empleando el CFPE de *M. bovis* y el de *M. avium*. Sueros de los animales obtenidos en diferentes muestreos se emplearon para efectuar el análisis de reconocimiento antigénico mediante la técnica de inmunotransferencia; conjuntamente con sueros de animales naturalmente infectados o reactores a la prueba de tuberculina doble comparativa, ELISA e INF- γ . Los resultados de producción de IFN- γ mostraron una respuesta significativa en el grupo vacunado con BCG durante las primeras 12 semanas. A las 17 semanas posvacunación se observó una respuesta inmune atípica en todos los grupos debida a la colonización de los animales por *Corynebacterium xerosis*. Después del desafío, la producción de la citocina aumento en todos los grupos, manteniéndose elevada hasta el sacrificio. En relación a la respuesta humoral el grupo inmunizado con CFPE más IFN- γ manifestó una mayor respuesta de anticuerpos a *M. bovis*. En el análisis de inmunotransferencias se observó que los animales que se emplearon para el estudio de vacunación mostraron reconocimiento a varias proteínas del CFPE de *M. bovis*, pese a que eran negativos a las diferentes pruebas diagnósticas empleadas cuando se seleccionaron, señalando con ello la “sensibilización” de su sistema inmune por micobacterias atípicas o bacterias relacionadas. Entre el 40 y 50% de los animales antes de la vacunación, considerados grupo negativo o grupo no reactor

mostró reactividad a las proteínas de: 60, 50-55, 45-47 y 32 (Ag 85) kDa. El análisis en las etapas posvacunación y posdesafío mostraron diferencias tanto en el número de antígenos reconocidos como en intensidad de reconocimiento o reactividad en función del tiempo en los grupos tratados y control, aún entre animales pertenecientes al mismo grupo. Los animales de los diferentes grupos vacunados y control exhibieron baja reactividad hacia los antígenos de 216, 132, 26, 23, 19, 10 y 6 kDa durante las diferentes fases experimentales, incluyendo el periodo posdesafío. En el grupo de bovinos reactivos la reactividad e intensidad de reconocimiento a los diferentes antígenos fue mayor, teniendo un nivel significativo para los antígenos de: 216, 200, 70, 38, 35, 23, 22, 19, 10 y 6 kDa. Los cuales pueden tener utilidad diagnóstica, y permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Las diferencias en el reconocimiento del grupo reactor con la del grupo control infectado experimentalmente hacia las proteínas de 38, 26, 23, 10 y 6 kDa, pueden deberse a la cronicidad de la infección en los animales de campo seleccionados para el estudio, pues la mayoría de ellos presentaba niveles altos de anticuerpos al CFPE de *Mycobacterium bovis*. De acuerdo a los resultados de producción de IFN- γ la vacunación de vaquillas con la vacuna BCG cepa danesa a una dosis de 1×10^6 UFC/ml indujo preferentemente una respuesta inmune celular; mientras que la aplicación exógena de IFN- γ moduló de manera negativa la respuesta celular, favoreciendo la respuesta humoral en el grupo vacunado con el CFPE; por tanto es conveniente que la vacunación de los animales contra la tuberculosis bovina se aplique a edad temprana para lograr el desarrollo de una inmunidad protectora y específica, debido a que se reduce la sensibilización por micobacterias ambientales o bacterias relacionadas.

1. INTRODUCCION

La tuberculosis bovina (TB) se define como una enfermedad cosmopolita infecto-contagiosa, crónica y progresiva que se caracteriza por la formación de granulomas básicamente en nódulos linfáticos y pulmón, pero también puede afectar órganos digestivos, órganos genitourinarios, huesos y articulaciones, o difundirse por todo el organismo del animal y es producida principalmente por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) La enfermedad guarda importancia por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que ocasiona a la industria pecuaria, debido a su carácter enzoótico. Las pérdidas económicas, en nuestro país, se calculan en más de 250 millones de pesos anuales, por conceptos, entre otras causas, de eliminación de ganado infectado, aseguramientos parciales de canales, rompimientos de líneas genéticas, retrasos y disminución de las lactancias (1,2). En los últimos años, la tuberculosis ha sido foco de mayor atención debido no solo al hecho de un incremento de los casos, sino también a las políticas de comercio que se establecen con los países vecinos, incluidos los programas de inocuidad alimentaria (3). Los índices de incidencia y prevalencia de la enfermedad varían de acuerdo al tipo de explotación a la que se someten los animales y al área geográfica; registrándose por tanto los índices mas bajos de prevalencia para ganado de carne en el norte del país (< 0.50%) y, los índices mas altos en ganado de leche localizado en el centro y sur de la República Mexicana (16.5%). (4,5)

La enfermedad constituye un riesgo latente para la salud humana, ya que se ha determinado que *M. bovis* es responsable de aproximadamente el 3% de los casos de tuberculosis humana a nivel mundial. Por otro lado, se ha observado que existe una correlación entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado con la prevalencia en humanos. Es así que en países industrializados, el control de la enfermedad en el ganado y la pasteurización de la leche han reducido drásticamente la incidencia de infección por *M. bovis*. Por el contrario, en países en vías de desarrollo no existen programas tan intensos de control y vigilancia, por lo que la presencia de tuberculosis en hatos lecheros representa un riesgo considerable en salud pública (6,7). De igual modo, se ha determinado que la epidemia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) favorece la trasmisión zoonótica, particularmente en países con alta prevalencia de la enfermedad en su ganado bovino, en los cuales las condiciones socio-sanitarias

coadyuvan a la infección; es así, que la relación *M. bovis* -ganado-humano continua siendo un motivo de preocupación. (8)

Los programas de control de la enfermedad basados en la tuberculinización y el sacrificio de los animales positivos ha sido el éxito en la erradicación, o en una marcada disminución de la incidencia de la enfermedad en países industrializados; no obstante, se ha observado que estos programas de prueba y sacrificio solo son efectivos en países, donde no hay animales de vida salvaje que actúen como reservorios de la enfermedad, ya que estos juegan un papel importante en la propagación de la micobacteria al ganado, razones por las cuales, la erradicación de la enfermedad se complica aún mas bajo estas circunstancias (9,10). Aunado a ello, hay que considerar la resistencia adquirida por la bacteria hacia algunos antimicrobianos y la presencia en los hatos de animales anérgicos, que esparcen la micobacteria e infectan animales susceptibles; además, la presencia de la enfermedad es silenciosa en muchos países del mundo. Publicaciones sobre la infección por tuberculosis, permiten suponer que se trata de una enfermedad de alta incidencia y posiblemente *in crescendo*, razón por la cual la enfermedad ha ganado gran importancia a nivel mundial y los estudios de investigación que se hacen en este campo, están encaminados al conocimiento de la patogénesis, bacteriología, epidemiología, bioquímica y biología molecular de *M. bovis*; que permitan por un lado, lograr el desarrollo de vacunas eficientes para el control de la enfermedad, así como la identificación y caracterización de antígenos específicos del complejo tuberculosis para el diagnóstico oportuno; y por otro lado, delimitar la propagación de la micobacteria por los animales de vida salvaje (4,6, 11).

En países con alta incidencia, como México, donde la eliminación de los animales positivos a TB es socialmente insostenible y causa importantes pérdidas económicas, la erradicación o por lo menos la reducción de la incidencia de la enfermedad se torna complicada; por tanto, justificadamente la vacunación se ha considerado la mejor alternativa para lograr el control de la enfermedad. Los objetivos que se buscan al establecer un programa de vacunación es prevenir la enfermedad dentro de una zona, que los animales expuestos a *M. bovis* sean capaces de resistir la enfermedad mediante la inducción de una inmunidad protectora de larga vida, y que no sean foco de infección. Es deseable que los animales no reaccionen a la prueba de intradérmica de la tuberculina. No obstante el desarrollo de pruebas que ayuden a distinguir entre animales infectados de animales vacunados con el Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) podría ser de gran ayuda en el diagnóstico temprano de la infección (12, 13)

1.1 TAXONOMÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden Actinomycetales, (**Cuadro I**). Es uno de los géneros más antiguamente definidos. El nombre inicialmente designaba a un grupo de organismos que crecían como películas algodonosas parecidas a hongos sobre medio líquido (14)

Cuadro I. Clasificación del Género	
Dominio	Bacteria
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género	<i>Mycobacterium</i>

Las micobacterias son bacterias aerobias, no móviles, ácido alcohol-resistentes (BAAR), que no producen esporas, y no presentan cápsula. Se les considera Gram positivas, aunque retienen en grado bajo el colorante primario (cristal violeta). Las micobacterias se han definido en relación con una propiedad tintórea característica, que depende de la riqueza en lípidos de su pared celular, son relativamente impermeables a varios colorantes básicos; pero una vez que se han teñido, retienen estos colorantes persistentemente. Resisten la decoloración con disolventes orgánicos acidificados, por lo cual se han denominado acidorresistentes. La tinción elegida para las micobacterias en la tinción de Ziehl-Neelsen, ya que como se mencionó anteriormente con la tinción de Gram se tiñen débilmente. Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos de 0.2 a 0.6 μm de diámetro y de 1 a 4 μm de longitud. Aparecen como células aisladas, pero con frecuencia se encuentran en grupos pequeños y a veces en masas compactas en las que no se puede distinguir cada bacilo (14,15).

El género incluye más de cien especies que se dividen en tres grupos para fines de estudio: Complejo tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum* y *M. microti*, *M. avium*, *M. caprae*, *M. pinipendii*, *M. canetti*;

Complejo *leprae*, que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murium*; y las micobacterias atípicas. Donde se ubican todas las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, estas pueden ser patógenas, patógenas oportunistas o saprófitas (16,17, 18). Sin embargo, de acuerdo a otras características fenotípicas Timpe y Runyon en 1950, propusieron una clasificación de las especies micobacterianas basada en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales, **(Cuadro II)**.

Las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, se consideran aerobios estrictos y su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. La especie *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación de 10 a 15 horas, por lo que su crecimiento en medios de cultivo no se consigue hasta la 3 o 4 semanas como mínimo. Las formas saprófitas tienden a desarrollarse con mayor rapidez, proliferan a 22° C, producen más pigmento y son menos ácido-resistentes que las formas patógenas (19).

CUADRO II. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS DE ACUERDO A SU VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, SEGÚN RUNYON (18)

Micobacterias de crecimiento lento			Micobacterias no Tuberculosas (MNT) de crecimiento rápido
Grupo I. Fotocromógenas	Grupo II. Escotocromógenas	Grupo III. No cromógenas	Grupo IV. No cromógenas
<i>M. asiaticum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. bovis</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i> <i>M. terrae</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>

1.2 ESTRUCTURA DE LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIANA

Las micobacterias se consideran tradicionalmente diferentes del resto de las bacterias, debido a su estructura y composición química particular de la pared. En sentido amplio la envoltura celular micobacteriana incluye la membrana plasmática y la pared celular de la bacteria, constituida por complejos de micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) y lipoarabinomanosa (LAM). A su vez el mAGP está formado por polímeros de arabinogalactano, peptidoglicano y ácidos micólicos. El peptidoglicano de la pared celular es un polímero altamente entrecruzado, formado por aminoazúcares y aminoácidos (unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-glicililmurámico), que se encuentra rodeando a la membrana plasmática; las moléculas de ácido murámico presentes en su estructura están unidas covalentemente al complejo micolil-arabinogalactano, formado por el arabinogalactano (polisacáridos de arabinosa y galactosa), que se encuentran esterificando a los ácidos micólicos (ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono) (19).

Otro grupo importante de componentes de la pared celular son los acil trealosa-2'-sulfatos. Estos pueden ser importantes en la virulencia, ya que la mayoría de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, elaboran sulfolípidos ácidos, que pueden estar involucrados en la inhibición de la fusión fago-lisosoma (20). La segunda molécula que domina la envoltura de las micobacterias, es el polisacárido lipoarabinomanosa (LAM), formado por residuos de D-arabinosa y D-manosa. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunoregulatoras, entre las que se encuentran por un lado anular la activación de las células T, inhibir la activación de los macrófagos mediada por el IFN- γ , así como la actividad de la proteína quinasa C; también estimula la producción de citocinas por los macrófagos, las cuales pueden provocar muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis (21).

Estructura.-El bacilo tuberculoso obtenido a partir de los animales presenta un aspecto típico de bacilo delgado ligeramente incurvado o curvado, pueden ser de estructura uniforme, pero en ocasiones tienen un aspecto arrosariado, con vacuolas no teñidas distribuidas irregularmente o prominencias ligeramente teñidas. En los medios de cultivo pueden presentar formas cocoides o filamentosas. Las cepas difieren en su

tendencia a crecer como células discretas o como largos agregados trenzados, llamados cuerdas de serpentinias (14, 15,18).

Crecimiento.- El bacilo tuberculoso es un aerobio estricto. Puede crecer en medios a base de huevo (Lowenstein-Jensen) y medios semisintéticos base agar (Stonebrink, Middlebrook 7H10 ó 7H11), Requieren una fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (amonio ó aminoácidos) así como sales minerales; el crecimiento se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos.

El crecimiento del bacilo tuberculoso en los medios de cultivo y en animales es típicamente lento: el tiempo de duplicación más corto observado en medios ricos es de 12 horas (17, 18).

Lípidos.- La característica química más sorprendente de las micobacterias es su alto contenido en lípidos, con cantidades que oscilan entre el 20 y 40 % de su peso seco. Se muestran varias fracciones lipídicas, definidas por las condiciones utilizadas para su extracción a partir de los organismos desecados. La sorprendente abundancia de lípidos en la pared celular (60 % de su peso seco) explica el carácter hidrófobo de los organismos, que se muestra por su tendencia a adherirse a los otros durante el crecimiento, en medios acuosos y a flotar en la superficie a pesar de añadir al medio algún detergente que facilite la dispersión. La riqueza en lípidos de la pared, probablemente puede explicar también algunas de las otras propiedades características de las micobacterias, por ejemplo, la relativa impermeabilidad a los colorantes, la acidorresistencia y la resistencia a la acción bactericida de los anticuerpos, junto con el complemento. La enorme cantidad de lípidos en la pared puede contribuir también a la lentitud de crecimiento, tanto al dificultar el paso de las sustancias nutritivas al interior de la célula, como al consumir gran parte de la capacidad biosintética de ésta. La adaptación biológica del bacilo tuberculoso se parece a la de la tortuga; lenta, pero protegida por una armadura (19, 22)

Entre los lípidos extraídos con disolventes orgánicos neutros se hallan las *ceras* (ésteres de ácidos grasos con alcoholes) y los *glucolípidos*, denominados también micósidos (compuestos lípidos solubles en los cuales las fracciones de lípidos y carbohidratos están unidas covalentemente). Aparte de las micobacterias, sólo las corinebacterias, por

lo que se sabe en la actualidad, poseen ceras verdaderas, y algunas de ellas son en ocasiones acidorresistentes (18, 23).

Aunque se encuentran ácidos grasos diferentes en los lípidos de las micobacterias, uno de éstos, el *ácido micólico*, parece hallarse sólo en estos organismos. Estos ácidos grasos, grandes, saturados con ramificaciones A y B hidroxiladas, se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos (19, 24)

Factor cord.- La asociación de la virulencia con el crecimiento formando serpentinias condujo a indagar, en las bacterias, un componente de superficie causante de ambas propiedades. Bloch extrajo de las cepas virulentas con éter de petróleo una sustancia denominada *factor cord*, considerada como responsable de ambas características: las células, después de la extracción, habían perdido su virulencia (fenotípicamente) y podían dispersarse fácilmente en medios acuosos. El *factor cord* ha sido identificado como un micósido, 6,6'-dimicoliltrehalosa (Diferentes pruebas relacionan el *factor cord* con la virulencia (19,20):

- 1) Esta sustancia es tóxica: inhibe la migración de los leucocitos polimorfonucleares normales *in vitro* (como lo hace el bacilo tuberculoso virulento), y mata al ratón tras la administración subcutánea de 10 g.
- 2) Es más abundante en las cepas virulentas.
- 3) Su extracción, como se ha dicho anteriormente, vuelve las células no virulentas (aunque permanecen vivas).
- 4) El bacilo tuberculoso obtenido tras pases repetidos en animales o de cultivos jóvenes es más virulento y posee un mayor contenido en *factor cord* que las células de la misma cepa de cultivos viejos.

El *factor cord* contribuye probablemente de un modo sustancial a la acción patógena. Sin embargo, la ausencia de inmunidad humoral frente al bacilo tuberculoso hace imposible la demostración de la importancia decisiva de un único componente, como ha sido demostrado para la toxina del bacilo diftérico o el polisacárido capsular de neumococo. Además, se ha demostrado que otros lípidos extraídos de las micobacterias también son tóxicos para los macrófagos (21)

Cera D y respuesta inmune.- Otro micósido de interés es la *cera D* de alto peso molecular, que no es una cera propiamente dicha, pero contiene ácidos micólicos y un glucopéptido. Se extrae aparentemente a partir de la capa basal de la pared, puesto que el péptido contiene los aminoácidos característicos de esta capa, unidos a polímeros de hexosas y hexosaminas. En emulsión (adyuvante de Freund), esta fracción, a semejanza del bacilo tuberculoso total, estimula la inmunogenicidad de diferentes antígenos añadidos. Más aún, una mezcla de *cera D* y proteínas de bacilo tuberculoso induce una hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina, mientras que la proteína sola es débilmente inmunogénica. La fracción fosfátida no purificada tiene la interesante propiedad de evocar una respuesta celular semejante a la del bacilo tuberculoso, incluyendo la necrosis caseosa. Además, pueden inyectarse grandes cantidades, y fracciones comparables de bacterias saprófitas también son eficaces (21,22).

Acidorresistencia.- Después de la extracción exhaustiva de los lípidos anteriormente descritos, por los solventes orgánicos, los residuales son aún acidorresistentes y retienen en gran cantidad lípidos «fijados firmemente» a la pared. Estos lípidos pueden eliminarse con ácidos en caliente que además destruyen la acidorresistencia. Aunque esta propiedad puede perderse por una ruptura sónica de las células normales, parece depender de la integridad de la pared celular y de ciertos lípidos de ésta (14,15).

Polisacáridos.- Los polisacáridos constituyen uno de los componentes más abundantes en los filtrados y extractos de micobacterias; gran parte se hallan unidos químicamente con los lípidos presentes en la pared celular. La fracción polisacárida contiene glucán, manán, arabinomanán y arabinogalactán, y se ha sugerido que parte de la pared celular y la *cera D* estarían formados por un complejo ácido micólico-arabinogalactán. (24, 25)

Resistencia a los agentes químicos y físicos.- Los bacilos tuberculosos son extremadamente resistentes a los ácidos, propiedad que se emplea para el aislamiento y diagnóstico de los organismos. También son relativamente insensibles a los detergentes catiónicos. Sin embargo, no son más resistentes que otras bacterias no esporuladas al calor, a la irradiación ultravioleta o al fenol (26). Varias de las especies del género *Mycobacterium* infectan una gran variedad de especies animales, por lo cual cobran gran importancia en Salud Animal. En el (Cuadro III), se muestran las especies micobacterianas más importantes relacionadas con sus hospederos (27, 28, 29)

CUADRO III. ESPECIES MICOBACTERIANAS Y ANIMALES QUE AFECTAN.

ESPECIE MICOBACTERIANA	ESPECIES DE ANIMALES AFECTADAS
<i>M. bovis</i>	Bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, elefantes, rinocerontes, aves, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, elefantes marinos, zariguellas y jirafas
<i>M. tuberculosis</i>	Bovinos, monos, simios, primates (hombre), cerdos, perros, tapires y elefantes.
<i>M. leprae</i> <i>M. leprae- murium</i>	Gatos, ratas y ratones
<i>M. leprae</i>	Armadillo y humano
<i>M. fortuitum</i>	Perros, vacas y cerdos.
<i>M. marinum</i>	Peces y sapos.
<i>M. kansasii</i>	Monos, vacas y cerdos.
<i>M. chelonae</i>	Cerdos y manatíes
<p>COMPLEJO: <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>. <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>.</p>	<p>Pollos, pájaros y cerdos Paloma torcaz y ciervo Bovinos, ovinos, caprinos y rumiantes animales silvestres.</p>

1.3 IMPACTO ECONÓMICO

Se ha informado que alrededor del mundo más de 50 millones de cabezas de ganado están infectadas con *M. bovis* (27), en consecuencia la presencia de la enfermedad ocasiona serias pérdidas al sector productivo, pudiéndose analizar desde tres aspectos diferentes:

1. Pérdidas Directas en la Producción: específicamente en los aspectos siguientes:

- Se reduce la eficiencia productiva de los animales que alcanzan el 10 %, ya sea en ganancia de kilos de carne como así también en producción de leche.
- Disminuye la fertilidad hasta un 6%.
- La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia. El promedio de 270 días en la 1ª lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131 días).
- Se produce una disminución gradual del peso, perdiendo un promedio de 15% del peso normal.
- Causa predisposición a otras enfermedades, como efecto secundario, pues hay reducción de la inmunidad.
- La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre 5 y 10%.
- Pérdida de parición de terneros en hembras tuberculosas.

2. Comercio interior y exterior: el diferencial de precios percibido por el productor por la venta de sus productos provenientes de animales enfermos, y las regulaciones sanitarias que influyen en mercados internacionales (11)

3. Salud pública: pérdidas productivas por invalidez parcial o total de los trabajadores ligados al sector lácteo y ganadero, incluyendo operarios de frigoríficos, veterinarios, etc. Y quizás lo más importante y difícil de medir es la repercusión de la enfermedad en los consumidores de productos cárnicos y lácteos. Se observa una preocupación de los Organismos Sanitarios Internacionales OIE/OMS (Oficina Internacional de Epizootias/Organización Mundial de la Salud) por la presencia de esta enfermedad en el ganado bovino e instan a los países, a través de sus representaciones regionales como la

Organización Panamericana de la Salud (OPS), a ejecutar planes de control y erradicación de la enfermedad (30).

En México la prevalencia de la enfermedad es de 11.1% en ganado lechero y 2.9% en ganado de carne y las pérdidas económicas se calculan en más de 250 millones de pesos hasta la actualidad (31, 32).

1.4 SALUD PÚBLICA

La tuberculosis persiste como uno de los problemas de salud más graves para el humano; en la actualidad ha cobrado mayor importancia debido al incremento de los casos a nivel mundial. De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tercio de la población mundial, es decir 2 millones de personas se encuentran infectadas; sin embargo la mayoría de estas personas, un 90%; nunca desarrollarán la enfermedad. El 10% restante la desarrolla porque existen factores de riesgo asociados, como: la desnutrición, la sobrepoblación, la falta de recursos para los tratamientos, infecciones concurrentes y la diabetes mellitus entre otras. De alguna u otra forma este porcentaje representa a individuos con un sistema inmune comprometido que los hace altamente vulnerables; Así, no es de sorprender que los casos de tuberculosis se hayan incrementado luego de la aparición de la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Según datos de la OMS en 2008 hubo 9.4 millones de nuevos casos, de los cuales se registraron 1.8 millones de decesos; de éstos 500 000 eran individuos coinfectados con VIH (33, 34, 35). Por otro lado, aunque la mayoría de los casos de tuberculosis humana pueden ser tratados con los fármacos actualmente disponibles, la aparición de cepas resistentes a antibióticos de primera y de segunda línea es alarmante, convirtiendo a la TB en una enfermedad intratable de muy fácil transmisión (36). Brasil, Perú y México son los países con mayor carga de casos activos, aunque no corresponden a aquéllos con mayor incidencia de la enfermedad (**Figura 1A**).

La TB bovina, por su parte, es una enfermedad de incidencia variable dentro de Latinoamérica. De acuerdo con la reactividad a la tuberculina, existen regiones con muy baja o nula prevalencia de TB bovina, tales como algunas islas del Caribe; países de

prevalencia intermedia, como México y varios integrantes de Centroamérica; y países con prevalencia alta, como Argentina o Brasil, (**Figura 1B**) (36, 37).

ESTIMACIONES DE TUBERCULOSIS HUMANA Y BOVINA EN LATINOAMÉRICA

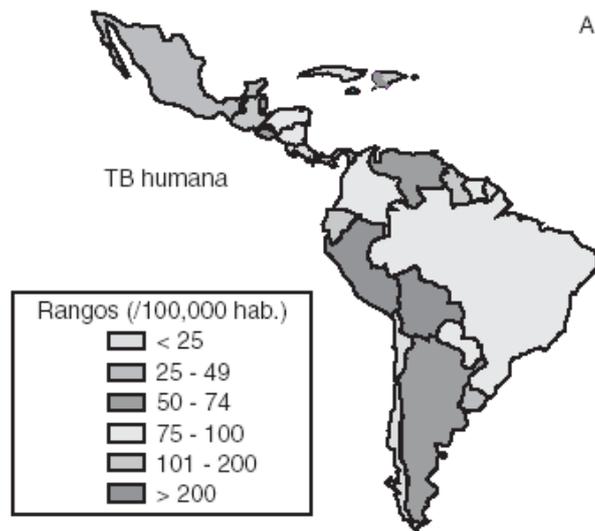


Figura 1A. Tuberculosis activa en humanos en 2004 por país. Los rangos corresponden al número de casos estimados por cada 100,000 habitantes según la Organización Mundial de la Salud (36,38).

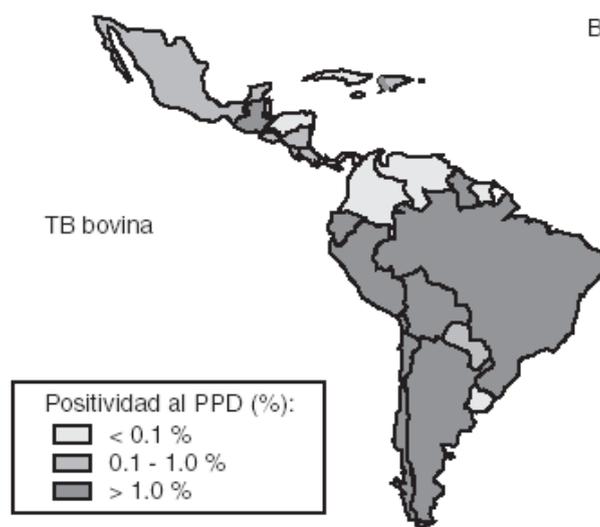


Figura 1B. Prevalencia de reactividad a la tuberculina en bovinos por país (36,38).

Se ha observado que los países con mayor producción de ganado son los que presentan una mayor prevalencia de la enfermedad. Las pérdidas económicas debidas a la TB son, por lo tanto, sumamente elevadas, y la zoonosis representa un foco de infección para humanos que no puede ser despreciado (37, 38).

Aunque la transmisión a través de la leche se ha reducido considerablemente gracias a la introducción de la pasteurización y a los programas de control en países desarrollados; en países como el nuestro, esto no se ha podido llevar a cabo de una manera adecuada debido al gasto económico que esto implica y las costumbres de las personas (36). De 10 mil millones de litros de leche que se producen en México anualmente, solamente el 50% de la producción se pasteuriza, lo demás se consume o se transforma en derivados lácteos, lo cual implica un alto riesgo para la salud pública (5).

1.5 PATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

El primer paso empieza con la inhalación del bacilo y su arribo a los alvéolos pulmonares, donde son fagocitados por los macrófagos alveolares, la destrucción de la micobacteria depende principalmente de la capacidad microbicida de los fagocitos del huésped y de los factores de virulencia propia de la micobacteria ingerida. *M. bovis* es capaz de evadir la destrucción intracelular usando varios mecanismos como: El cambio de pH del endosoma, inhibición de la apoptosis y neutralización del anión superóxido.

La micobacteria al multiplicarse induce una respuesta proinflamatoria localizada, que favorece el reclutamiento de células inflamatorias y monocitos que se diferenciarán en macrófagos, los cuales ingerirán de nuevo a la micobacteria pero no la destruirán. De dos a tres semanas después de la infección, se desarrolla una respuesta inmune celular en la que es evidente la presencia de linfocitos T específicos que proliferarán dentro de las lesiones tempranas o granulomas, los cuales habilitan a los macrófagos para matar a las micobacterias intracelulares (39). El tubérculo o granuloma está formado por un centro de macrófagos infectados, rodeados de macrófagos vacuolizados y otros fagocitos mononucleares, con un manto de linfocitos en asociación con fibras de colágeno y una matriz de componentes extracelulares que delimitan la periferia de la

estructura (40). El centro sólido necrótico de la lesión inhibe el crecimiento extracelular de la micobacteria, como resultado la infección se detiene. La enfermedad puede progresar, y después de la infección primaria puede llevarse a cabo una diseminación hematogena, meses o años después (39). La contención de la micobacteria usualmente falla cuando el estado inmune del huésped cambia, lo cual usualmente ocurre como consecuencia de la edad, por desnutrición o coinfecciones que reducen o deterioran las funciones de los linfocitos T CD4. Seguido de dichos cambios del sistema inmune, la estructura del granuloma decae provocando la ruptura y liberación de miles de bacilos viables a las vías aéreas, facilitando la diseminación a través de aerosoles que contienen el bacilo, (**Figura 2**).

FORMACIÓN DEL GRANULOMA

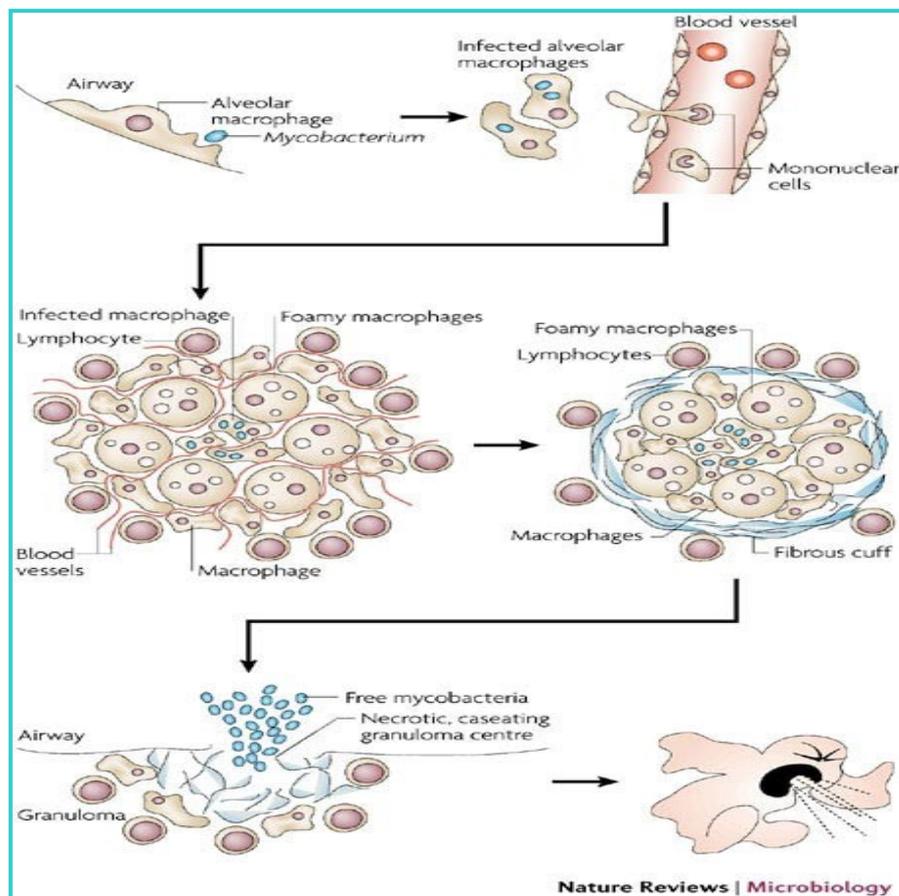


Figura 2. Formación de un granuloma en la tuberculosis, Russell DG. Nat. Rev. Microbiol. 5:39-47 2007. (40)

1.6 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium bovis*

En las lesiones tuberculosas, que se desarrollan en los bovinos se ha observado una pronunciada infiltración de células mononucleares, incluyendo macrófagos y linfocitos; similar a lo que se observa en otras enfermedades micobacterianas e indica una estructura coherente con las teorías sobre la compleja interacción entre la protección mediada por células de la respuesta inmune y la hipersensibilidad tardía.

El conocimiento de cómo las respuestas inmunes están implicadas en el progreso de la enfermedad es crucial para la comprensión de la tuberculosis bovina. Esto se refiere, no sólo a la capacidad para alcanzar un mejor entendimiento en el avance de la enfermedad y el desarrollo de la patología, sino también a la utilización racional de los instrumentos básicos para la erradicación de la enfermedad, tales como pruebas de diagnóstico y vacunas, que dependen de la respuesta inmune. Por tanto, un mayor discernimiento de los mecanismos inmunes que confieren resistencia contra la micobacteria, es esencial para el desarrollo de métodos perfeccionados de control y erradicación (41).

Actualmente se considera que la inmunidad hacia la tuberculosis implica una serie compleja de interacciones entre varias poblaciones celulares, que tienen como finalidad controlar y mantener la infección, así como prevenir al hospedero de una posible reactivación de la enfermedad (42). Dado que estos microorganismos son capaces de encontrar un nicho donde son inaccesibles a los anticuerpos circulantes, su eliminación precisa de mecanismos inmunitarios muy diferentes de los mecanismos de defensa frente a las bacterias extracelulares (43). La principal respuesta inmune protectora contra bacterias intracelulares, como las micobacterias, es primordialmente de tipo celular (44). Dentro de las diferentes subpoblaciones de células T, las células T CD4 juegan un papel central, aunque no exclusivo en la defensa inmune contra la tuberculosis, funcionalmente estas células contribuyen a la protección produciendo citocinas como la IL-2 y el IFN- γ (45).

Esta última parece ser la molécula efectora más crítica, para la activación del macrófago, debido a que media su efecto protector principalmente por la inducción de intermediarios reactivos del nitrógeno, necesarios para la destrucción de las micobacterias intracelulares. Este tipo de respuesta es requerida para la protección

contra la infección por micobacterias, y es comúnmente conocida como respuesta inmune tipo Th1. Aunado a ello, se ha mostrado que las células T CD8, pueden inducir actividad tuberculostática en macrófagos infectados, debido a que durante el proceso de lisis vía exocitosis o liberación granulocítica, estas células liberan moléculas efectoras que directamente destruyen a las micobacterias intracelulares (46).

Así pues, la inmunidad mediada por células realiza dos tipos de acciones principales: destruye los microorganismos fagocitados luego de la activación de los macrófagos por las citocinas derivadas de los linfocitos T, y la lisis de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos CD8 (43). Antes del establecimiento de una respuesta inmune adaptativa, la respuesta inmunitaria innata frente a las bacterias intracelulares depende principalmente de los fagocitos y de las células asesinas naturales (NK).

Los fagocitos, inicialmente los neutrófilos y posteriormente los macrófagos, ingieren e intentan destruir a estos microorganismos. Las bacterias intracelulares activan a las células NK, directamente estimulando en los macrófagos la producción de interleucina-12 (IL-12), una potente citocina activadora de las células NK (43); esta citocina no solo es producida por macrófagos, sino también por las células dendríticas y los linfocitos B.

Una de sus funciones es estimular específicamente la actividad de los linfocitos Th1, que a su vez producen principalmente dos citocinas IL-2 e IFN- γ (47). La primera actúa de forma autocrina y paracrina sobre linfocitos T, linfocitos B, células NK y macrófagos. Para responder a IL-2 los linfocitos T deben de ser activados antes por el antígeno IL-12. Como se mencionó antes, el IFN- γ es producido por los linfocitos T así como por algunos linfocitos T CD8 y células NK (47).

El IFN- γ estimula la activación de los macrófagos para que produzcan diversas sustancias microbicidas (H_2O_2 = Peroxido de hidrogeno, O_2 = Oxigeno diatómico, NO= Oxido de Nitrógeno, OH= Grupo hidroxilo), como productos reactivos de oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas. El IFN- γ también favorece la producción de isotipos de anticuerpos que activan el complemento y opsonizan bacterias para su fagocitosis, ayudando así a las funciones efectoras de los macrófagos (43). Otra citocina importante para el control de la enfermedad es del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) que es secretado por los macrófagos, las células T, B y los fibroblastos. Asimismo,

actúa de manera sinérgica con el IFN- γ para inducir la expresión de la enzima iNOS, involucrada en la producción de óxido nítrico (NO), la cual participa en la destrucción de *M. bovis* junto con los intermediarios de oxígeno (48). Semanas después de la infección, está alcanza los nódulos linfáticos regionales, con la consiguiente activación de linfocitos T CD4, células que son esenciales en la protección, pues realizan un papel crítico en la defensa contra los agentes patógenos intracelulares y extracelulares que resisten los mecanismos de defensa de la respuesta innata.

Estos linfocitos se activan por señales de membrana emitidas por las propias células Th1 y por el IFN- γ secretado por ellas. Una vez activados los macrófagos pueden matar bacterias intracelulares o ingeridas. Las células Th1 producen una variedad de citocinas y moléculas de superficie que no sólo activan macrófagos infectados, sino que también matan macrófagos viejos crónicamente infectados, estimulan la producción de nuevos macrófagos en la médula ósea y reclutan macrófagos al sitio de infección (44). Los linfocitos T CD4 reconocen e interactúan con células B que han unido e internalizado antígenos extraños gracias a sus inmunoglobulinas de superficie. Las moléculas que presentan el antígeno peptídico a los linfocitos T son glucoproteínas de membrana codificadas por un grupo de genes llamado complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (49).

Otra población celular esencial para la defensa contra agentes patógenos son los linfocitos T CD8 citotóxicos, los cuales son capaces de eliminar o destruir cualquier célula que albergue tales patógenos, reconociendo péptidos extraños que son transportados a la superficie celular unidos a moléculas de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Los linfocitos T CD8 citotóxicos llevan a cabo su función lítica liberando dos tipos de proteínas citotóxicas preformadas: Las granzimas, que son capaces de inducir apoptosis en cualquier tipo de células blanco, y la perforina que forma poros y agujeros en la célula blanco a través de los cuales entran las granzimas. El ligando FAS, una molécula unida a membrana, expresada por los linfocitos T CD8 y por algunos linfocitos T CD4, también es capaz de inducir apoptosis por unión FAS expresado en la superficie de algunas células blanco.

Los linfocitos T CD8 citotóxicos también producen IFN- γ , importante en la expresión de MHC de clase I y de la activación de los macrófagos (43). En bovinos se ha

observado que los linfocitos T CD8 citotóxicos están no solo involucrados en la lisis de células específicas si no que son capaces de matar directamente a las micobacterias vía liberación de granzimas (50).

Los linfocitos que expresan el receptor $\gamma\delta$ (gama-delta) son un linaje distinto al de los linfocitos T que expresan $\alpha\beta$ (alfa-beta), que son los más numerosos. El porcentaje de linfocitos $\gamma\delta$ varían mucho en diferentes tejidos y especies, pero en conjunto menos del 5% de los linfocitos T expresan receptores de células T (RCT) $\gamma\delta$. Una característica de los linfocitos T $\gamma\delta$ (gama-delta) es su abundancia en los tejidos epiteliales de ciertas especies; en los rumiantes constituyen hasta un 60% de la población de linfocitos T. El linfocito $\gamma\delta$ (gama-delta) puede lisar células infectadas por micobacterias y algunas células leucémicas. Pueden representar una primera línea de defensa contra ciertas bacterias debido a que una alta proporción reconoce proteínas de choque térmico bacterianas (HSP). Los linfocitos $\gamma\delta$ (gama-delta) responden de manera predominante en la reacción de linfocitos mixtos, lo cual indica que pueden reconocer antígenos del MHC extraños y también pueden ser citotóxicos (47), esta población de linfocitos tienen un rol de protección, antiinflamatorio y de regulación (44, 51, 52, 53)

La mayoría de las células $\gamma\delta$ (gama-delta) presentes en la sangre de bovinos jóvenes expresan la molécula de diferenciación linfocitaria workshop cluster 1 (WC1), mientras que en otros tejidos como el bazo, las células $\gamma\delta$ son WC1- (54). En rumiantes las células T $\gamma\delta$ se dividen en dos subpoblaciones basada en la expresión del WC1. WC1- y WC1+. Los análisis de la expresión de genes y microarreglos sugieren que los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1+ de ganado representan una población inflamatoria, mientras que los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1- son células reguladoras y comparte características con células de tipo mieloides (55, 56). Estudios en bovinos han puesto de manifiesto que los linfocitos T $\gamma\delta$ están involucrados de manera importante en infecciones con *M. bovis*, ya que en infecciones experimentales se observó que cambia la cinética de las poblaciones de linfocitos $\gamma\delta$ WC1+ en etapas tempranas posdesafío (57), dichos cambios están relacionados con la aparición de estas células en el desarrollo de la lesiones en etapas iniciales (58).

Por otro lado, la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos muestra tener un efecto cooperador en la eliminación de las micobacterias externas, a través de los

mecanismos de opsonización y activación de complemento vía receptores Fc, mecanismo biológico inducido principalmente por el isotipo IgG2, cuya producción es favorecida por el IFN- γ secretado por los linfocitos Th1 (59)

1.7 RELEVANCIA DE LOS ANTÍGENOS DEL EXTRACTO PROTEICO DE *Mycobacterium bovis*

El estudio de los antígenos de *M. bovis*, se ha orientado principalmente en el aislamiento e identificación de antígenos específicos, los cuales son posteriormente evaluados para determinar su utilidad en el desarrollo de pruebas diagnósticas confiables; debido básicamente a que la prueba de tuberculina muestra baja sensibilidad y especificidad, en parte, por la naturaleza compleja del antígeno usado (PPD), que incluye además proteínas que presentan reacción cruzada con una gran variedad de otras micobacterias (60). A diferencia de los grandes avances que se tienen en la caracterización de antígenos de *M. tuberculosis* pocos antígenos de *M. bovis* han sido aislados y caracterizados.

De igual modo, muchos de los estudios de caracterización de antígenos de esta especie se han realizado a partir de cepas vacunales de la BCG, y muy poca investigación existe relacionada con cepas de campo de *M. bovis* (61). En resumen, la purificación y caracterización de proteínas específicas es esencial para esclarecer tanto los mecanismos de patogenicidad de la micobacteria, como los mecanismos inmunes que se desarrollan durante la infección a fin de identificar tanto aquellos antígenos capaces de inducir una inmunidad protectora, como aquellos que pueden servir con fines diagnósticos. El término MPB denota un sistema de referencia propuesto por Closs y col., para designar los antígenos purificados e identificados de *M bovis* mediante la técnica de inmunoelectroforesis, el número seguido de las siglas MPB indica la movilidad relativa del antígeno o proteína en geles de poliacrilamida al 7.7 % a un pH de 9.5 (62). Las siglas MPT se utilizan para denominar de manera similar a las proteínas purificadas de *M. tuberculosis* (63). Así, las denominaciones MPB70 y MPT70 denotan los genes correspondientes en *M. bovis* y *M. tuberculosis*

La proteína MPB70 de 23 kDa es uno de los antígenos ampliamente estudiados y descritos en *M. bovis*, exhibe una alta especificidad y ha mostrado ser un antígeno

inmonodominante de esta especie micobacteriana, capaz de inducir inmunidad celular e inducir la producción de anticuerpos en animales infectados (64). La proteína es una de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera forma parte del componente activo del PPD bovino (65). Además, se ha mostrado que la MPB70 es secretada en gran cantidad por cepas virulentas de *M. bovis*, mientras que su síntesis y secreción es variable en las diferentes subcepas de *M. bovis* BCG. (66). Aunado a ello, se ha observado que algunas proteínas micobacterianas, pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como resultado de cambios de carga espontáneos, por procesos de desaminación, glicosilación, acilación, etc. (67); es así que Harboe y col., mostraron que las proteínas MPB80 y MPB70 son formas similares del mismo producto genético, con diferencias en su movilidad electroforética debidas al grado de glicosilación. (68, 69). De manera general, las proteínas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han agrupado en cuatro grupos de acuerdo a su función, secuencia y características físicoquímicas (70):

El primer grupo esta formado por las proteínas de choque térmico (hsp, del inglés heat shock protein), son polipéptidos esencialmente citoplasmáticos, que incrementan su síntesis frente a estímulos estresantes como: temperatura, el incremento de daño oxidativo y la disminución de nutrientes; esta respuesta probablemente protege a la micobacteria durante situaciones adversas, manteniendo la conformación funcional de proteínas esenciales y asistiendo en la reducción de proteínas desnaturalizadas, debido a ello son mejor conocidas como chaperonas, (**Cuadro IV**). Se agrupan en familias dependiendo de su peso molecular: hsp65 kDa o GroEL, hsp 10 kDa o GroES, hsp 70 kDa o DnaK, hsp 90 kDa, hsp 16 kDa entre otras (71, 72).

Se ha mostrado que la proteína hsp 70 kDa puede conducir péptidos exógenos por la vía endógena al ligarlos a moléculas del MHC clase I, siendo así reconocidos por los linfocitos T citotóxicos. Estas proteínas están presentes tanto en células procarióticas como eucarióticas; y se ha determinado que están altamente conservadas dentro y a través de las especies, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de la respuesta de células T a determinantes compartidos entre las propias proteínas del hospedero con las de *M. tuberculosis*, favoreciendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes (73).

Dentro de éste grupo de proteínas la proteína hsp de 10 kDa (CPF-10) juega un papel relevante en los mecanismos de patogenicidad, junto con la proteína de secreción temprana de 6 kDa, mejor conocida como ESAT-6 (early secretory antigenic target-6), las cuales se unen formando un complejo heterodímero en proporción 1:1; los genes que codifican a éstas proteínas están presentes en la región de diferencia-1 o RD1 de *M. tuberculosis* y *M. bovis* pero ausentes en la vacuna BCG y en otras especies de micobacterias no tuberculosas (NTM), ambas proteínas son secretadas por un sistema peculiar de secreción conocido como ESX 1 (ESAT-6 secretion system-1), el cual exporta proteínas carentes de péptidos señal (74, 75). Se menciona que ambas proteínas son reconocidas en infecciones establecidas por *M. bovis* en bovinos y por *M. tuberculosis* en el humano, promueven la producción de IFN- γ por parte de células CD4 y CD8 sensibilizadas induciendo así los mecanismos de fagocitosis y citotoxicidad por macrófagos y por las propias células T citotóxicas. Además, una respuesta humoral fuerte se desarrolla en animales tuberculosos. Debido a la ausencia de éstos antígenos en la vacuna BCG, los casos clínicos de infección se dice pueden identificarse evaluando la respuesta inmune específica hacia ellos (76)

El segundo grupo de proteínas micobacterianas consideradas son las lipoproteínas, dentro de ellas se incluyen a las de 19 kDa, 26 kDa, 27kDa y 38 kDa, fundamentalmente constitutivas de la pared celular, aunque algunas también se encuentran en el citoplasma. Las lipoproteínas que se consideran más importantes son las de 19 y 38 kDa. La proteína de 19 kDa es una lipoproteína glicosilada de la cual se ha mostrado induce una respuesta bactericida en macrófagos dependiente de receptores tipo toll (TLR, proteínas transmembranales expresadas por células del sistema inmunitario innato), en específico de TLR-2. Otros estudios señalan que la proteína además posee función de adhesina y que se une al receptor de manosa THP-1 de los monocitos favoreciendo los mecanismos de fagocitosis. Sin embargo, la interacción prolongada de este antígeno con los macrófagos inhibe la producción de IFN- γ y la expresión de moléculas clase II del MHC. La proteína de 38 kDa (PstS-1), es también una lipoglicoproteína que se secreta durante el metabolismo activo de la bacteria, pero además se localiza en la superficie de ésta a la cual se liga mediante su extremo lipídico.

La secuencia de aminoácidos de la proteína posee homología con la proteína PhoS, relacionada con la fijación y transporte de fósforo en *Escherichia coli*. Este antígeno es

capaz de inducir la proliferación de células Th1 específicas y es una molécula blanco para linfocitos T CD8 citotóxicos. En general las lipoproteínas están involucradas en la inducción de una fuerte respuesta celular de memoria y tienen un papel funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared celular (Cuadro IV). (70).

Un tercer grupo son las proteínas de secreción, constituidas principalmente por proteínas de 12, 16, 19, 23, 30 a 32, 41 y 45-47 kDa, algunas de éstas forman el complejo 85 que es uno de los mayores constituyente del sobrenadante de los cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Estas proteínas constituyen un importante mecanismo mediante el cual la bacteria interactúa con su entorno y que las protege para sobrevivir en ambientes hostiles y ayuda a la colonización. Más aún, varias de ellas representan importantes factores de virulencia por tanto juegan un papel central en la determinación de las vías de presentación del antígeno y el reconocimiento por células T efectoras implicadas en la protección.

La proteína de 16 kDa o MPT63 es una de las principales proteínas secretadas, aunque también se ha mostrado estar asociada a la envoltura de la micobacteria; su función no es clara pero debido a su estructura similar a la de la familia de las inmunoglobulinas y a otras moléculas de adhesión, se sugiere esta involucrada en la interacción con las células del hospedero facilitando los mecanismos de invasión celular. (77).

El 35 % de los antígenos secretados por *M. tuberculosis*, esta representado por tres proteínas, comprendidas en el rango de 30/32 kDa denominado complejo antigénico 85, estas proteínas se designan comúnmente como: 85A (32kDa), 85B (30kDa) y 85C (32 kDa); además de ser un producto de secreción, normalmente se localizan en la pared celular y en la superficie de la bacteria pues contribuyen a la síntesis de la pared, ya que poseen actividad de esterasas (78,79). De éstas, el antígeno 85B es la proteína de secreción mayoritaria, aunque desde el punto de vista enzimático es menos activa. El antígeno 85C, codificado en el gen *fbpC*, cataliza el último paso en la producción de ácidos micólicos “maduros”, pues realiza la esterificación del micolato con la trehalosa dando lugar al “factor cord” o cordina (6,6-Dimicoliltrealosa) es uno de los principales componentes de la pared micobacteriana, y constituye un factor de virulencia, las cepas virulentas al producir esta molécula consiguen inhibir la migración de los leucocitos, y median una respuesta innata, a cargo de macrófagos.

La expresión de esta molécula confiere un aspecto característico al organismo, en forma de serpiente). Por otro lado, se ha mostrado que las proteínas del complejo Ag85 juegan un papel importante en la virulencia de las micobacterias debido a su habilidad para ligar fibronectina, lo cual puede tener un significado clínico; dado que, la fagocitosis de la micobacteria por los monocitos/macrófagos puede estar influenciada por la interacción de este complejo antigénico con la fibronectina soluble y los receptores de las células fagocíticas facilitando su entrada (80). La respuesta inmunológica hacia el complejo 85 puede interferir en la interacción, bloqueando la fagocitosis del bacilo ácido-resistente, por tanto se le considera uno de los mejores candidatos a la hora de diseñar una vacuna, tal y como se ha demostrado en algunos modelos animales (81, 82, 83).

El último grupo está constituido por las enzimas, la L-alanin deshidrogenasa de 40 kDa y la superóxidodismutasa de 23 kDa, que están involucrada en los mecanismos de defensa del bacilo dentro de los macrófagos, (**Cuadro IV**). (84,85).

Lipoarabinomanosa y fostatidilinositolmanosa

El otro antígeno es la lipoarabinomanosa (LAM), una glicoproteína presente en la pared de micobacterias que liga inicialmente con el receptor CD14 y posteriormente induce activación de TLR tipo 2 (86,87). El último antígeno el fosfatidilinositolmanosa (FIM) es un precursor en la biosíntesis de LAM, es un componente del factor soluble de tuberculosis, que resulta de un filtrado de proteínas de un cultivo de corto tiempo de crecimiento para la micobacteria y también es factor es importante para un adecuada respuesta porque juega un papel importante en la interacción con TLR 2 (88).

Cuadro IV. PRINCIPALES PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE *Mycobacterium bovis*.

ANTÍGENOS	ACCIÓN
65-kDa CFP-10 70-kDa 90-kDa	Incrementan su síntesis ante estímulos estresantes, como son: la disminución de nutrientes y el incremento de temperatura. Las proteínas de 70 y 65 kDa exhiben más del 50% de homología con las proteínas DnaK y GroEl de choque térmico de <i>Escherichia coli</i> , al igual que las del humano por lo que pueden inducir autorreactividad.
38-kDa 27-kDa	Favorecen la respuesta Th1, y estimulan la síntesis de anticuerpos específicos.
27-kDa Complejo 30/32-kDa MPT-64	Son utilizados en inmunización. El Complejo 30/32 (Antígeno 85) participa en la síntesis de pared celular, además se unen a fibronectina favoreciendo la adhesión e internalización de la bacteria a los monocitos.
27-kDa 16-kDa CFP-10	Aumenta la secreción de interferón gamma Aumenta la producción de óxido nítrico
40-kDa	Inhibe a las enzimas lisosomales
16-kDa	Elimina células T CD8 ⁺
19-kDa	Inhibe la expresión del MHC clase II, y por tanto la presentación antigénica. Favorece el proceso inflamatorio mediante activación de neutrófilos. Induce una respuesta humoral
CFP-10 ESAT-6	Disminuyen la expresión de cofactores en CPA. Aumenta la secreción de factor de necrosis tumoral Aumenta la secreción de interferón gamma Aumenta la secreción de IL-10, Inhibe la producción de óxido nítrico, Diagnóstico
40-kDa MPT-64	Diagnóstico
Complejo 30/32-kDa	Mantiene la hidrofobicidad e integridad de la pared celular Permite la unión de la bacteria a la fibronectina
23 kDa	Superoxido dismutasa. Más del 50% de homología con SodA de <i>E.coli</i> y MnSOD de mitocondrias humanas.

1.8 DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS

Para efectos de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (CANATEB), el diagnóstico de la enfermedad tradicionalmente se lleva a cabo por medio de la prueba de tuberculina, la inspección postmortem, y el análisis histopatológico y bacteriológico de muestras sospechosas colectadas al momento de la inspección (5).

1.8.1 Tuberculina

Se llama tuberculina al preparado proteico de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* o *Mycobacterium avium* empleado como antígeno en la pruebas cutáneas que se efectúan a los individuos o bovinos, según sea el caso, para identificar aquellos que padecen Tuberculosis. Con este fin se han empleado varios tipos de tuberculina; el mas importante es el derivado proteínico purificado (*purified protein derivative*, PPD) o tuberculina, que se elabora cultivando los microorganismos en un medio sintético, posteriormente éstos se destruyen con vapor, y el cultivo inactivo se filtra. La tuberculina o PPD se precipita de este filtrado con ácido tricloroacético, se lava y resuspende en un amortiguador, por ultimo se determina su contenido de proteína y se ajusta a la concentración de 1mg/ml. (89).

Cuando la tuberculina PPD se inyecta vía intradérmica a un animal sano, no hay reacción local importante. Por otro lado, si se inyecta a animales sensibilizados por una infección con micobacterias, se producirá una respuesta de hipersensibilidad tardía. La reacción es resultado de la activación de células endoteliales, neutrófilos, macrófagos y células T sensibilizadas que migran al sitio de la inoculación y liberan citocinas, quimioquinas y sustancias vasoactivas como prostaglandinas y leucotrienos. La inflamación se inicia entre 12 y 24 horas después, alcanza su mayor intensidad a las 24 a 72 horas, y puede persistir por varias semanas antes de disminuir de manera general. En las reacciones muy graves hay destrucción tisular y necrosis en el sitio de la inyección (47).

Las reacciones se clasifican como:

Negativa: Cuando no se observa, ni palpa algún cambio en la piel del sitio de aplicación.

Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación (5).

Esta prueba es la base del programa de control de la TB en nuestro país, el cual se fundamenta en la detección de bovinos reactores a la prueba en los hatos y su posterior eliminación o sacrificio (3, 5, 47). Las pruebas de tuberculinización autorizadas por la Secretaría y que son aplicadas por Médicos Veterinarios acreditados por la SENASICA, son:

- a) Prueba en el pliegue caudal simple
- b) Prueba cervical doble comparativa
- c) Prueba cervical simple

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña son:

- a) PPD bovino: elaborado con la cepa de *Mycobacterium bovis* AN5, empleado en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple.
- b) PPD aviar: elaborado con la cepa de *Mycobacterium avium* D4, empleado en la prueba cervical comparativa (5).

Sin embargo, algunos inconvenientes que la prueba de la tuberculina sufre son su baja sensibilidad (70 %) y especificidad (50-60%), además de que interfiere con el estado inmune del ganado con respecto a repeticiones de la prueba y no detecta la infección en etapas iniciales o finales de la enfermedad (67). Las razones para las aparentes fallas de la Intradermoreacción (ID) bajo las condiciones de campo son complejas: las fallas operacionales y el fenómeno temprano de inmunosupresión pueden jugar un papel principal; en particular, la respuesta a la ID es fluctuante (al menos *in vitro*) y está afectada por los circuitos regulatorios antígeno específicos; estos podrían suprimir la respuesta de la ID, probablemente por un mecanismo circundante (90).

1.8.2 Análisis Bacteriológico e histopatológico

Los estudios histopatológico y bacteriológico se realizan para facilitar y confirmar el diagnóstico de la TB a partir de muestras de órganos que presenten lesiones compatibles

con tuberculosis o secreciones sugestivas. El cultivo de muestras de tejido con lesiones sugestivas de tuberculosis y/o exudados nasales se realiza en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragani, ATS y Lowenstein Jensen (5). En el diagnóstico histopatológico se utiliza la tinción de hematoxilina-eosina, es posible observar en las preparaciones cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además deben utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y nueva fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso (5). Puede observarse fibrosis, zonas necróticas claramente definidas, células gigantes con núcleos en formación semilunar o de herradura, zonas de calcificación. En los cortes teñidos con Ziehl-Neelsen se observan bacilos ácido-alcohol resistentes de color rojo magenta. Se describen como negativo, compatible o sugestivo dependiendo de los hallazgos.

1.8.3 Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Mediante el ensayo inmune ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), es posible determinar anticuerpos circulantes específicos contra antígenos de *Mycobacterium* y, de esta manera indicar una infección. Este sistema genera resultados en cuestión de horas y con sensibilidades que oscilan del 95 al 98% y especificidades del 85 al 92%, dependiendo del antígeno empleado. Posee las ventajas adicionales de evaluar el nivel de respuesta inmune ante la infección bacteriana, es fácil de estandarizar y necesita menos reactivos y equipamiento que otros sistemas (91). Los antígenos y proteínas de *M. bovis* más comunes que se utilizan para el diagnóstico de la tuberculosis bovina a través de ELISA son: CFP-10, ESAT-6, AcrI-MPB83, MPB59, MPB64, MPB70, MPB83, alpha-crystallin (AcrI. Rv3391), 38-kDa y filtrados de cultivo de *M. bovis* (92).

La prueba de ELISA, se basa en una reacción antígeno-anticuerpo en la que una de las fases reaccionantes está inmovilizada en una superficie sólida. La unión antígeno-anticuerpo se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima (93).

Entre las ventajas tenemos que es fácil de interpretar, los resultados son de lectura objetiva, cambio de color medido por un espectrofotómetro y se dispone del resultado en pocos minutos; y entre las desventajas encontramos que es más caro por muestra (93).

1.8.4 Prueba de INF- γ

La inmunidad celular hacia la micobacteria puede medirse *in vitro*, mediante la cuantificación del interferón gamma (INF- γ) liberado por las células T sensibilizadas después de la estimulación por antígenos específicos, bajo esta base se desarrolló un sistema para el diagnóstico de la tuberculosis bovina conocido como BOVIGAM (94). El ensayo se realiza en dos etapas: la primera involucra la estimulación de las células T específicas presentes en sangre completa con los antígenos micobacterianos, habitualmente se utilizan el PPD bovino y el PPD aviar, de manera independiente, este último se considera para diferenciar animales sensibilizados por mycobacterias ambientales. Luego de la estimulación por un período de 18-24 h., se toman los sobrenadantes o plasmas y se realiza un ELISA tipo sándwich para cuantificar el INF- γ liberado en los cultivos por las células T sensibilizadas.

Diferentes estudios muestran una sensibilidad del 93% cuando se usa sola, pero si se usa en conjunto con la prueba de ID su sensibilidad se incrementa hasta en un 95.2% (95). La producción de la citocina correlaciona con el grado de infección por *M. bovis*, por lo que en animales no infectados los niveles de producción de la citocina son bajos. La especificidad de la prueba puede mejorarse mediante el uso de proteínas de secreción como el ESAT-6 (antígeno de secreción temprana), y la proteína del filtrado de cultivo (CFP-10). Antígenos que están presentes en las cepas de campo de *M. bovis* virulentas, pero ausentes en micobacterias del complejo aviar y de la vacuna BCG.

La prueba de INF- γ ha mostrado ser más sensible que la tuberculinización para el diagnóstico de la enfermedad ya que puede detectar animales en estados tempranos de la infección (96). En estudios experimentales, esta prueba ha mostrado detectar ganado infectado con *M. bovis* hasta 14 días posinfección (97).

1.9 VACUNAS

Las vacunas son preparados que pueden contener microorganismos vivos, atenuados o muertos; o bien componentes antigénicos de éstos las cuales son capaces de sensibilizar el sistema inmune del organismo al que se les administre, y de generar memoria inmunológica hacia ellos, la cual determina que, cuando el organismo se exponga a la infección verdadera, se active rápidamente una respuesta defensiva mediada por los linfocitos T y B específicos (98, 99).

1.9.1 Características de la vacuna "ideal":

- Producir una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural
- Ser efectiva (capaz de prevenir la enfermedad en la comunidad)
- Ser eficiente (que produzca un balance beneficioso entre los efectos de su uso y los costos de su administración)
- Ser segura y con el mínimo de efectos adversos
- Producir inmunidad duradera
- Ser compatible su aplicación cuando se efectúa en conjunto con otros antígenos
- Ser administrada en forma no invasora
- Poder administrarse precozmente, en los primeros meses de la vida
- Ser estable (capaz de mantener sus componentes activos durante su almacenaje y transporte)
- Ser de fácil producción y económicamente accesible

1.9.2 Prevención de la TB mediante vacunación

La vacunación contra tuberculosis bovina puede llegar a ser una estrategia importante de control de la enfermedad. Los avances en el estudio de los procesos involucrados en la respuesta inmune protectora hacia la infección por *M. bovis* y avances en las técnicas de biología molecular, junto con la complementación de la secuencia del genoma de *M. bovis*, proveen oportunidades racionales para desarrollar y mejorar nuevas vacunas contra la enfermedad. En este sentido, se han evaluado diversos tipos de vacunas incluidas las basadas en microorganismos muertos, microorganismos vivos atenuados, vacunas subcelulares subunidades vacunales compuestas por proteínas purificadas, péptidos antigénicos, polisacáridos y vacunas de ADN que portan genes específicos de

la micobacteria., los resultados de protección en todos los casos han sido variables; sin embargo, la información que se ha generado ha sido relevante para identificar: el tipo de inmunidad inducida, antígenos inmunogénicos, mejores vías de administración, edad recomendable de vacunación y dosis empleada (100, 101, 102).

Así, se ha mostrado que las vacunas de microorganismos muertos o vacunas subcelulares solas o combinadas con adyuvantes convencionales inducen preferentemente una respuesta humoral y baja respuesta celular, por lo que han resultado poco eficaces en la resistencia al desarrollo de la enfermedad. En cambio las vacunas de microorganismos vivos atenuados son efectivas en la inducción de una buena inmunidad celular, la cual es necesaria para la protección contra *M. bovis*. Sin embargo, estas vacunas sufren el inconveniente de que requieren amplias pruebas de seguridad y pueden inducir reacciones positivas a la prueba de la tuberculina (103).

De manera general, una vacuna efectiva contra la enfermedad deberá no solo evitar la transmisión a otros bovinos, sino también impedir el establecimiento de la infección en los animales vacunados. Una protección absoluta hasta ahora no ha sido posible de alcanzar dado las diferentes condiciones de desafío.

Sin embargo, es innegable que las vacunas para el control de la tuberculosis en el ganado bovino alcanzarán su mayor potencial en los países que no pueden permitirse el lujo de utilizar la estrategia de control “reactor a la prueba de tuberculina y sacrificio”, misma que realizan los países desarrollados. No obstante, para la aplicación de esta herramienta de control deben desarrollarse métodos diagnósticos más específicos que permitan en su momento diferenciar animales infectados de vacunados (104).

1.9.3 Vacuna del Bacilo de Calmette Guerin (BCG)

La vacuna Bacillus Calmette Guerin (BCG) fue desarrollada por los médicos franceses Albert Calmette y Camille Guérin mediante la atenuación de una cepa virulenta de *M. bovis*, originalmente aislada de una vaca con mastitis tuberculosa, luego de 230 pases seriados en un medio de cultivo a base de rebanadas de papa, bilis y glicerol por un periodo de 13 años. Aunque existe controversia sobre su eficacia protectora en seres humanos, observaciones experimentales la señalan como el mejor

candidato contra la tuberculosis bovina; pues, su producción es económica, es segura, relativamente estable y se puede administrar por diferentes rutas y finalmente deriva de la propia especie a partir de la cual se originó, *M. bovis*. Un posible inconveniente de la utilización de la BCG es que bovinos vacunados pueden reaccionar en forma positiva en la prueba de tuberculina. (104)

Históricamente, la BCG fue utilizada por primera vez en el ganado para la protección contra la tuberculosis bovina de más de hace 80 años. Calmette y Guerin en la década de 1920 encontraron que la inmunización con una dosis única de entre 50 y 100 mg de BCG inducía algún tipo de protección del ganado contra la infección artificial y natural pero la protección no era de larga vida (105).

Estudios recientes con BCG se han dirigido a optimizar su eficacia, que al parecer se relaciona con la cepa vacunal empleada, dosis y edad de los animales. De igual modo, se ha observado que la protección inducida por la BCG puede comprometerse por la exposición de los animales a micobacterias medioambientales, señalando la conveniencia de vacunar a los animales a edad temprana. (106)

1.9.4 Vacuna Subcelular a base del Extracto Proteico del Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium bovis*.

Los antígenos específicos de *M. bovis* que evocan el desarrollo de una inmunidad protectora contra la enfermedad, aún no son completamente conocidos; sin embargo, se ha observado que las micobacterias vivas, son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas; esta observación se ha utilizado como argumento para sostener que los antígenos secretados presentes en los extractos proteicos del filtrado de cultivo (CFPE) micobacterianos, muchos de ellos producidos durante el metabolismo activo bacteriano, son esenciales para la inducción de una inmunidad protectora, hecho que ha sido comprobado en varios estudios realizados en modelos animales. De igual modo, se ha observado que varias de las proteínas que los constituyen, evocan una respuesta en estados tempranos de la tuberculosis pulmonar en los bovinos y en el humano (107).

De igual modo, se ha encontrado que en los extractos proteicos de filtrado de cultivo, obtenidos a partir de tiempos cortos de crecimiento (ST-CFPE), están presentes proteínas de fase temprana, varias de las cuales son reconocidas en los inicios de la infección por *M. bovis* en bovinos (108). Tal es el caso de la proteína MPB70, la cual es uno de los principales componentes del filtrado de cultivo de *M. bovis* y se considera forma parte del componente activo del derivado proteico purificado (PPD) bovino. Los estudios de aislamiento y caracterización lo señalan como un antígeno altamente específico, capaz de evocar una respuesta en estados tempranos de la tuberculosis pulmonar en los bovinos (109).

Además, existe información de la presencia de proteínas secretadas de bajo peso molecular, que no son producidas por la cepa vacunal BCG, pero si por cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*, las cuales se ha observado, son altamente reconocidas en las fases tempranas de la infección y principales blancos de las diferentes poblaciones de células T, capaces de inducir una elevada producción de IFN- γ , lo que las ha hecho blanco de atención para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y antígenos potenciales para nuevas vacunas, tal es el caso de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 (110, 11)

1.9.5 Inmunomodulación

La inmunomodulación consiste en la manipulación del sistema inmunológico a través del uso de sustancias de origen biológico o químico para producir una respuesta inmune adecuada al estado que se desea tratar; en este sentido el inmunomodulador puede causar un incremento o una depresión de la respuesta inmunitaria en el individuo o animal al que se le suministre. La inclusión de un inmunomodulador dentro de una vacuna tiene como finalidad potenciar la inmunidad específica que conlleve a una protección contra la replicación de los agentes patógenos (112). En este último caso a los inmunopotenciadores se les denomina adyuvantes inmunológicos. Es por ello que dentro de la inmunología experimental se incluyen las investigaciones hacia la búsqueda y evaluación de nuevas sustancias con actividad inmunomoduladora y con mayor fuerza hacia la inmunopotenciación, o sea, hacia la estimulación de la respuesta inmune. Los inmunomoduladores actúan a diferentes niveles del sistema inmune, inhibiendo o

intensificando las funciones de poblaciones o subpoblaciones de células del sistema inmune como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos células asesinas NK; citotóxicas (CTL), mediante la producción o inhibición selectiva de mediadores solubles como las citocinas y quimiocinas (113).

Dentro de los inmunomoduladores considerados más importantes se encuentran los interferones (IFN), son una familia de proteínas producidas por las células nucleadas en respuesta precoz, anterior incluso a la respuesta antigénica, a las infecciones víricas u otros estímulos (bacterias, endotoxinas, mitógenos). Existen tres tipos de interferones: el IFN alfa (producido por los linfocitos B y los monocitos en respuesta a las infecciones víricas), el IFN beta (producido por fibroblastos en respuesta a infecciones víricas, particularmente a virus RNA bicatenarios) y el IFN- γ (producido por los linfocitos T, en respuesta a varios antígenos y mitógenos). Los interferones poseen además de su acción antiviral, efectos biológicos notables, como la modulación de la respuesta inmune y acciones antiproliferativas. La acción inmunomoduladora, está en relación con el aumento de la actividad fagocitaria de los macrófagos, del procesamiento y presentación antigénica que favorecen la inducción de citocinas mediadoras de la maduración y activación de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos (114, 115).

Por otro lado, estudios realizados en modelos animales y en el humano muestran que la administración exógena de IFN- γ , al momento de la inmunización incrementa la respuesta inmune celular, comprometida en la eliminación de bacterias intracelulares, debido a que se favorece tanto la presentación antigénica, como una mayor activación y proliferación de las células T CD4⁺ específicas y células T CD8⁺ citotóxicas, entre otras funciones (116).

2. JUSTIFICACIÓN.

La vacunación contra la tuberculosis bovina se ha considerado en los últimos años como la mejor estrategia de control de la enfermedad sobre todo en regiones de alta prevalencia. Debido a ello se han evaluado diferentes tipos de vacunas en condiciones controladas, los resultados en muchos de los casos son satisfactorios y han arrojado información relevante, relacionada principalmente con la propia naturaleza de la vacuna empleada, dosis, vía de inoculación y la edad apropiada para que los animales vacunados desarrollen una inmunidad específica y duradera (100, 102, 103); pero pocos estudios existen relacionados con la identificación de antígenos involucrados en el desarrollo de la inmunidad protectora en animales vacunados contra la tuberculosis bovina; debido a ello el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la respuesta inmune humoral y celular en diferentes grupos de vaquillas vacunadas contra la enfermedad; y determinar su perfil de reconocimiento antigénico hacia las proteínas presentes en el extracto proteico del filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*. Para el análisis de reconocimiento se consideraron muestreos al inicio de la vacunación, posteriores a la vacunación y al desafío. Además con fines comparativos se incluyó en el análisis un grupo de vacas positivas a diferentes pruebas diagnósticas a la enfermedad.

3. HIPOTESIS

La vacunación contra la tuberculosis bovina mediante el empleo de la vacuna BCG o del extracto proteico de cultivo (CFPE) de *Mycobacterium bovis* inducirán una respuesta inmune preferentemente de tipo celular efectiva para ofrecer protección. La cual puede incrementarse con la aplicación exógena del IFN- γ como modulador. Debido a las características biológicas entre la vacuna BCG y el CFPE existirán diferencias en el reconocimiento antigénico a las proteínas del CPFE entre los grupos de animales vacunados durante el establecimiento de la inmunidad. Así mismo, considerando las diferencias biológicas entre la vacuna BCG y las cepas virulentas o de campo de *M bovis* existirán diferencias entre animales vacunados de aquellos experimental o naturalmente infectados en el reconocimiento antigénico.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de reconocimiento antigénico al extracto proteico del filtrado de cultivo (CFPE) de *Mycobacterium bovis* de vacas vacunadas contra la tuberculosis bovina y vacas tuberculosas y comparar los resultados obtenidos.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la respuesta inmune humoral de becerras inmunizadas contra la tuberculosis bovina, empleando el extracto proteico de filtrado de cultivo de *M. bovis* y la vacuna de Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) como inmunógenos.
2. Identificar vacas tuberculosas en hatos lecheros mediante las pruebas diagnósticas de tuberculina, ELISA e INF-gamma.
3. Comparar el perfil de reconocimiento antigénico a las proteínas del CFPE de los animales de estudio mediante análisis de inmunotransferencias.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

EL análisis del perfil de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* se realizó en diferentes grupos de animales:

- Grupo I (BCG). 6 becerras de 8-16 meses de edad inmunizadas contra la tuberculosis bovina con 1×10^6 UFC/ml de BCG cepa danesa de *M. bovis*, vía intradérmica, aplicándoseles una segunda dosis 3 semanas después y posteriormente desafiados. (#3,6, 7, 10, 13, 24)
- Grupo II (CFPE). 6 becerras de 8-16 meses de edad inmunizadas contra la tuberculosis bovina con 300 μ g del CFPE de *M. bovis*, vía intradérmica, aplicándoseles una segunda dosis 3 semanas después y posteriormente desafiados. (# 9, 11, 14, 19, 20, 25)
- Grupo III (CFPE+IFN γ). 6 becerras de 8-16 meses de edad inmunizadas contra la tuberculosis bovina con 300 μ g del CFPE de *M. bovis*, vía intradérmica pero dos días antes de la vacunación recibieron

200 ng de IFN- γ bovino recombinante vía subcutánea, aplicándoseles una segunda dosis 3 semanas después y posteriormente desafiados. (# 4, 12, 16, 17, 22, 23)

Grupo IV (CONTROL). 6 becerras de 8-16 meses de edad a las cuales se les administro PBS como placebo. (# 1, 2, 5, 8, 15, 21)

Grupo V (REACTORES). 10 bovinos en producción considerados reactores positivos Por pruebas de diagnostico (tuberculina, ELISA, IFN- γ).
(# 22, 28, 75, 81, D, 3, 27, L2/15 15, 173, 144)

Grupo VI (NO REACTORES). 24 becerras de 8-16 meses de edad, al día 0 de la investigación. (3, 6, 7, 10, 13, 24, 9, 11, 14, 19, 20, 25, 4, 12, 16, 17, 22, 23, 1, 2, 5, 8, 15, 21)

6.1 Estudio de vacunación contra la tuberculosis bovina.

6.1.1 Animales de experimentación.

Para el análisis del grupo vacunado contra la tuberculosis bovina se utilizaron un total de 24 becerras Holstein de 8-16 meses de edad, adquiridas en hatos bajo control sanitario, las cuales fueron previamente evaluadas por pruebas de tuberculina, IFN- γ y ELISA, para determinar su estado de animal libre de la enfermedad. Luego de su adquisición las becerras se alojaron en corrales de las instalaciones del CENID-Microbiología-INIFAP, donde tuvieron un periodo de adaptación de tres semanas.

6.1.2 Diseño experimental

Las 24 becerras de 8-16 meses se dividieron al azar en cuatro grupos de seis animales cada uno. Los cuales estuvieron estabulados por grupo durante todo el periodo experimental. El grupo I (BCG) se inmunizó con 1×10^6 UFC/ml de BCG cepa danesa de *M. bovis*, vía intradérmica, el grupo II (CFPE) se inoculó subcutáneamente en la tabla del cuello con 300 μ g del CFPE, el grupo III (CFPE+IFN- γ) se inoculó subcutáneamente en la tabla del cuello con 300 μ g del CFPE pero dos días antes de la vacunación recibieron 200 ng de IFN- γ bovino recombinante vía subcutánea, el grupo IV (CONTROL) fueron inoculados con PBS como placebo.

Tres semanas después de la primera inmunización los animales fueron nuevamente inoculados de acuerdo al tratamiento asignado para cada grupo.

Los animales de los diferentes grupos incluyendo el grupo control fueron desafiados intratraquealmente, a los seis meses después de haber sido inmunizados, el desafío se realizó con una dosis de 1×10^4 UFC de la cepa virulenta de *M. bovis* No. 9930, aislada de casos clínicos. El sacrificio de los animales se efectuó a los 5 meses después del desafío, bajo condiciones humanitarias e higiénicas.

6.1.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular.

La respuesta inmune de los animales vacunados se evaluó inicialmente durante el primer mes, cada 15 días, y posteriormente a intervalos de un mes durante un periodo de seis meses, mediante la prueba de ELISA (ensayos inmunoenzimáticos) comparativos empleando como antígeno el CFPE de *M. bovis* y el CFPE de *M. avium*. Los sueros obtenidos en diferentes muestreos fueron empleados para el análisis de inmunotransferencias, a fin de determinar el perfil de reconocimiento hacia las proteínas del CFPE de *M. bovis*. La respuesta celular se monitoreo con la prueba de IFN- γ , a través de los diferentes muestreos evaluando la producción de IFN- γ inducido en cultivos de sangre estimulados con el PPD bovino y el PPD aviar (117).

6.2 Selección de animales infectados reactivos.

Se realizaron muestreos en un hato lechero de alta prevalencia de tuberculosis localizado en el Municipio de Acatlán, Hidalgo. Inicialmente se aplicó la prueba simple anocaudal para identificar posibles reactivos, posteriormente a aquellos que resultaron positivos se les realizó la prueba de tuberculina doble comparativa en la tabla del cuello, y se tomaron muestras sanguíneas con y sin anticoagulante para evaluar niveles de anticuerpos mediante la prueba de ELISA comparativo y para realizar la prueba de IFN- γ . De acuerdo a los criterios de positividad en las diferentes pruebas se seleccionaron 10 animales para realizar el análisis de inmunotransferencia.

6.3 Selección de animales no reactivos.

Para este grupo se consideraron los sueros de las 24 becerras que iban a entrar al estudio de vacunación, al día cero. Debido a que éstos se evaluaron previamente y mostraron su negatividad a las pruebas diagnósticas de tuberculina, ELISA e IFN- γ .

6.4 Obtención de los Extractos Proteicos del Filtrado de Cultivo.

Se empleó la cepa AN5 de *M. bovis* para obtener el extracto proteico del filtrado de cultivo que se utilizó para la inmunización de los bovinos y para la evaluación de la respuesta inmune mediante las pruebas de ELISA e inmunotrasferencias. La micobacteria se cultivó en el medio sintético de Dorset-Henley a 37°C por seis semanas, al término, los cultivos se filtraron obteniendo el medio libre de bacterias. Las proteínas presentes en el filtrado se precipitaron con sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] a una saturación final del 80 %, con agitación constante a 4° C por 24 h., el precipitado resultante se centrifugó 15 000 rpm por 1 h a 4 °C, para empaquetarlo y posteriormente resuspender en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2. El material disuelto se colocó en bolsas de diálisis (Spectra/Por No 3787-D40) con punto de corte de 3000 kDa con la finalidad de eliminar el exceso de sales mediante el proceso de diálisis. El material así obtenido se designó como extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína del CFPE se determinó por el método de Bradford (118) y fue dividido en alícuotas de 1ml, las cuales se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Por un procedimiento similar se obtuvo el CFPE de *M. avium* cepa D4 ER el cual fue utilizado en la prueba de ELISA comparativa.

6.5 Técnica de ELISA

Se sensibilizaron placas de ELISA (Maxisorb, NUNC) con los CFPE de *M. bovis* y de *M. avium* por separado a razón de 5 µg/100 µl por pozo disuelto en solución amortiguadora de carbonatos (0.1 M) pH 9.6. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h., transcurrido el tiempo se eliminó la solución y éstas se lavaron cinco veces con solución amortiguadora de fosfatos salino adicionada con 0.1 % de tween- 20 (PBST). Se colocaron 100 µl de solución bloqueadora (leche descremada al 3 % en PBST) e incubaron las placas por 1h a 37°C, luego se lavaron cinco veces con PBST. Se depositaron 100 µl de la dilución 1:50 de cada uno de los sueros por duplicado disueltos en solución bloqueadora e incubó por 1 h a 37°C. Nuevamente se lavaron las placas y se agregaron 100 µl de proteína-G peroxidasa (No. catalogo P8651, Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) a una dilución 1: 10 000 en solución bloqueadora, incubando 1h a 37°C. Después de lavar nuevamente cinco veces, se agregaron 100 µl por pozo de solución de revelado [4 µg de orto-fenilendiamina (No.

Catalogo P-9029, Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) disuelta en 10 ml solución amortiguadora de citratos pH 4.5, adicionando 4 µl de H₂O₂ al 3%). La reacción se interrumpió a los 10 min. Mediante la adición de 50 µl/pozo de la solución de paro (H₂ SO₄ 2M). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 492 nm. Para fines diagnósticos el punto de corte empleado fue de 0.3 DO₄₉₂ determinado previamente (119).

6.6 Prueba de interferón gamma (IFN-γ)

De cada animal a evaluar 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 µl de PPD bovino; 100 µl de PPD aviar (ambos PPD a 0.3 mg/ml) ESAT-6 1 µl/ 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 producción de IFN-γ inducido por el estímulo antigénico.

El ensayo se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante¹, 100 µl 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 µl 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 (94, 117).

6.7 Análisis electroforético del CFPE de *M. bovis*.

El CFPE de *M. bovis* fue sujeto a un análisis electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio al 0.1% (SDS-PAGE) de acuerdo al método

¹ Bovine γ Interferón Test Kit (BOVIGAM, CSL Veterinary Australia)

descrito por Laemmli (120), empleando un gel espaciador al 5% y un gel introductor al 12.5% de acrilamida; se colocaron 15 μg del CFPE en condiciones naturales y desnaturizantes en los carriles correspondientes, al igual que los marcadores de peso molecular (kaleidoscope prestained standards, No. Catálogo 161-0324, BIO-RAD); los corrimientos se efectuaron a 150 volts empleando una solución buffer de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1 % en una cámara de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN 3 cell, No. Catalogo 165-3301, BIO-RAD). Posteriormente se sacaron y fijaron sumergiéndolos en una mezcla de ác. acético/metanol para después ser teñidos con nitrato de plata empleando un kit comercial (Silver stain plus, No. Catalogo 161-0449, BIO-RAD). Para los análisis de transferencia se realizaron electroforesis preparativas colocando 350 μl de una mezcla preparada con 300 μl del CFPE y 400 μl de buffer de muestra en cada compartimiento de la cámara. Se prepararon los marcadores con 10 μl de marcador caleidoscópico y 30 μl de buffer de muestra y colocaron 15 μl de la mezcla en los pozos correspondientes.

6.8 Análisis de Inmunotransferencia.

6.8.1 Electrotransferencia

El análisis se realizó de acuerdo al método de Towbin (121), después de la electroforesis, se cortaron membranas de nitrocelulosa (0.45 μm) al tamaño del gel (10 cm. x 7.5 cm.) utilizando guantes. Treinta min. antes de la transferencia, en un recipiente con suficiente amortiguador de transferencia (tris 23 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v) se humedecieron las fibras y el papel filtro. Posteriormente, en otro recipiente se preparó el cassette de transferencia colocando en el siguiente orden: fibra, filtro, gel, membrana, filtro, fibra; teniendo cuidado de no quedar burbujas atrapadas entre las diferentes capas. Se cerró el cassette e introdujo en el modulo o contenedor. Seguido éste, se colocó en la cámara de electrotransferencia (Trans-blot, No. Catalogo 170-3930, Bio-Rad) junto con la unidad de enfriamiento del sistema previamente congelada. Se llenó la cámara con el amortiguador de transferencia (anexo de reactivos), se cerró la cámara de tal manera que el ánodo (-) quedará del lado del gel y el cátodo (+) de lado de la membrana de nitrocelulosa y se conectó a la fuente poder aplicando un voltaje de 100 V x 1 h. Una vez terminada la transferencia se retira la membrana del cassette con guantes y se dejó secar a temperatura ambiente sobre una hoja blanca,

finalmente se dobló la hoja teniendo cuidado de no romper la membrana y cubrió con papel aluminio para almacenarla en refrigeración hasta su uso.

6.8.2 Inmunotransferencia

Se cortó la membrana en tiras delgadas de 4 mm y se colocaron en tubos de 10 ml con tapón para efectuar los análisis con los diferentes sueros de los animales. Las tiras de la membrana se lavaron con amortiguador tris-HCl salino (tris bufer salino (TBS) en agitación durante 5 min. (2.5 ml por tubo), se decantó al finalizar el tiempo y agregó una solución de leche descremada al 3% en amortiguador de fosfatos salino con Tween 20 al 0.1% (PBST), para bloquear los sitios de unión libres de la membrana, manteniéndose en agitación por 45 min., se decantó y adicionó solución de lavado (TTBS) en agitación por 10 min., se decantó la solución y se agregaron los sueros diluidos 1:50 en agitación durante toda la noche. Se decantó y se realizaron 2 lavados con amortiguador de citratos salino con tween 20 al 0.1 % (TCBS) en agitación por 5 min., se decantó y se adicionó el conjugado a una dilución 1:2000, quedándose en agitación por 2 h.; se decantó y realizaron dos lavados con solución de lavado TTBS y otro con tris bufer salino (TBS). Finalmente la reacción antígeno- anticuerpo se reveló empleando una solución de 4-cloro 1 α naftol 0.05%, H₂O₂ 0.015 %, metanol 16.7% en TBS hasta el desarrollo de color (122). La reacción se detuvo decantando la solución de revelado y mediante la adición de agua destilada. Como control positivo se utilizó un suero hiperinmune de conejo hacia el CFPE de *M. bovis* elaborado previamente.

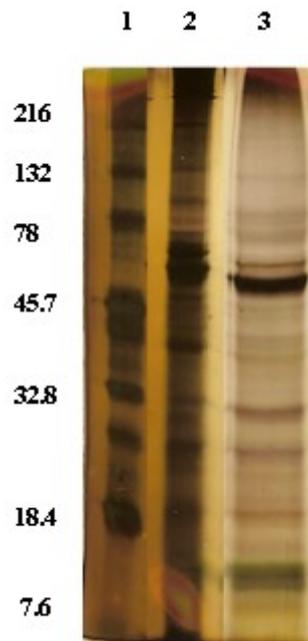
6.9 Análisis estadístico

Los resultados de inmunotransferencia obtenidos para los diferentes grupos vacunados y control en los diferentes muestreos posvacunación y posdesafío se analizaron mediante la prueba estadística de Ji-cuadrada para determinar la diferencia entre las frecuencias observadas en tiempo y entre grupos a un nivel de significancia $\alpha = 0.1$, empleando el programa GSTAT-STUDENT, considerando en el análisis si el antígeno o antígenos son o no reconocidos, sin tomar en cuenta el grado de intensidad. La misma prueba estadística se empleo para analizar los resultados de animales reactivos y no reactivos.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis Electroforéticos del CFPE de *M. bovis*.

En la Fig.3 se presentan los corrimientos electroforéticos de los CFPE de *M. bovis* a la sexta semana de cultivo, realizados bajo condiciones reductoras y no reductoras. Para el CFPE en condiciones naturales se observaron principalmente 21 proteínas con pesos moleculares aparentes de 216, 200, 132, 110, 85, 80, 72, 70, 65, 60, 50-55, 45-47, 38, 35, 32, 26, 23, 22, 19, 10 y 6 kDa. Bajo condiciones reductoras el número de bandas proteicas fue mayor, lo cuál indica la existencia de proteínas constituidas por dos o más subunidades, las bandas principales en condiciones reductoras tienen pesos moleculares aparentes de 100, 65, 54, 50, 46, 45, 42, 38, 34, 38, 24, 21, 20, 19 y 14 kDa.



Pesos Moleculares (PM)

Figura 3. Electroforesis del CFPE de *M. bovis* cepa AN5 en geles SDS-PAGE al 11.5 %; Carril 1, estándares de peso molecular (PM) expresados en kDa; Carriles 2 y 3, CFPE de *M. bovis* en condiciones naturales y reductoras.

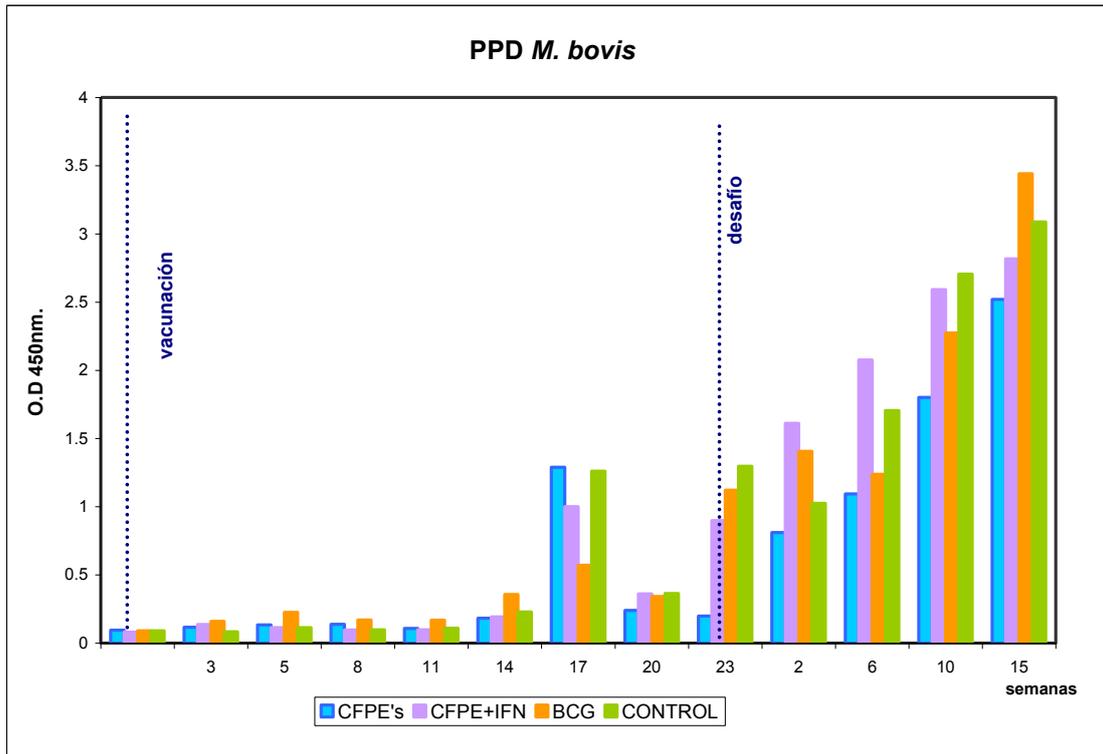
Evaluación de la inmunidad Celular

La inmunidad celular de los animales vacunados y control se evaluó periódicamente mediante la producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con PPD bovino y PPD aviar desde el momento de la vacunación hasta su sacrificio. Considerando la fase posvacunación que abarca desde el día 0 hasta el momento del desafío (semana 26) la producción de la citocina fue significativamente mayor para el grupo vacunado con BCG en las semanas 5 y 14, más que para los otros grupos vacunados, con valores de 0.23 y 0.36 DO para las semanas señaladas, (**Grafica 1**).

En la semana 17 hubo un incremento substancial en la producción de IFN- γ para todos los grupos en estudio incluyendo el grupo control, siendo esta producción superior para el grupo vacunado con el CFPE y el grupo control, 1.29 y 1.26 DO respectivamente; seguidos del grupo vacunado con CFPE+IFN- γ , 1.0 DO, mientras que para el grupo vacunado con BCG el valor determinado fue de 0.57 DO. Estos niveles de producción disminuyeron en los diferentes grupos en la semana 20, sin dejar de ser importantes. A la semana 23 los grupos tuvieron un incremento muy similar al observado en la semana 17, a excepción del grupo vacunado con CFPE que mantuvo un nivel relativamente bajo, 0.2 DO.

Después del desafío, los niveles de IFN- γ fueron significativamente superiores a los observados en la etapa posvacunación, además de tener un comportamiento gradual en la producción. En la última semana que antecedió al sacrificio el grupo vacunado con BCG tuvo el valor más alto registrado durante todo el periodo de evaluación sobre todo los grupos, 3.44 DO; seguido del grupo control con 3.08 DO y del grupo vacunado con CPFE + IFN- γ , 2.8 DO; mientras que el grupo vacunado con el CFPE mostró la menor producción durante todo el periodo posdesafío, 2.51 DO.

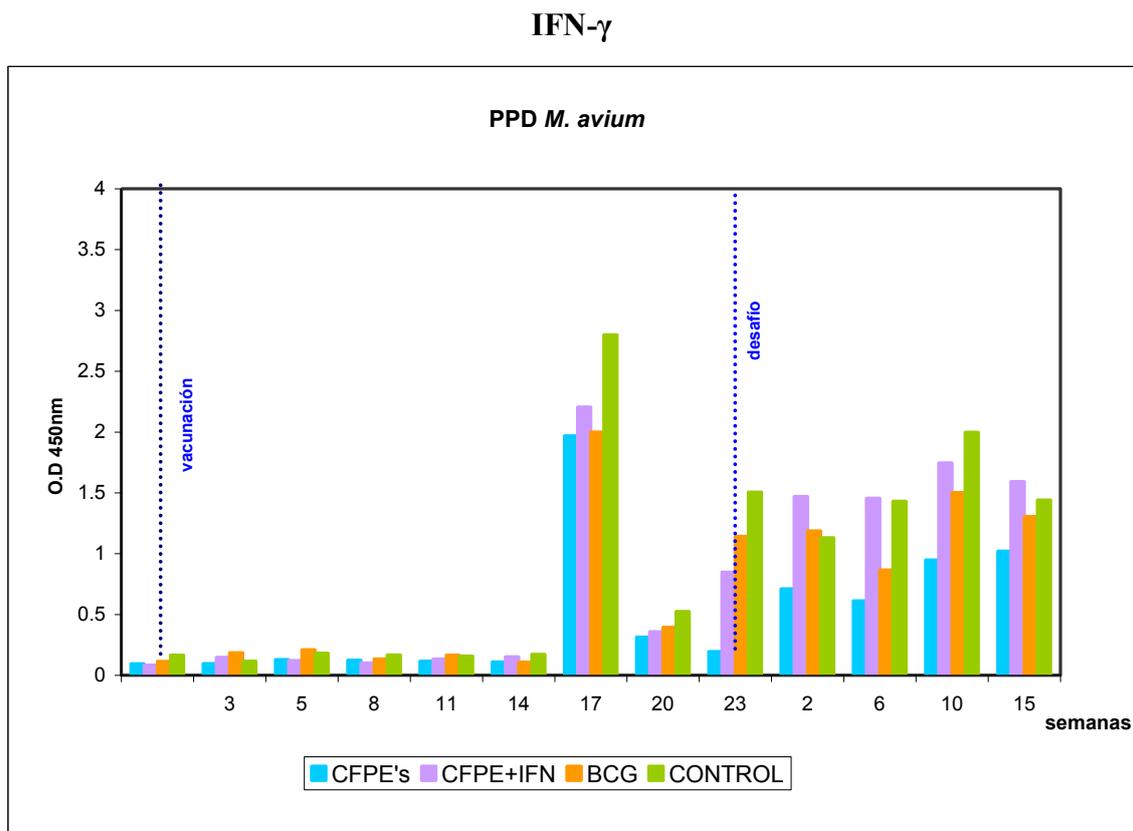
IFN- γ



Gráfica 1. Valores promedio de producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con el PPD de *M. bovis*, determinados para los diferentes grupos de animales vacunados y control antes y después del desafío.

Los resultados de producción de IFN- γ en cultivos estimulados con PPD aviar mostraron en promedio niveles inferiores a los obtenidos con el PPD bovino, DO <0.1 para todos los grupos tratados y control de la semanas 0 a 14., (**Grafica 2**). No obstante, en la semana 17 hubo un aumento considerable en los niveles de IFN- γ para todos los grupos superior al que se determinó para ese tiempo con el PPD bovino, siendo éste mas elevado para el grupo control, 2.8 DO, seguido del grupo vacunado con CFPE+ IFN- γ con 2.2 DO; mientras que para los grupos vacunados con CFPE y con BCG los valores fueron de 2.0 DO y 1.96. Esta situación parece estar relacionada con la colonización que se presentó por *Corynebacterium xerosis* en las fosas nasales de los animales en estudio durante ese periodo, y que aparentemente influyó en la respuesta inmune de los animales por la reactividad cruzada entre éste género bacteriano y *Mycobacterium*. Tres semanas después de ese incremento hubo una disminución notoria para todos los grupos. Para la semana 23 se observó otro incremento para los

grupos vacunados con CFPE + IFN- γ , BCG y control, a excepción del grupo vacunado con el CFPE que mantuvo un nivel bajo ($DO < 0.2$). Después del desafío, la producción de IFN- γ en presencia de éste antígeno se incrementó de manera gradual para todos los grupos; no obstante esta respuesta fue menor a la que se determinó en presencia del PPD bovino, lo cual indica que la respuesta inmune de los animales después del desafío estaba dirigida hacia antígenos específicos de *M. bovis*, pese a que durante un periodo del estudio se observó una respuesta altamente significativa al PPD aviar.

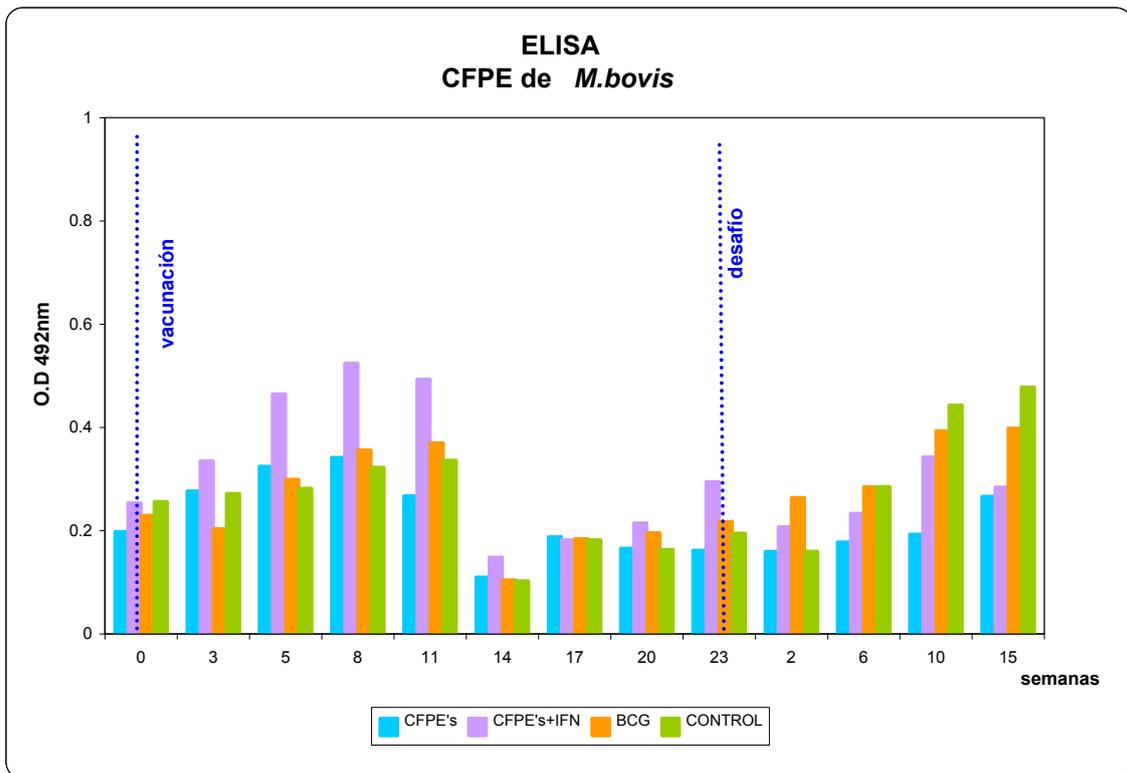


Gráfica 2. Valores promedio de producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con el PPD de *M. avium*, determinados para los diferentes grupos de animales vacunados y control antes y después del desafío.

Evaluación de la inmunidad humoral

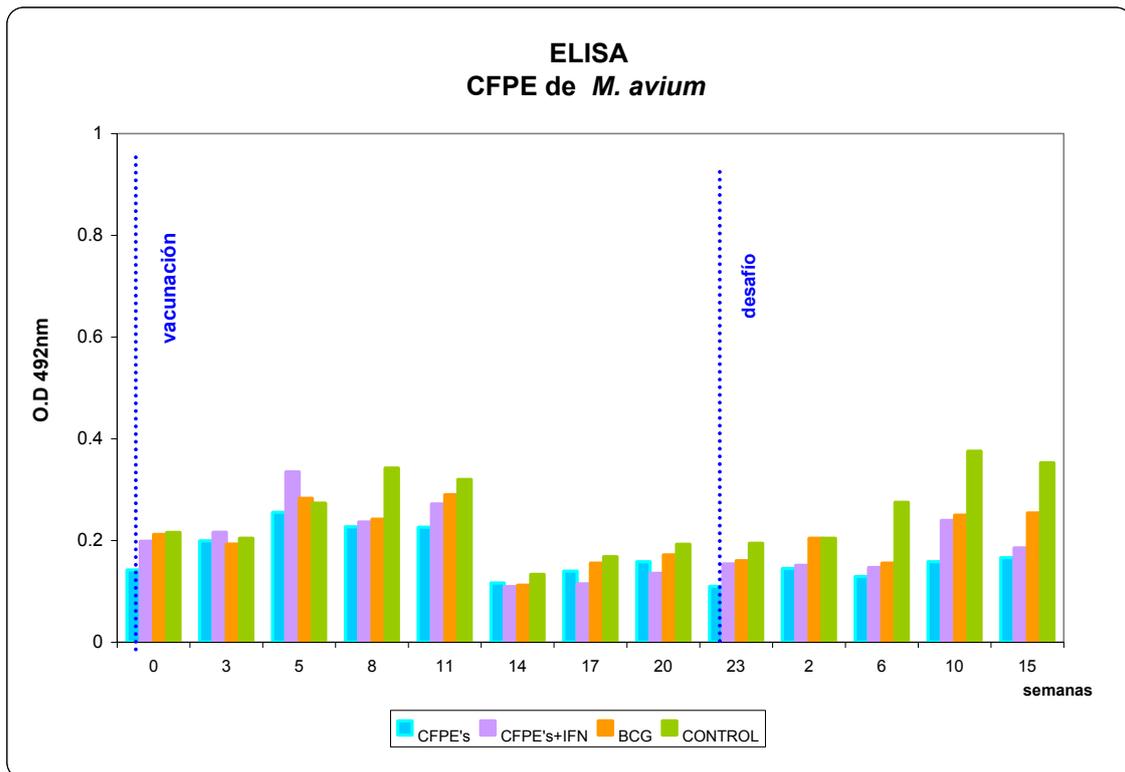
Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA empleando como antígeno del CFPE de *M. bovis* denotan valores de anticuerpos importantes para el grupo de vacunados con CFPE + IFN- γ durante las primeras once semanas posvacunación mas que para los otros grupos tratados y control, (**Gráfica 3**). En la semana 14, los valores de todos los

grupos bajaron considerablemente, pero en las semanas siguientes se presentó un ligero incremento en los diferentes grupos. Este hecho se relacionó en tiempo con los niveles altos de producción de IFN- γ observados para los diferentes grupos. Posterior al desafío los niveles de anticuerpos de todos los grupos aumentaron gradualmente observándose los valores mas altos en el grupo control.



Gráfica 3. Valores promedio de los niveles de anticuerpos al CFPE de *M. bovis*, evaluados por ELISA en los diferentes grupos inmunizados antes y después del desafío.

En la evaluación de anticuerpos empleando el CFPE de *M. avium* se observó en la semana 5 un ligero incremento de éstos para todos los grupos, teniendo el mayor valor el grupo inmunizado con el CFPE + IFN- γ . En la semana 11 el grupo control alcanza el valor mas alto observado durante el periodo de evaluación (0.5 D.O.), manteniéndose con valores bajos para los grupos restantes, (**Grafica 4**). En la semana 14 los niveles de anticuerpos disminuyeron para todos los grupos, similar a lo observado empleando el CFPE de *M. bovis* para ese periodo de evaluación. Luego del desafío los valores mas altos se registraron para el grupo control, sin embargo estos fueron menores a los que se registraron hacia los antígenos de *M. bovis*.



Gráfica 4. Valores promedio de los niveles de anticuerpos al CFPE de *M. avium*, evaluados por ELISA en los diferentes grupos inmunizados antes y después del desafío.

Resultados de análisis de Inmunotransferencias en animales vacunados y posteriormente desafiados

Se efectuó un análisis de reconocimiento antigénico a las proteínas del CFPE de *M. bovis* para todos los grupos en diferentes tiempos de muestreo. Los resultados en general muestran diferencias en la intensidad de reconocimiento de los antígenos en función del tiempo durante las diferentes etapas que contemplo el estudio. Al inicio del experimento los 24 animales de los diferentes grupos mostraban ya cierta reactividad, aunque en diferente grado, a varias de las principales proteínas del CFPE; dentro de éstas, las más fuertemente reconocidas fueron las proteínas de 50-55, 60, 75 y 78 kDa; otras reconocidas con menor intensidad fueron las de 10, 19, 32, 38, 45-47, 65, 70, 80, 85, 110, 132, 200, 216; y las menos reconocidas fueron las proteínas de 26 y 72 kDa y en las que no hubo reconocimiento fueron las proteínas 6, 22, 23 y 35 kDa.

(Cuadro V, Figura 4).

A los 61 días posvacunación en el grupo de animales vacunados con BCG no se observó reconocimiento a prácticamente ninguna proteína del CFPE, a excepción de una respuesta moderada a la proteína de 60 kDa y en menor grado a las proteínas del complejo 45-47 y a la de 78 kDa (**Gráfica 5, Cuadro VI, Figura 5**). Respuesta que permaneció sin mucha variación para el día 103 posvacunación en estos animales, (**Cuadro VII, Figura 6**). A los 173 días, casi seis meses después de la vacunación se observó un mayor reconocimiento a diferentes antígenos para este grupo, dentro de ellos, los de: 19, 32, 45-47, 60, 65, 75 y 78, siendo reconocidos más intensamente los de 60 y 65 kDa, (**Cuadro VIII, Figura 6**). A los 43 días posdesafío, se incrementó el número de animales que mostraron reactividad a los antígenos de 19, 32, 60 y 70 kDa; mientras que, las proteínas de 6, 38 y 85 fueron reconocidas por al menos uno de éstos animales con baja intensidad, (**Cuadro IX, Figura 8**). A los 72 días posdesafío la reactividad se incrementó en número de antígenos e intensidad, siendo más notoria para los antígenos de: 19, 32, 38, 45-47, 50, 55 y 75, y en menor grado para los de 60, 65, 78, 85, 132 y 216. (**Grafica 5, Cuadro X, Figura 9**).

Para el grupo vacunado con CFPE la respuesta a los 61 días posvacunación fue mayor a los antígenos de 50, 55, 75 y 78 kDa para algunos animales del grupo; en tanto que, un animal reconoció prácticamente todos los antígenos del CFPE (animal No 9). Otros mostraron reactividad a los antígenos de 6, 19 y 110 kDa, (**Gráfica 6, Cuadro VI, Figura 5**). Situación que fue similar a los 103 días posvacunación, notando una mayor reactividad para los antígenos de 32 y 45-47 kDa, (**Cuadro VII**). Para el día 173 la reactividad a los antígenos disminuye en casi todos los animales, pero permanece aún fuerte en el animal No 9, (**Cuadro VIII, Figura 7**). A los 43 días posdesafío se incrementó la intensidad y el número de antígenos reconocidos, siendo los de: 32, 38, 45-47, 50, 55, 60, 65, 70, 72, 75 y 78 kDa los antígenos en los que se observó mayor reactividad por los animales del grupo; en menor grado se reconocieron los antígenos de: 10, 19, 35, 80, 85, 110, 132, 200 y 216 kDa, (**Cuadro IX, Figura 8**). A los 72 días posdesafío, la intensidad y número de antígenos reconocidos disminuyó, permaneciendo moderada para los antígenos de: 32, 38, 45-47, 50, 55, 60 y 78 kDa. En al menos uno de los animales del grupo se observó reactividad al antígeno de 6 kDa (ESAT-6) y 10 kDa (CFPE-10), (**Gráfica 6, Cuadro X, Figura 9**).

Para el grupo vacunado con CFPE + IFN- γ la respuesta a los 61 días posvacunación estuvo dirigida solo a los antígenos de: 19, 78, 80 y 216 kDa, (**Gráfica 7, Cuadro VI, Figura 5**). A los 103 días posvacunación la reactividad aunque moderada, se incrementó a un mayor número de antígenos, ésta fue hacia las proteínas de: 32, 45-47, 50, 55, 60, 75, 78, 80, 85, 132 y 216 kDa, (**Cuadro VII, Figura 6**). La reactividad descendió a los 173 días posvacunación, permaneciendo significativa para las proteínas de: 19, 32, 45-47, 50-55, 60, 65, 78 kDa y 85 kDa. (**Cuadro VIII, Figura 7**). A los 43 días posdesafío el reconocimiento estuvo dirigido a las proteínas de 19, 45-47, 60, 65, y 78 kDa; uno de los animales mostró reactividad a las proteínas de 80 y 85 kDa (**Cuadro IX, Figura 8**). A los 72 días posdesafío, en solo tres animales del grupo se observó reactividad para las proteínas de 6, 10, 19, 38, 45-47, 60, 78 y 216 kDa. (**Cuadro X, Figura 9**). Es importante señalar la reactividad de los animales de este grupo a los antígenos ESAT-6 y CFPE 10, considerados relevantes para la identificación de animales infectados.

Para el grupo control, la respuesta a los 61 días posvacunación en general fue débil para la mayoría de los animales, no obstante, la reactividad observada estuvo dirigida a los antígenos de: 32, 50-55 y 60 kDa, (**Gráfica 8, Cuadro VI, Figura 5**). La respuesta a los 103 días posvacunación fue similar, manteniéndose en mayor porcentaje al antígeno de 32 kDa, (**Cuadro VII, Figura 6**). Para el día 173, se observó que uno de los animales mostró mayor reactividad a los antígenos de 32, 35 y 38 kDa. Mientras que, el 60 % reconoció la proteína de 60 kDa. (**Cuadro VIII, Figura 7**). A los 43 días posdesafío los antígenos mayormente reconocidos fueron los de 32, 38, 45-47, 60, 65 y 78 kDa, (**Cuadro IX, Figura 8**). A los 72 días posdesafío la reactividad, aunque no presente en todos los animales, fue mayor a los antígenos de 19, 32, 45-47, 50-55. Uno de ellos mostró reactividad además a los antígenos de 35 y 38 kDa. Pero en ninguno fue evidente una respuesta a los antígenos de bajo peso molecular, (**Cuadro X, Figura 9**)

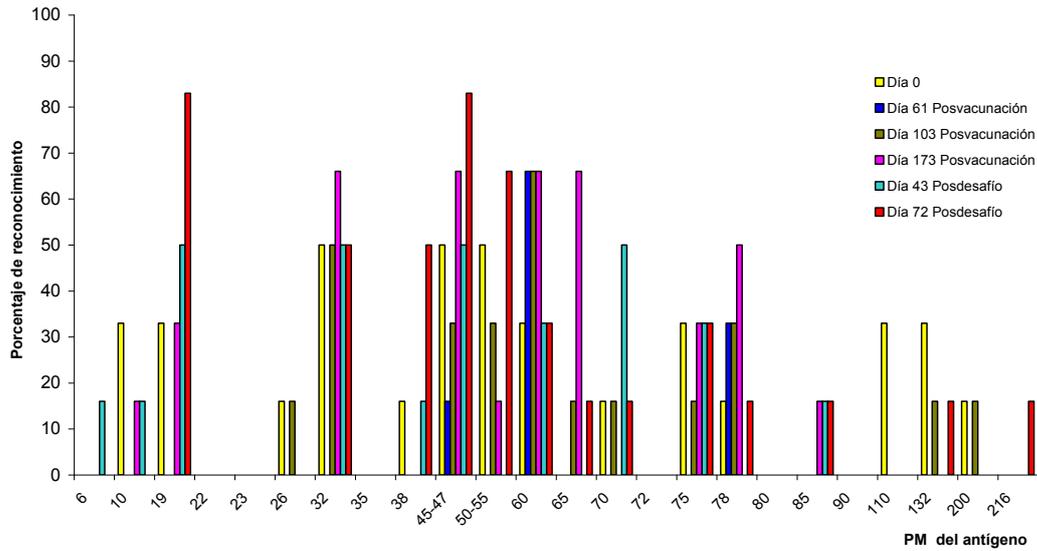
Los resultados en general mostraron variaciones para los diferentes grupos en el reconocimiento antigénico, tanto en intensidad como en porcentaje de animales que reconocen los antígenos del CFPE en los diferentes tiempos de muestreo; situación que fue evidente tanto el periodo posvacunación como posdesafío.

De acuerdo al análisis estadístico el reconocimiento antigénico en la etapa posvacunación para los grupos vacunados en relación al grupo control fue significativo para un número bajo de antígenos en función del tiempo. La mayor reactividad significativa ($P < 0.1$) se observó a los 103 y 173 días posvacunación dirigida principalmente a las proteínas del complejo 45-47, 60, 65, 78, 80 y 85 kDa para los grupos tratados; en tanto que, se observó reactividad significativa para el antígeno de 132 kDa en el grupo vacunado con el CFPE a los 61 días, misma que deja de serlo a los 173 días, tiempo que para el grupo control es significativa, (Cuadros XI y XII).

En la etapa posdesafío la mayor reactividad significativa se observó a los 43 días principalmente en el grupo vacunado con el CFPE, dirigida a las proteínas del complejo 50-55, 65, 70, 72, 75, 778, 110 y 200 kDa. A los 72 días posdesafío solo fue significativa para la proteína de 200 kDa para el mismo grupo, (Cuadro XII).

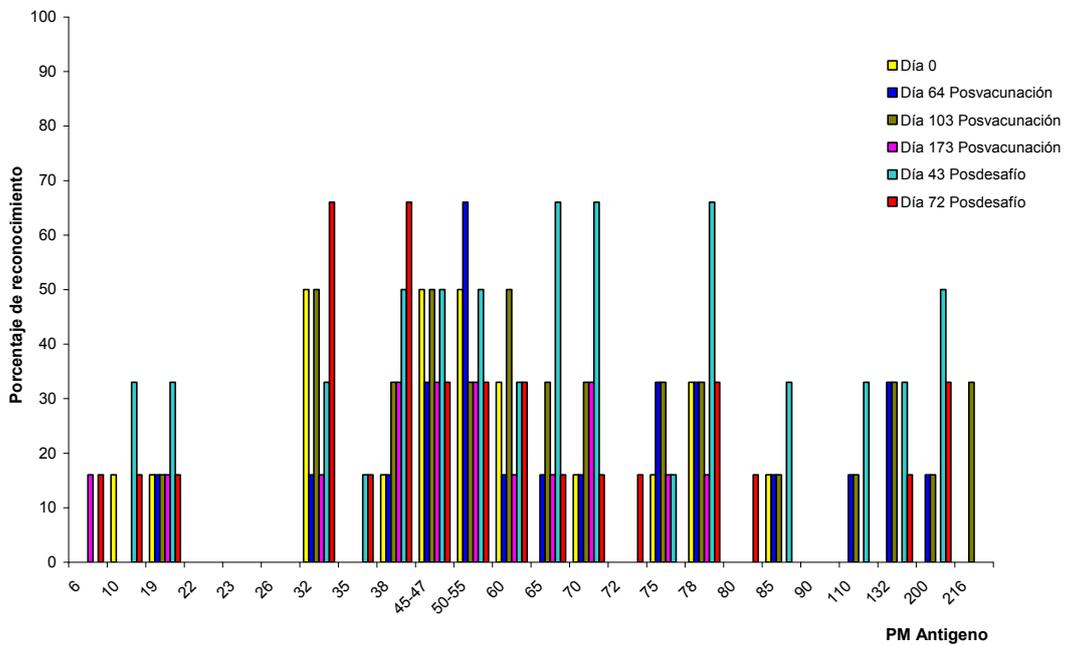
Sobresale el hecho de que los animales de los diferentes grupos vacunados y control no exista reactividad o ésta sea prácticamente baja hacia los antígenos de 26, 23, 10 y 6 kDa durante las diferentes fases experimentales, incluyendo el periodo posdesafío, (Cuadros XIII, XIV, XV y XVI).

RECONOCIMIENTO EN EL GRUPO VACUNADO CON BCG



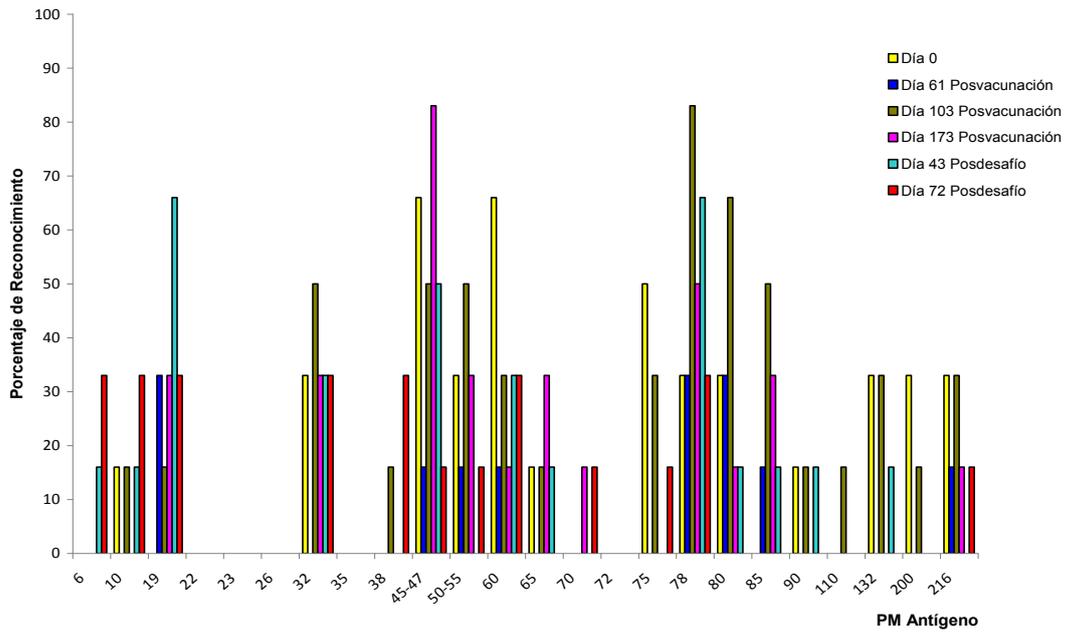
Gráfica 5.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo vacunado con BCG determinados en los periodos posvacunal y posdesafío. El porcentaje se calculo considerando el número de animales reactivos dividido entre el número total de animales que conforma cada grupo.

RECONOCIMIENTO EN EL GRUPO VACUNADO CON CFPE



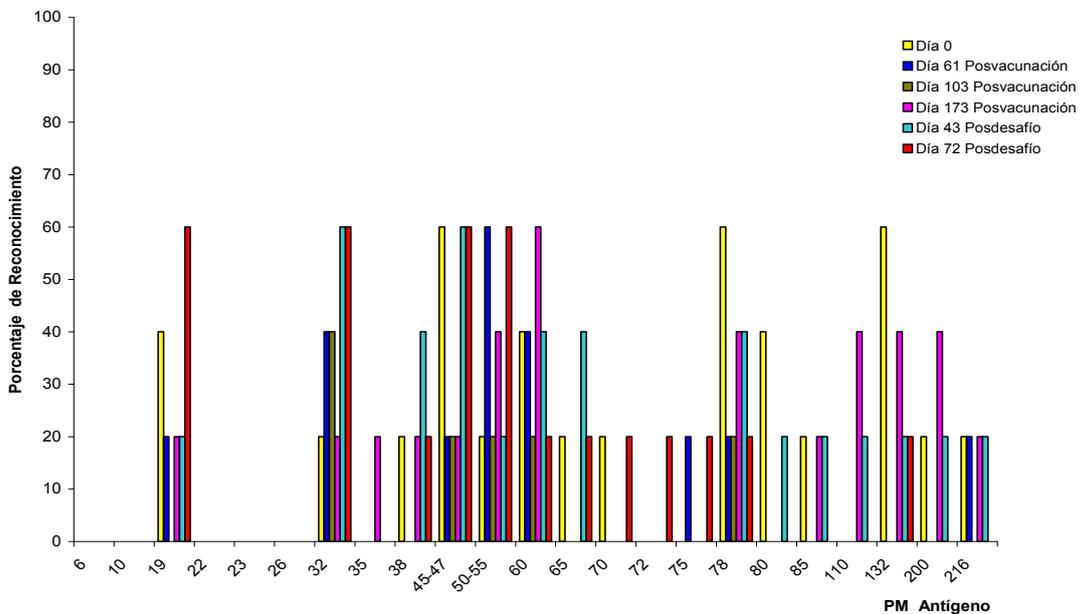
Gráfica 6.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo vacunado con CFPE determinados en los periodos posvacunal y posdesafío

RECONOCIMIENTO EN EL GRUPO VACUNADO CON CFPE +IFN



Gráfica 7.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo vacunado con CFPE + IFN γ determinados en los periodos posvacunal y posdesafío

RECONOCIMIENTO EN EL GRUPO CONTROL



Gráfica 8.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo control determinados en los periodos posvacunal y posdesafío

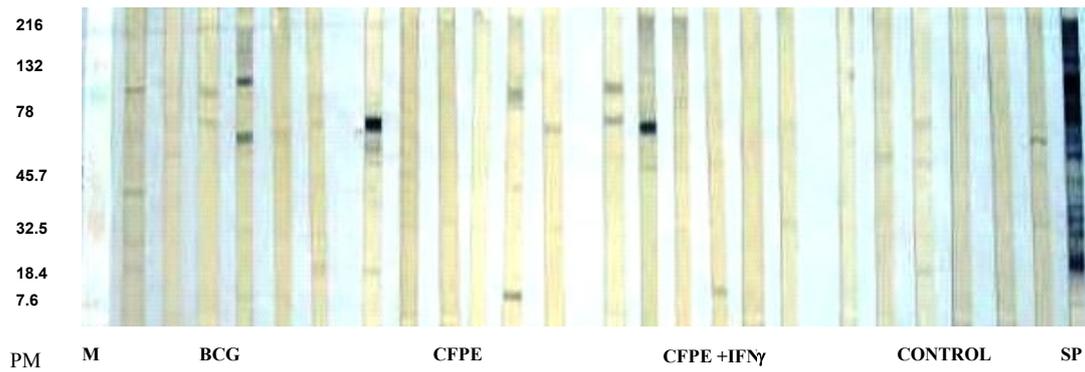


FIGURA 4 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 0, en los diferentes grupos vacunados y grupo control
 PM= peso molecular en kDa, M= marcadores caleidoscópicos, SP= suero positivo.

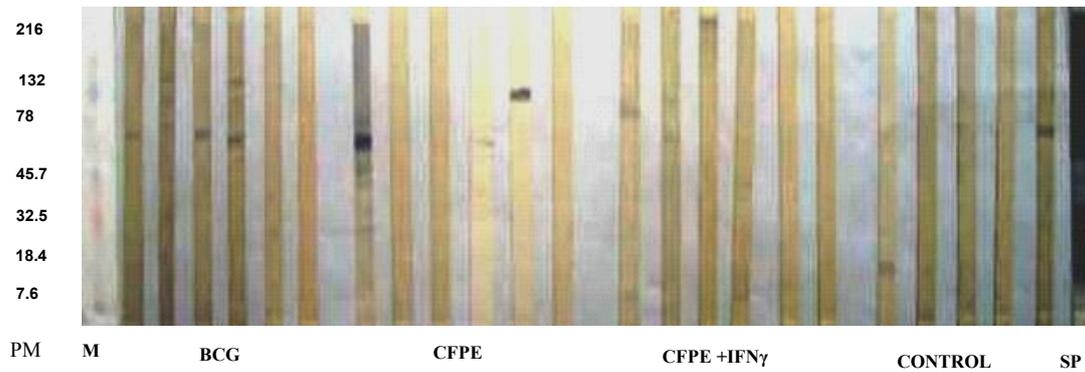


FIGURA 5 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 61, en los diferentes grupos vacunados y grupo control

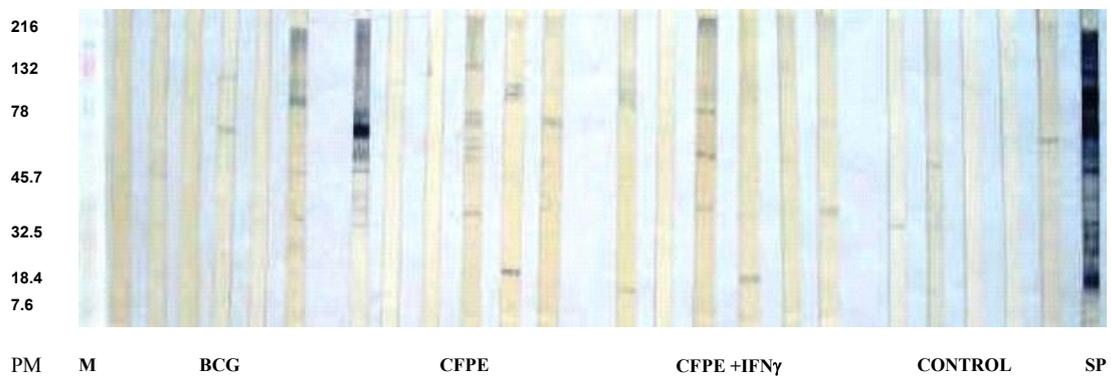


FIGURA 6 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 103, en los diferentes grupos vacunados y grupo control

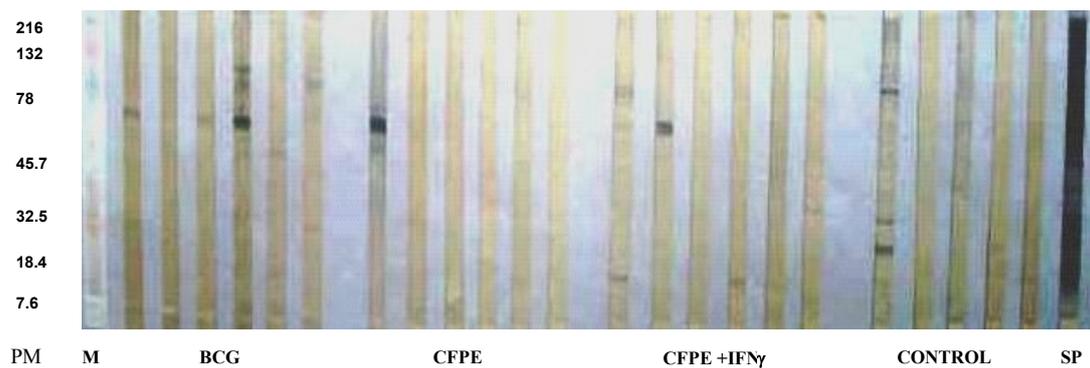


FIGURA 7 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 173, en los diferentes grupos vacunados y grupo control

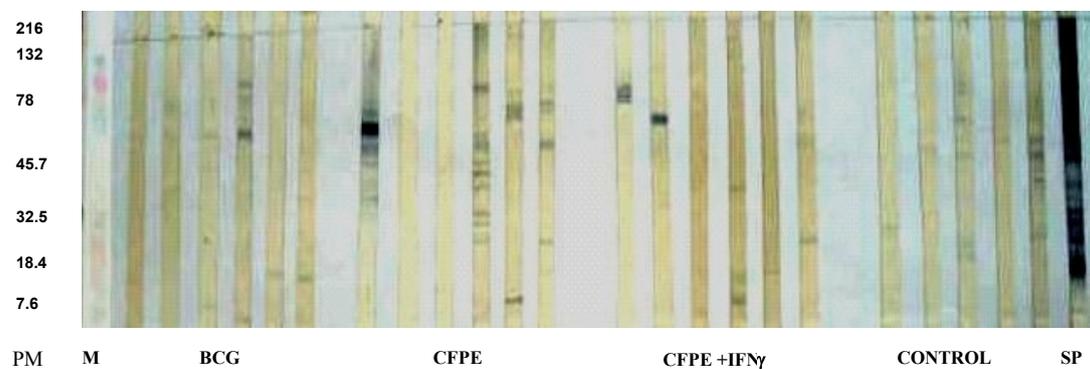


FIGURA 8 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 43 posdesafío, en los diferentes grupos vacunados y grupo control

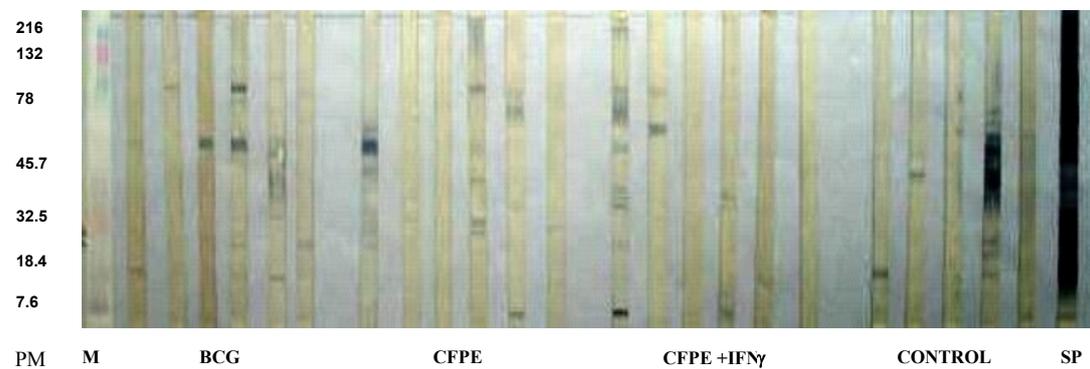


FIGURA 9 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* al día 72 posdesafío, en los diferentes grupos vacunados y grupo control

**CUADRO V.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
AL DÍA 0, ANTES DE LA VACUNACIÓN EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3			+			+			++			+				+	+						
	6										+		+											
	7													++				++						
	10		+					+			+	+++						+++			++	++	++	
	13		+					+			+	+									+			
	24			+				+			+	+				+	+	+					+	
CFPE	9			+						+	++	+++	+++		+									
	11							+			+	+												
	14																							
	19							+			+							+						
	20		+++															++	++		+			
	25							+					+	+										
CFPE + IFN	4										+		++				++							
	12										+	+++	+++	+				+		+		+	+	+
	16							+			+							+	+	+	+	+	+	+
	17		++								+	+	+						+	+				
	22																							
	23							+					+											
CONTROL	1																							
	2			+							+							+	+			+		
	5			+							+		+		+			+				+		
	8																			+				
	15																							
	21							+		+	++	+	+	+				+	+			+	+	+

La intensidad se considero: (+) = reconocimiento débil, (++) = reconocimiento moderado, (+++) = reconocimiento intenso.

**CUADRO VI.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
A LOS 61 DÍAS POSVACUNACIÓN EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3												+											
	6												+					+						
	7												++											
	10												++					+						
	13										+													
	24																							
CFPE	9						+		+	+	+	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	11																							
	14	+																					+	
	19										+	+												
	20			+								+	+					+++	+++					
	25												+											
CFPE + IFN	4			+														+	+	+				+
	12											+						+	+					
	16																							+
	17			+							+		+											
	22																							
	23																							
CONTROL	1			+				+		+							+							
	2											+												
	8											+												
	15												+											
	21							+		+	++	+	+	+				+	+			+	+	+

**CUADRO VII.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
A LOS 103 DÍAS POSVACUNACIÓN EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3																							
	6							+			+	+	+											
	7												+	+					+					
	10													+	+									
	13								+															
CFPE	24						+	+			+	+	+		+	+	+	+				+	+	
	9							+		+	++	+++	+++		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	11																		+					
	14																							
	19							++			+	+	+	++									+	
CFPE + IFN	20			++						+	+	+			++	++								+
	25							+		+			++	++										
	4		++							+								+	+	+				
	12																							
	16							++				++	++	+				++	+	+	+	+	+	++
CONTROL	17			++				+		+	+							+	+	+				
	22							+		+	+							+	+	+		+	+	
	23									+		+	+					+	+	+			+	+
CONTROL	1							+																
	2							+			+	+												
	8																		+					
	15																							
	21												+											

**CUADRO VIII.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
A LOS 173 DÍAS POSVACUNACIÓN EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3			+				+				+	++	++										
	6										+		+	+										
	7												++	++				+						
	10								+		+	+	++	++				++	++		++			
	13		+						+		+	+	+											
CFPE	24			+				+		+	+		+				+	+						
	9									+	+	++	+++	+++	++									
	11	+						+				+												
	14																							
	19										+								+					
CFPE + IFN	20			+												+	+							
	25									+							+	+						
	4			++							+	+		+				+		++				+
	12										+		++	++	++			+		+				
	16																							
CONTROL	17			++						+	+							+						
	22							+		+	+													
	23							+		+	+													
CONTROL	1			+				++	++	++	+	+	+					+		+	+	+	+	
	2																							
	8												+					+				+		
	15																							
	21											+	+											

**CUADRO IX.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
A LOS 43 DÍAS POSDESAFIO EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3			+									+											
	6												+		+		+							
	7			+				+			+		+											
	10	+											+		++		++				+			
	13			++				+			+													
CFPE	24			++				+		+					+									
	9									+	+	++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11																							
	14																							
	19		+	+				++	++	++	++	++		+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
CFPE + IFN	20		++							+		+	+	++	++	++	++	++						+
	25			+				++			++			++	++				+					
	4			+														+++	+++	+++				
	12			+			+				+		+++	+++				+	+	+				
	16																	+	+	+				
CONTROL	17	+	++	+							+												+	
	22			+																				
	23							+			+		+						+					
	1							+		+														
CONTROL	2										+													
	8							+		+	+			+					+					
	15												+											
	21			+				+			+	+	+	+					+					+

**CUADRO X.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis*
A LOS 72 DÍAS POSDESAFIO EN LOS DIFERENTES GRUPOS**

PM Antígeno Animal		6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216
BCG	3			++							+	+												
	6			+														++						
	7										+	++												
	10			+				+		+	+	++			++		++				++		+	+
	13			+				+		+	+	+	+	+					+					
CFPE	24			+				+		+	+		+											
	9							+		+	+	+++	++											
	11							+		+														
	14							+				+			+	+								
	19	+						++	++		++	+							++				+	+
CFPE + IFN	20		++							+				+	+			++					+	
	25			+						+			+					+	+					
	4	+	+++	+				+		++	++		+		++	++	++	++	++					++
	12							+					+++						++					
	16																							
CONTROL	17	+	++	++						+	++													
	22																							
	23																							
	1			++				+			+													
CONTROL	2			+							++	+							+				+	
	8																							
	15			+				+	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+							
	21							+			+													

CUADRO XI.- PRUEBA DE X² EN LOS GRUPOS VACUNADOS Y CONTROL PARA LOS ANTÍGENOS DEL CFPE DE *M. bovis*, ETAPAS PRE Y POSVACUNACIÓN

PM	DIA 0					DIA 61 POSVACUNACION					DIA 103 POSVACUNACION				
	N=6					BCG	CFPE	CFPE+HFN	CONTROL	X2	BCG	CFPE	CFPE+HFN	CONTROL	X2
6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0.372	0	0	0	0	1
10	2	1	1	0	0.494	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0.372
19	2	1	0	2	0.427	0	1	2	1	0.494	0	1	1	0	0.536
22	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
23	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
26	1	0	0	0	0.372	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0.372
32	3	3	2	1	0.582	0	1	0	2	0.242	3	3	3	2	0.918
35	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
38	1	1	0	1	0.767	0	1	0	0	0.372	0	2	1	0	0.242
45-47	3	3	4	3	0.918	1	2	1	1	0.860	2	3	3	1	0.582
50-55	3	3	2	1	0.582	0	4	1	3	0.058	2	2	3	1	0.682
60	2	2	4	2	0.561	4	1	1	2	0.212	4	3	2	1	0.33
65	1	0	1	1	0.767	0	1	0	0	0.372	1	2	1	0	0.494
70	1	1	0	1	0.767	0	1	0	0	0.372	1	2	0	0	0.242
72	1	0	0	0	0.372	0	1	0	0	0.372	0	1	0	0	0.372
75	3	2	3	0	0.212	0	2	0	1	0.242	1	2	2	0	0.427
78	3	1	2	3	0.582	2	2	2	1	0.895	2	2	5	1	0.104
80	0	0	2	4	0.187	0	1	2	0	0.242	0	1	4	0	0.012
85	0	1	1	1	0.767	0	1	1	0	0.536	0	1	3	0	0.066
110	2	0	0	0	0.088	0	1	0	0	0.372	0	1	1	0	0.536
132	2	0	2	3	0.280	0	2	0	0	0.088	1	2	2	0	0.427
200	1	0	2	1	0.494	0	1	0	0	0.372	1	1	1	0	0.676
216	0	0	2	1	0.242	0	1	2	1	0.494	0	2	2	0	0.187

Diferencia estadística significativa (P<0.1)

CUADRO XII.- PRUEBA DE X² EN LOS GRUPOS VACUNADOS Y CONTROL PARA LOS ANTÍGENOS DEL CFPE DE *M. bovis*, ETAPAS POSVACUNACIÓN Y POSDESAFÍO

PM	DIA 173 POSVACUNACION					DIA 43 POSDESAFIO					DIA 72 POSDESAFIO				
	BCG	CFPE	CFPE+HFN	CONTROL	X2	BCG	CFPE	CFPE+HFN	CONTROL	X2	BCG	CFPE	CFPE+HFN	CONTROL	X2
6	0	1	0	0	0.372	1	0	1	0	0.536	0	1	2	0	0.242
10	1	0	0	0	0.372	0	2	1	0	0.242	0	1	2	0	0.242
19	2	1	2	1	0.828	4	2	4	1	0.210	5	1	2	3	0.118
22	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
23	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
26	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0.372	0	0	0	0	1
32	4	1	2	1	0.212	3	2	1	3	0.582	3	4	2	3	0.721
35	0	0	0	1	0.372	0	1	0	0	0.372	0	1	0	1	0.536
38	0	2	0	1	0.242	1	3	0	2	0.217	3	4	2	1	0.330
45-47	4	2	5	1	0.083	3	3	3	3	1	5	2	2	4	0.210
50-55	1	2	2	2	0.895	0	3	0	1	0.066	4	3	0	2	0.101
60	5	1	1	3	0.056	4	2	2	2	0.561	2	2	2	1	0.895
65	5	1	2	0	0.015	0	4	1	2	0.070	1		0	1	0.767
70	0	2	1	0	0.242	3	4	0	0	0.016	1	2	1	1	0.860
72	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0.016	0	1	1	1	0.767
75	2	1	0	0	0.242	2	3	0	0	0.078	2	0	1	1	0.494
78	3	1	3	2	0.582	0	4	4	2	0.056	1	3	2	1	0.528
80	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0.242	0	1	0	0	0.372
85	1	0	2	1	0.494	1	2	2	0	0.427	1	0	0	0	0.372
110	0	0	0	1	0.372	0	2	0	0	0.088	0	0	0	0	1
132	0	0	0	2	0.088	0	2	1	0	0.242	1	1	0	1	0.676
200	0	0	0	1	0.372	0	3	0	0	0.016	0	2	0	0	0.088
216	0	0	1	1	0.536	0	2	0	1	0.242	1	1	1	0	0.767

Diferencia estadística significativa (P<0.1)

CUADRO XIII.- PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO VACUNADO CON BCG, EN LOS DIFERENTES MUESTREOS

Antígeno PM	Día 0 %	Día 61 Posvac %	Día 103 Posvac %	Día 173 Posvac %	Día 43 Posdes %	Día 72 Posdes %
6	0	0	0	0	16	0
10	33	0	0	16	16	0
19	33	0	0	33	50	83
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
26	16	0	16	0	0	0
32	50	0	50	66	50	50
35	0	0	0	0	0	0
38	16	0	0	0	16	50
45-47	50	16	33	66	50	83
50-55	50	0	33	16	0	66
60	33	66	66	66	33	33
65	0	0	16	66	0	16
70	16	0	16	0	50	16
72	0	0	0	0	0	0
75	33	0	16	33	33	33
78	16	33	33	50	0	16
80	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	16	16	16
90	0	0	0	0	0	0
110	33	0	0	0	0	0
132	33	0	16	0	0	16
200	16	0	16	0	0	0
216	0	0	0	0	0	16

El porcentaje se calculo considerando el número de animales reactivos entre el total de cada grupo.

CUADRO XIV.- PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO VACUNADO CON CFPE, EN LOS DIFERENTES MUESTREOS

Antígeno PM	Día 0 %	Día 61 Posvac %	Día 103 Posvac %	Día 173 Posvac %	Día 43 Posdes %	Día 72 Posdes %
6	0	0	0	16	0	16
10	16	0	0	0	33	16
19	16	16	16	16	33	16
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
32	50	16	50	16	33	66
35	0	0	0	0	16	16
38	16	16	33	33	50	66
45-47	50	33	50	33	50	33
50-55	50	66	33	33	50	33
60	33	16	50	16	33	33
65	0	16	33	16	66	16
70	16	16	33	33	66	16
72	0	0	0	0	0	16
75	16	33	33	16	16	0
78	33	33	33	16	66	33
80	0	0	0	0	0	16
85	16	16	16	0	33	0
90	0	0	0	0	0	0
110	0	16	16	0	33	0
132	0	33	33	0	33	16
200	0	16	16	0	50	33
216	0	0	33	0	0	0

CUADRO XV.- PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO VACUNADO CON CFPE+IFN, EN LOS DIFERENTES MUESTREOS

Antígeno PM	Día 0 %	Día 61 Posvac %	Día 103 Posvac %	Día 173 Posvac %	Día 43 Posdes %	Día 72 Posdes %
6	0	0	0	0	16	33
10	16	0	16	0	16	33
19	0	33	16	33	66	33
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
32	33	0	50	33	33	33
35	0	0	0	0	0	0
38	0	0	16	0	0	33
45-47	66	16	50	83	50	16
50-55	33	16	50	33	0	16
60	66	16	33	16	33	33
65	16	0	16	33	16	0
70	0	0	0	16	0	16
72	0	0	0	0	0	0
75	50	0	33	0	0	16
78	33	33	83	50	66	33
80	33	33	66	16	16	0
85	0	16	50	33	16	0
90	16	0	16	0	16	0
110	0	0	16	0	0	0
132	33	0	33	0	16	0
200	33	0	16	0	0	0
216	33	16	33	16	0	16

CUADRO XVI.- PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO CONTROL, EN LOS DIFERENTES MUESTREOS

Antígeno PM	Día 0 %	Día 61 Posvac %	Día 103 Posvac %	Día 173 Posvac %	Día 43 Posdes %	Día 72 Posdes %
6	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
19	40	20	0	20	20	60
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
32	20	40	40	20	60	60
35	0	0	0	20	0	0
38	20	0	0	20	40	20
45-47	60	20	20	20	60	60
50-55	20	60	20	40	20	60
60	40	40	20	60	40	20
65	20	0	0	0	40	20
70	20	0	0	0	0	20
72	0	0	0	0	0	20
75	0	20	0	0	0	20
78	60	20	20	40	40	20
80	40	0	0	0	20	0
85	20	0	0	20	20	0
110	0	0	0	40	20	0
132	60	0	0	40	20	20
200	20	0	0	40	20	0
216	20	20	0	20	20	0

Análisis de Inmunotransferencias de bovinos reactivos a la prueba de tuberculina.

La selección de este grupo de animales se efectuó de acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes pruebas diagnósticas realizadas; todos fueron positivos a la prueba doble comparativa, ELISA e IFN- γ , de acuerdo a los criterios establecidos para cada una de ellas, (**Cuadro XVII**). En el análisis de inmunotransferencia se observó una respuesta intensa hacia los antígenos del CFPE para todos los animales del grupo, que se caracterizó por un número mayor de antígenos reconocidos, con un porcentaje alto de reactividad en relación con la respuesta que se registró para el grupo de animales negativos (no reactivos, negativos a la prueba de ELISA e IFN- γ). La respuesta en el grupo reactor fue mayor hacia los antígenos de 50-55, 32, 45-47 y 38 kDa, con una reactividad que abarca del 80 al 100% (**Cuadro XVIII, Figura 10**).

Mientras que en el grupo negativo el porcentaje de reactividad que se observó para estos antígenos fue del 12 al 50%; dentro de éstos, el antígeno de 45-47 kDa fue el que tuvo mayor porcentaje de reactividad en el grupo negativo, seguido de los antígenos de 60, 32 y 50-55 kDa (**Cuadro XIX**). Resalta dentro del grupo reactor el reconocimiento hacia las proteínas de 35, 23, 22 y 6 kDa, mismas que no fueron reconocidas por los sueros de los animales negativos. De igual modo, sobresale la respuesta en el grupo reactor hacia las proteínas de alto peso molecular (216, 200 y 132 kDa) mas que la que se presentó en el grupo de los animales negativos (**Gráfica 9, Gráfica 10 y Cuadro XX**).

De acuerdo al análisis estadístico la reactividad a las proteínas de 6, 10, 19, 22, 23, 35, 38, 70, 200 y 216 kDa fue significativa ($P < 0.1$) para el grupo de animales positivos a las diferentes pruebas diagnósticas. En tanto que en animales negativos la reactividad a las proteínas de 32, 45-47, 50-55, 65, 75, 78 y 132 kDa resultó ser significativa ($P < 0.1$), (**Cuadro XXI**).

**CUADRO XVII.- RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE TUBERCULINA, ELISA E IFN- γ
EN EL GRUPO REACTOR**

No. animal	INF- γ PPD bovis (DO ₄₅₀)	INF- γ control (DO ₄₅₀)	DO _{PPD bovis} - DO _{control}	ELISA (CFPE <i>M.bovis</i>)	Tuberculina DC
22	0.345	0.065	0.28	0.486	positivo
28	1.224	0.056	1.168	0.407	positivo
75	0.308	0.056	0.252	0.516	positivo
81	2.218	0.081	2.137	0.385	positivo
D	-	-	-	0.516	positivo
3	0.68	0.082	0.598	0.706	positivo
27	-	-	-	0.979	positivo
L2/15 15	-	-	-	0.754	positivo
173	0.237	0.085	0.152	0.742	positivo
144	0.5135	0.09	0.4235	1.2295	positivo

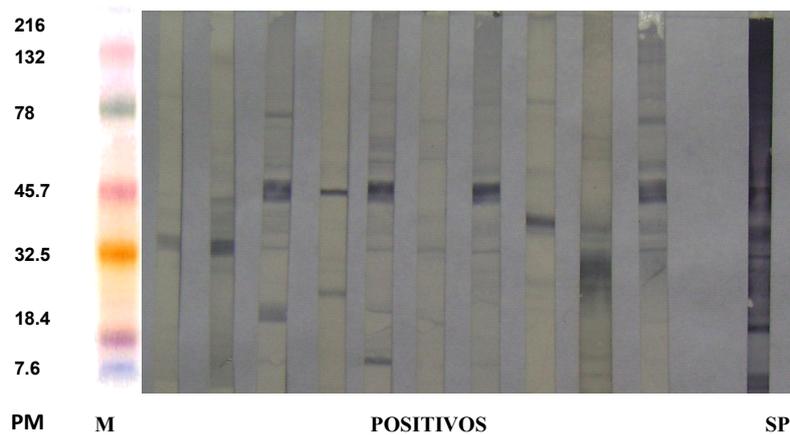


FIGURA 10 .- Análisis de reconocimiento antigénico al CFPE de *M. bovis* del grupo positivo

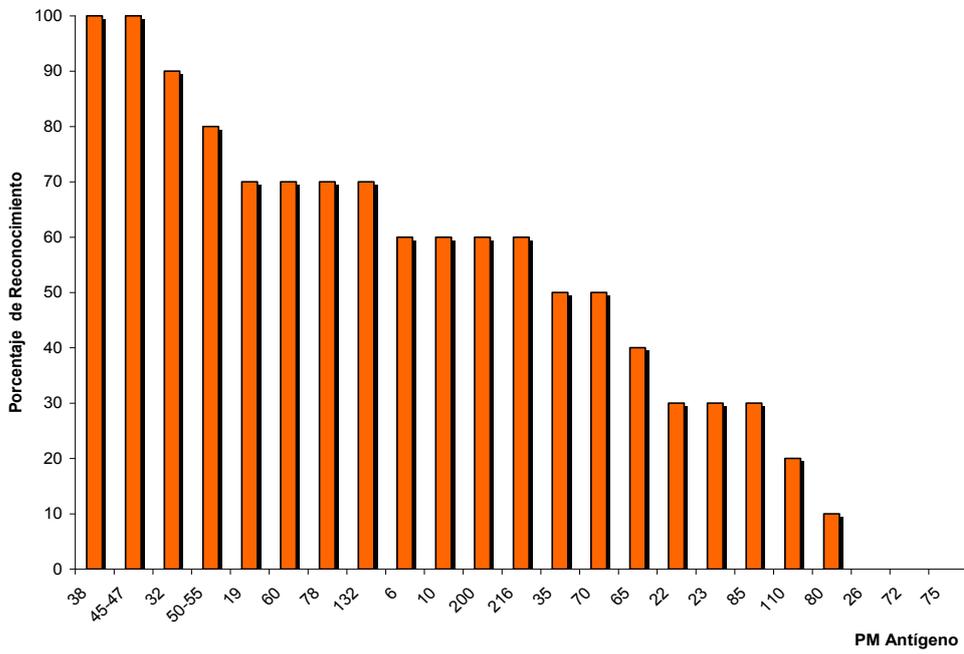
**CUADRO XVIII.-PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL
CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO REACTOR (positivo)**

PM Antígeno	%
6	60
10	60
19	70
22	30
23	30
26	0
32	90
35	50
38	100
45-47	100
50-55	80
60	70
65	40
70	50
72	0
75	0
78	70
80	10
85	30
110	20
132	70
200	60
216	60

**CUADRO XIX.-PORCENTAJE DE RECONOCIMIENTO AL
CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO NEGATIVO**

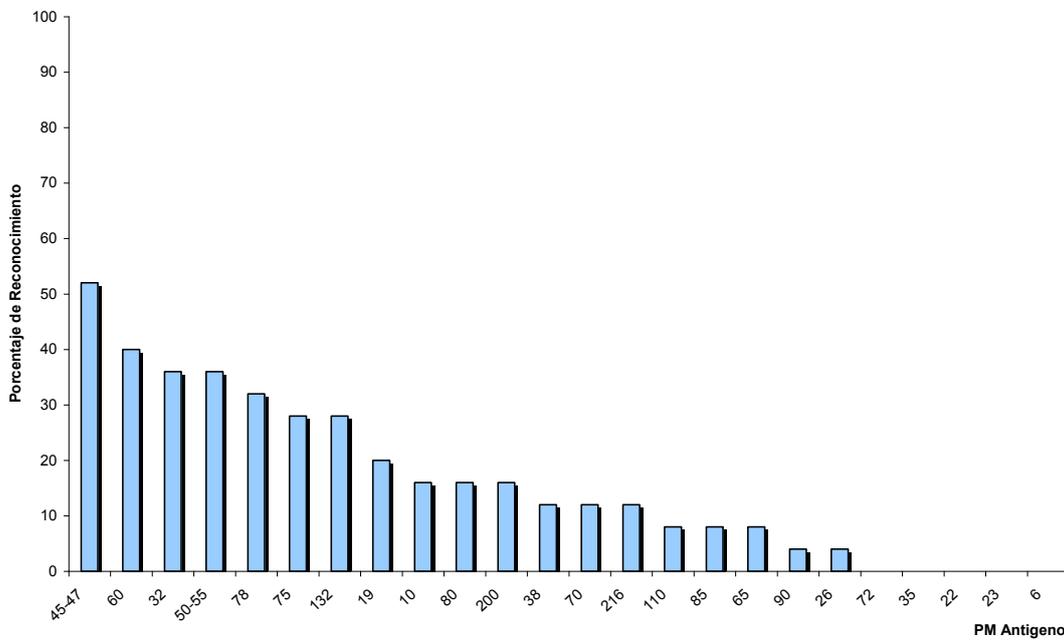
PM Antígeno	%
6	0
10	16
19	20
22	0
23	0
26	4
32	36
35	0
38	12
45-47	52
50-55	36
60	40
65	8
70	12
72	0
75	28
78	32
80	16
85	8
90	4
110	8
132	28
200	16
216	12

BOVINOS REACTORES



Gráfica 9.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo de bovinos reactivos.

BOVINOS NEGATIVOS



Gráfica 10.- Análisis del porcentaje de reconocimiento al CFPE de *M. bovis* en el grupo de bovinos negativos a la prueba de tuberculina.

CUADRO XX.- INTENSIDAD DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO AL CFPE DE *M. bovis* EN EL GRUPO REACTOR.

PM Antígeno	6	10	19	22	23	26	32	35	38	45-47	50-55	60	65	70	72	75	78	80	85	110	132	200	216		
Animal																									
POSITIVOS	173	+	+	+	+				++	+							+								
	144	+		+			+++	+++	++	+	+											+			
	L1 D		+	+	++	++	++	++	+++	+++	+			+				+				+	+	+	+
	L1 22						++	+	++	+															
	L1 28		++	+			+		++	+++	+++	+	+	+				+		+		+	+	+	+
	L1 75 B	+	+	+				+	+	+	+	+						+				+	+	+	+
	L1 81	+	+	+			+	+	+	+++	+++	+	+	+				++		+		+	+	+	+
	L2 3			+	+	+			+++	+								++					+	+	+
	L2 15	+	+	+	++	++		++	++		+		+	+	+										
	L2 27	+		+				+	+	++	+++	+++	+	+	+				++	++	++	++	++	++	++

CUADRO XXI.- PRUEBA DE χ^2 PARA LOS GRUPOS REACTORES Y NO REACTORES A LA TUBERCULINA A LOS ANTÍGENOS DEL CFPE DE *M. bovis*

PM	N=34		χ^2
	REACTORES (+)	NO REACTORES (-)	
6	6	0	0.0001
10	6	4	0.0120
19	9	5	0.0001
22	4	0	0.0010
23	3	0	0.0050
26	0	1	0.5120
32	8	9	0.0240
35	7	0	0.0001
38	9	3	0.0001
45-47	10	13	0.0090
50-55	8	9	0.0240
60	7	10	0.1320
65	4	3	0.0710
70	5	3	0.0190
72	0	1	0.5120
75	0	8	0.0370
78	7	9	0.0840
80	1	4	0.6170
85	3	3	0.2230
110	2	2	0.3360
132	7	7	0.0270
200	6	4	0.0120
216	6	3	0.0040

Diferencia estadística significativa ($P < 0.1$)

8. DISCUSION.

La vacunación contra la tuberculosis bovina se ha considerado en los últimos años como la mejor estrategia de control de la enfermedad sobre todo en regiones de alta prevalencia. Debido a ello se han evaluado diferentes tipos de vacunas en condiciones controladas, los resultados en muchos de los casos son satisfactorios y han arrojado información relevante, relacionada principalmente con la propia naturaleza de la vacuna empleada, dosis, vía de inoculación y la edad apropiada para que los animales vacunados desarrollen una inmunidad específica y duradera (100, 102, 103); pero pocos estudios existen relacionados con la identificación de antígenos involucrados en el desarrollo de la inmunidad protectora en animales vacunados contra la tuberculosis bovina; debido a ello el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la respuesta inmune humoral y celular en diferentes grupos de vaquillas vacunadas contra la enfermedad; y determinar su perfil de reconocimiento antigénico hacia las proteínas presentes en el extracto proteico del filtrado de cultivo (CFPE) de *M. bovis*. Para el análisis de reconocimiento se consideraron muestreos al inicio de la vacunación, posteriores a la vacunación y al desafío. Además con fines comparativos se incluyó en el análisis un grupo de vacas positivas a diferentes pruebas diagnósticas a la enfermedad.

Como bien se ha documentado, la inmunidad protectora contra la tuberculosis es esencialmente de tipo celular, por ende es deseable que las vacunas contra la enfermedad sean capaces de estimular y mantener ese tipo de inmunidad; en la cual participan de manera relevante los linfocitos Th1 específicos, productores de TNF- β , IFN- γ e IL-2. El IFN- γ liberado por estas células actúa de manera paracrina sobre los macrófagos aumentando sus propiedades fagocíticas y bactericidas hacia las micobacterias intracelulares, logrando su eliminación y con ello el control del progreso de la enfermedad (45, 47). Por tanto, en la evaluación de vacunas contra la tuberculosis la cuantificación y monitoreo de la producción de esta citocina por las células T específicas, es un parámetro relevante que nos permite determinar el establecimiento de la inmunidad protectora. De acuerdo a este axioma, el seguimiento de la respuesta inmune en los diferentes grupos vacunados y control mostró una mayor producción de IFN- γ en los cultivos del grupo vacunado con BCG estimulados con el PPD bovino de la tercera hasta la catorce semana posvacunación más que para los otros grupos

vacunados y control, indicando el desarrollo y establecimiento de una respuesta celular en este grupo.

Para determinar la especificidad de la respuesta también se evaluó la producción de IFN- γ en cultivos estimulados con PPD aviar, similar a lo que se hace cuando se aplica la prueba de la tuberculina doble comparativa; con ello fue posible identificar una respuesta no deseable de la semana catorce a la veinte; periodo en el cual se observó una alta producción de la citocina en presencia de los antígenos del PPD aviar, siendo ésta superior a la que se observó en los cultivos estimulados con el PPD bovino durante ese periodo para los diferentes grupos tratados incluyendo el control. Encontrando, no obstante que la respuesta al PPD aviar fue menor en el grupo vacunado con BCG. La elevada producción de IFN- γ observada en los cultivos estimulados con PPD aviar pudo ser consecuencia de la presencia de *Corynebacterium spp* presente en fosas nasales de varios de los animales de los diferentes grupos, cuyo desarrollo se favoreció indirectamente con el tipo de alimento que se les proporcionó durante ese periodo (esto esta siendo tema de investigación para otra tesis).

El género *Corynebacterium* exhibe una estrecha relación taxonómica con el género *Mycobacterium*, por lo cual se considera que el incremento en la producción del IFN- γ pudo ser efecto de la presencia de estos microorganismos en las fosas nasales de los animales. Luego del tratamiento con antibióticos y del cambio de dieta fue posible eliminar la presencia de esta bacteria de los animales.

Consecutivo al desafío con la cepa de campo de *M. bovis* la producción de IFN- γ fue altamente significativa en los cultivos estimulados con el PPD bovino para todos los grupos en los diferentes muestreos realizados posdesafío, más que para los estimulados con el PPD aviar. La mayor producción de IFN- γ en esta fase de desafío se observó en el grupo vacunado con BCG, seguido del grupo control y de los demás grupos tratados.

Por otro lado, los niveles mas altos de anticuerpos se observaron en el grupo vacunado con el CFPE + IFN- γ durante las primeras once semanas posvacunación, mas que para los otros grupos tratados y control. Considerando la baja producción de IFN- γ que exhibió este grupo durante las primeras semanas posvacunación, mismas en las cuales los niveles de anticuerpos eran elevados, se deduce que la aplicación exógena de IFN- γ

reprimió la respuesta celular y favoreció la respuesta humoral hacia los antígenos del CFPE. Resultados similares de modulación negativa en la respuesta inmune observaron otros investigadores al emplear una combinación de CFPE e IL-2 cuando inmunizaron a un grupo de becerros, observándose con este tratamiento una baja respuesta protectora al desafío (123)

En la semana 14 posvacunación, los niveles de anticuerpos de todos los grupos bajaron considerablemente, hecho que se relacionó en tiempo con los niveles altos de producción de IFN- γ observados para los diferentes grupos. El descenso en los niveles de anticuerpos indica indirectamente la participación de éstos en los mecanismos de bloqueo o neutralización del establecimiento de *Corynebacterium spp* en las vías respiratorias de los animales, dado la reactividad cruzada que existe entre los géneros *Mycobacterium* y *Corynebacterium*.

Posterior al desafío los niveles de anticuerpos de todos los grupos aumentaron gradualmente pero nunca fueron superiores a los que se registraron durante el periodo posvacunación para los grupos tratados; contrario a lo que se observó para estos grupos, en el grupo control los niveles de anticuerpos fueron superiores tanto con el CFPE de *M. bovis* como con el CFPE de *M. avium*, siendo no obstante mas altos para el primero. Con respecto al análisis de inmunotransferencias, pudo observarse que al inicio de los tratamientos los animales de los diferentes grupos, pese a que resultaron negativos a las diferentes pruebas diagnósticas empleadas para su selección, mostraron cierto grado de reactividad a las proteínas del CFPE de *M. bovis*, dentro de éstas las más fuertemente reconocidas fueron las proteínas de 50-55, 60, 75 y 78 kDa; otras reconocidas con menor intensidad fueron las de 10, 19, 32 (complejo 85), 38 P, 45-47 (Apa), 65, 70, 80, 85, 110, 132, 200, 216; las menos reconocidas fueron las proteínas de 26 y 72 kDa, y en las que no hubo reconocimiento fueron las proteínas 6, 22, 23 y 35 kDa.

Luego de la vacunación los resultados de reactividad mostraron en general diferencias tanto en el número de antígenos reconocidos como en intensidad de reconocimiento o reactividad en función del tiempo en los grupos tratados y control, aún entre animales pertenecientes al mismo grupo. En relación al grupo vacunado con BCG se observó baja reactividad a las proteínas del CFPE a los dos meses posvacunación, la respuesta preferentemente estuvo dirigida a las proteínas de 19, 60 y 78 kDa, no obstante en los

posteriores muestreos evaluados posvacunación el porcentaje de reactividad fue mayor a los antígenos Apa, al complejo 85 y a las proteínas de 19, 60, 65, 75 y 78 kDa; sin observar reactividad en la etapa posvacunación a las proteínas de 6 kDa (ESAT-6) y de 22-23 kDa (MPB70), lo cual era de esperar considerando la ausencia de los genes que codifican a las proteínas MPB70 y ESAT-6 en la vacuna (124, 125, 126). Al desafío la mayoría de los animales del grupo mostró reactividad a las proteínas de 19 kDa, a los complejos Apa, 50-55 y 85, y en menor porcentaje a las proteínas de 38, 60, 65, 70, 75, sin observar respuesta a los antígenos ESAT-6, MPB70 y a las proteínas de 10, 26, 35, 72, 80, 90 y 200 kDa.

En cuanto al grupo vacunado con el CFPE se observó un mayor número de antígenos reconocidos por los sueros de los animales en los diferentes muestreos posvacunación, sin embargo el porcentaje de reactividad fue moderado para Apa, el complejo 50-55, el complejo 85, para las proteínas de 38, 60, 65, 70, 78, 132 y 216 kDa. Al desafío la respuesta se incrementó para los antígenos del complejo 85 y 38, pero fue relativamente baja para los antígenos ESAT-6, 10, 19, 35, Apa, 50-55, 60, 65, 70, 72, 78, 80, 132 y 200 kDa. Ninguno de los animales exhibió respuesta durante el periodo posvacunal y posdesafío a la MPB70, ni a las proteínas de 26, 35 y 90 kDa.

Para el grupo vacunado con el CFPE + IFN- γ la reactividad aunque moderada estuvo dirigida a un mayor número de proteínas en contraste con los demás grupos vacunados y control, situación que puede relacionarse con los niveles de anticuerpos mas altos registrado para el grupo. Las proteínas reconocidas aunque en intensidad y porcentaje variable, fueron de: 19, 32, 45-47, 50, 55, 60, 75, 78, 80, 85, 132 y 216 kDa. Luego del desafío se observó reactividad para las proteínas de 6, 10, 19, 32, 38, 45-47, 60, 78 y 216 kDa. En este grupo tampoco fue evidente una respuesta a la MPB70, ni a las proteínas de 26 kDa y 35 kDa. Es importante señalar la reactividad de los animales de este grupo a los antígenos ESAT-6 y CFPE 10, considerados relevantes para la identificación de animales infectados. Pese a que se ha señalado éstos antígenos están presentes en el CFPE de *M. bovis* de la cepa AN5 empleado para el análisis, no se observó respuesta importante para esos antígenos en la etapa posvacunación para los grupos vacunados con el CFPE.

Para el grupo control, la respuesta en general fue débil para la mayoría de los animales, no obstante, la reactividad estuvo dirigida a los antígenos de: 19, 32, 35, 38 50-55 y 60 kDa. Al desafío los antígenos mayormente reconocidos fueron los de 32, 35, 38, 45-47, 60, 65 y 78 kDa. 32, 45-47. Pero, en ninguno fue evidente una respuesta a los antígenos de bajo peso molecular.

De acuerdo al análisis estadístico la mayor reactividad significativa se observó a los 103 y 173 días posvacunación dirigida esencialmente a las proteínas del complejo 45-47, 60, 65, 78, 80 y 85 kDa para los grupos vacunados.

En la etapa posdesafío la mayor reactividad considerada significativa se observó a los 43 días principalmente en el grupo vacunado con el CFPE, dirigida a las proteínas del complejo 50-55, 65, 70, 72, 75, 78, 110 y 200 kDa. A los 72 días posdesafío solo fue significativa para la proteína de 200 kDa para este grupo.

Sobresale el hecho de que los animales de los diferentes grupos vacunados y control no exista reactividad o ésta sea prácticamente baja hacia los antígenos de 26, 23, 10 y 6 kDa durante las diferentes fases experimentales, incluyendo el periodo posdesafío.

Como se indicó anteriormente, los resultados mostraron variaciones para los diferentes grupos en el reconocimiento antigénico, tanto en intensidad como en porcentaje de animales que reconocen los antígenos del CFPE en los diferentes tiempos de muestreo, situación que fue evidente tanto el periodo posvacunación como posdesafío.

Sobresale el hecho de que los animales de los diferentes grupos vacunados y control no exista reactividad o ésta sea prácticamente baja hacia los antígenos de 26, 23, 10 y 6 kDa durante las diferentes fases experimentales, incluyendo el periodo posdesafío.

El análisis de reconocimiento practicado al grupo de animales reactivos a la prueba de la tuberculina, y positivos a la prueba de ELISA y BOVIGAM mostró una respuesta intensa hacia los antígenos del CFPE para todos los animales del grupo, que se caracterizó por un número mayor de antígenos reconocidos en relación con la respuesta que se registró para el grupo de animales negativos (no reactivos, negativos a la prueba de ELISA e IFN- γ). La respuesta en el grupo reactor fue mayor hacia los antígenos de

32, 38, 45-47 y 50-55 kDa, con una reactividad que va del 80 al 100%. Mientras que en el grupo negativo el porcentaje que se observó para estos antígenos fue del 12 al 50%. De igual modo, sobresale la respuesta en el grupo reactor hacia las proteínas de alto peso molecular (216, 200 y 132 kDa), reactividad que no fue evidente en el grupo de los animales negativos. Lo que concuerda con lo observado por otros investigadores (127, 128, 129).

De acuerdo al análisis estadístico la reactividad a las proteínas de 6, 10, 19, 22, 23, 35, 38, 70, 200 y 216 kDa fue significativa para el grupo de animales positivos a las diferentes pruebas diagnósticas. En tanto que en animales negativos la reactividad a las proteínas de 32, 45-47, 50-55, 65, 75, 78 y 132 kDa resultó ser significativa. El reconocimiento a estos últimos antígenos por el grupo de animales negativos señala su baja utilidad para fines diagnósticos, pese a que un porcentaje importante de animales reactivos y de animales infectados experimentalmente los reconocieron. Lo cual sugiere que la respuesta a éstos antígenos puede ser consecuencia de la sensibilización con antígenos comunes a micobacterias o bacterias relacionadas.

Resalta dentro del grupo reactor el fuerte reconocimiento hacia las proteínas de 35, 23, 22, 10 y 6 kD; mismas que al igual que las proteínas de alto peso molecular no fueron reconocidas por los sueros de los animales negativos, por tanto estas proteínas pueden considerarse de utilidad diagnóstica. Actualmente las proteínas ESAT-6 y CFP10 se emplean para ese propósito en tuberculosis humana, pero en el área de la tuberculosis bovina su empleo se ha limitado a estudios de investigación, mostrando no obstante una elevada correlación con el desarrollo de la enfermedad (130, 131). En ese sentido en los grupos de animales vacunados y control después del desafío el reconocimiento a los antígenos ESAT-6 y CFP10 fue relativamente bajo; de igual modo, en ninguno de los grupos mencionados incluyendo el control fue evidente una respuesta a las proteínas de 22 y 23 kDa (MPB70 y MPB64).

La falta de reconocimiento en estos grupos de animales a las proteínas referidas es posible que se haya debido al periodo relativamente temprano de evolución de la enfermedad en que se evaluaron, misma que fue cuando se sacrificaron; lo cual fue palpable a la inspección donde solo fue posible observar lesiones en linfonodos regionales de cabeza y cuello en los animales vacunados, siendo no obstante mas

extensas en el grupo control (esto se evaluó como tema de investigación de otra tesis). Además, al momento del sacrificio en los diferentes grupos tratados y control fue evidente una respuesta celular más que humoral, por tanto es probable que la respuesta a esos antígenos en esa etapa de la infección haya sido más de tipo celular que humoral.

Se ha documentado que tanto en tuberculosis bovina como en la del humano, la mayoría de las infecciones pueden controlarse mediante el desarrollo y establecimiento de una inmunidad celular protectora, sin que la respuesta humoral, normalmente baja en la mayoría de los casos juegue un papel significativo. En estos casos, la infección normalmente puede diagnosticarse empleando pruebas que evalúan la inmunidad celular. Sin embargo, en animales que presentan etapas avanzadas de la enfermedad la respuesta celular puede encontrarse disminuida o estar prácticamente ausente, mientras que, la respuesta humoral se incrementa significativamente (132).

Es así, que en el diagnóstico de la enfermedad es necesario considerar tanto una prueba serológica sensible y específica, como una prueba que permita evaluar la inmunidad celular apropiadamente, con el fin de conseguir un mayor grado de exactitud en el diagnóstico de la enfermedad. Varios tipos de pruebas serológicas se han desarrollado, algunas de ellas utilizando antígenos crudos, pero tienen el inconveniente de ser poco sensibles y específicas (133, 134); lo cual han generado que la investigación en el campo se centre en la búsqueda y selección de antígenos inmunológicamente importantes. Uno de los objetivos particulares del trabajo fue determinar el reconocimiento antigénico que exhiben los sueros de animales PPD positivos al CFPE de *M. bovis*, y compararlo con el que muestra los sueros de animales PPD negativos. En términos generales, el análisis de inmunotransferencia muestra claras diferencias en el perfil de reconocimiento antigénico hacia las proteínas del CFPE que exhiben ambos grupos de animales.

Estas observaciones señalan las bajas posibilidades que existen para identificar un animal tuberculoso empleando uno o un número reducido de antígenos purificados, en cualquier tipo de prueba serológica, dado que la sensibilidad se reduce considerablemente; situación que fue demostrada por Fifi y col (67) quienes evaluaron la reactividad serológica a varios antígenos purificados, incluyendo las proteínas MPB70 y MPB64 conocidas como altamente específicas para *M. bovis*, en sueros de

animales infectados, las sensibilidades que se determinaron para estos antígenos fue del 60 y 50 %. En nuestro análisis efectuado el reconocimiento determinado para esos antígenos en el grupo animales reactivos fue del 30%. Fife y col (135), consideran además, que las sensibilidades de las pruebas serológicas se pueden incrementar seleccionando epítomos específicos de los antígenos purificados y eliminando aquellos epítomos de reacción cruzada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la respuesta hacia los determinantes antigénicos está bajo control genético y por lo tanto varía ampliamente entre las poblaciones. El desarrollo de una prueba serológica con estas características por el momento sería poco probable y demasiado costosa para aplicarse a nivel de campo; mientras tanto hay que seguir optando por desarrollar una prueba serológica que incluya varios antígenos purificados específicos, que junto con una prueba adecuada para evaluar la inmunidad celular permita identificar los bovinos tuberculosos. La prueba intradérmica de la tuberculina, es la más ampliamente utilizada por el momento para este propósito, pero tiene la limitante de carecer de sensibilidad y especificidad (92, 96, 108).

Considerando los inconvenientes de la prueba intradérmica, Rothel y col (136) desarrollaron una prueba de ensayo celular *in vitro*, que se basa en la evaluación de IFN- γ , producido en cultivos de sangre completa de animales infectados, estimulados con PPD bovino; la prueba se ha aplicado en varios ensayos a nivel de campo y muestra ser más sensible y específica que la prueba de la tuberculina (94, 95). Sin embargo, se considera que la especificidad se puede incrementar si se utilizan antígenos purificados en lugar del PPD.

Una evaluación de la cinética de respuesta inmune celular y humoral hacia diferentes antígenos purificados de *M. bovis* en bovinos infectados experimentalmente mostró que la respuesta hacia antígenos individuales varía en magnitud e inicio entre animales infectados, debido a diferencias genéticas entre ellos, lo que se refleja en la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad. El estudio también muestra que la respuesta celular hacia un antígeno en particular cambia durante el curso de la infección y que el cambio para algunos de ellos es radical, desde observarse en algún momento una fuerte respuesta hasta poco después ser casi indetectable, lo que provoca que el perfil de reconocimiento antigénico sea variable aún para un mismo animal durante el progreso de la enfermedad (137).

Estas observaciones apoyan nuestros resultados y confirman la necesidad de realizar mayor investigación enfocada principalmente en determinar la dinámica de la respuesta inmune hacia los antígenos micobacterianos en las diferentes etapas de la infección, con la finalidad de discernir cuales son los mecanismos que permiten modificar la cinética de reconocimiento antigénico y que modulan la interacción de las células inmunes con el microorganismo que pueden conducir a la eliminación propia del microorganismo como a las formas graves de la enfermedad que conducen al estado de anérgia; sobre este en particular es un área escasamente explorada en tuberculosis bovina, a la cual se le debe poner mayor atención, debido entre otras causas a la dificultad para identificar los animales anérgicos, empleando los métodos de diagnóstico convencionales y al peligro potencial que representan como fuente diseminadora de la enfermedad (138).

Los futuros estudios, deben también ser extensamente aprovechables con el fin de obtener la mayor información posible de los eventos que acontecen, no solo en el sitio de infección, sino también en su periferia, debido a que mucha de la información que se tiene se ha generado por los trabajos de investigación en el área de tuberculosis humana. Tampoco hay que dejar de lado la modulación que pueden ejercer los componentes micobacterianos sobre la capacidad de los leucocitos y las células de los tejidos para producir mediadores seleccionados que le permitan evadir los mecanismos protectivos desarrollados por el hospedero.

Por otro lado, similar al desarrollo de pruebas diagnósticas específicas y sensibles, para las estrategias del desarrollo de mejores y nuevas vacunas hacia la tuberculosis bovina se parte de identificar aquellos antígenos capaces de estimular y activar linfocitos T con un perfil de secreción de citocinas tipo Th1. Estudios de vacunación en bovinos empleando la vacuna BCG de *M. bovis* muestran el desarrollo de éste tipo de inmunidad sobre todo cuando los animales se vacunan a dosis bajas, lo cual se confirma por el aumento significativo de las citocinas IL-2 e IFN- γ , mientras que dosis altas de vacuna entre 10^6 - 10^8 UFC favorecen el desarrollo de un respuesta Th2 definida por una mayor producción de IL-4 e IL-10 con un aumento importante en los niveles de anticuerpos (139, 140), respuesta que no confiere resistencia contra los patógenos intracelulares. En el presente estudio la respuesta del grupo vacunado con BCG mostró

una producción significativa en la producción de IFN- γ , con niveles bajos de anticuerpos; respuesta que al desafío mostró ser protectora. En cuanto al grupo vacunado con CFPE, no fue evidente una producción significativa de IFN- γ y los niveles de anticuerpos fueron bajos equiparables a los del grupo vacunado con BCG antes del desafío; después de éste los animales desarrollaron lesiones más extensas que el grupo vacunado con BCG, pero menos extensas que aquel vacunado con CFPE + IFN- γ . La respuesta en este grupo antes del desafío se caracterizó por una prácticamente nula producción de IFN- γ en las primeras semanas posvacunación con una significativa producción de anticuerpos. Por tanto la mejor respuesta protectora en los grupos vacunados se registro en el vacunado con BCG.

Cabe mencionar que pese a que las vaquillas para el estudio de vacunación fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados de negatividad a las pruebas diagnósticas de tuberculina, ELISA e FN- γ , los resultados del análisis de inmunotransferencias mostraron reactividad a diferentes proteínas del CFPE al inicio de la vacunación sobre todo a las proteínas de choque térmico, al complejo Apa y al complejo 85, proteínas que son comunes en diferentes especies micobacterianas; señalando la sensibilización de los animales a micobacterias ambientales; pese a ello la respuesta de los animales vacunados con BCG resultó ser protectora. No obstante, es recomendable que en su momento los animales vacunados contra la tuberculosis bovina se vacunen a edad temprana para que la respuesta que se desarrolle sea específica, perdurable y protectora, y se logre evitar la “sensibilización” con antígenos de reacción cruzada por micobacterias ambientales o por bacterias taxonómicamente relacionadas, considerando la fuerte exposición ambiental que existe para los bovinos en las explotaciones lecheras.

9. CONCLUSIONES.

1.- La vacunación de beceras con la vacuna BCG cepa danesa a una dosis de 1×10^6 UFC/ml (Grupo I, BCG) indujo preferentemente una respuesta inmune celular, de acuerdo a los niveles de producción de IFN- γ determinados en la etapa posvacunación.

2.- En las beceras vacunadas con el CFPE (Grupo II, CFPE) no fue evidente una respuesta inmune significativa en la producción de IFN- γ , ni en niveles de anticuerpos a diferencia de lo que se ha observado en otras investigaciones.

3.-En las beceras vacunadas con CFPE+IFN- γ (Grupo III, CFPE+IFN- γ) la aplicación exógena de IFN- γ moduló de manera negativa la respuesta celular, favoreciendo la respuesta humoral en el grupo vacunado con el CFPE.

4.-Antes de la vacunación los animales exhibieron reconocimiento a varias proteínas del CFPE de *M. bovis*, pese a que ese tiempo resultaron negativos a las diferentes pruebas diagnósticas empleadas para su selección. Señalando con ello, la “sensibilización” por micobacterias atípicas o bacterias relacionadas.

5.- Entre el 40 y 50% de las beceras consideradas negativas (Grupo VI, No reactivos) mostró reactividad a las proteínas de: 75, 60, 50-55, 45-47 y 32 (Ag 85) kDa, esto debido a la previa sensibilización mencionada anteriormente.

6.-El análisis de reconocimiento en las etapas posvacunación y posdesafío mostraron diferencias tanto en el número de antígenos reconocidos como en intensidad de reconocimiento o reactividad en función del tiempo en los grupos tratados y control, aún entre animales pertenecientes al mismo grupo.

7.- Los animales de los diferentes grupos vacunados y control exhibieron baja reactividad hacia los antígenos de 216, 19, 132, 26, 23, 10 y 6 kDa durante las diferentes fases experimentales, incluyendo el periodo posdesafío.

8.- En el grupo de bovinos reactivos la reactividad e intensidad de reconocimiento a los diferentes antígenos fue mayor, sobresaliendo el reconocimiento a los antígenos de: 216, 200, 132, 78, 38, 26, 23, 19, 10 y 6 kDa. Los cuales pueden tener utilidad diagnóstica, y permitan diferenciar animales vacunados de infectados.

10.- Las diferencias en el reconocimiento del grupo reactor con la del grupo control infectado experimentalmente hacia las proteínas de 38, 26, 23, 10 y 6 kDa, pueden deberse a la cronicidad de la infección en los animales de campo seleccionados para el estudio, pues la mayoría de ellos presentaba niveles altos de anticuerpos al CFPE de *Mycobacterium bovis*.

11.- Es conveniente la vacunación de los animales a edad temprana para lograr el desarrollo de una inmunidad protectora y específica, debido a que se reduce la sensibilización por micobacterias atípicas conforme avanza la edad de los animales.

12.- La vacunación debe recomendarse ya que se considera la mejor herramienta para lograr reducir los altos índices de incidencia y prevalencia de la enfermedad, así como para reducir las lesiones en animales infectados.

13.- El buen manejo y la segregación de animales reactivos, debe de considerarse como parte complementaria para el control y posterior erradicación de la enfermedad, situación que deben tomar con responsabilidad y compromiso los productores para lograr resultados efectivos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Pan/American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, regional office of the World Health Organization, International Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the Americas; Saltillo, Coahuila, México.1991; 18-20.
2. Smith PG, Moos AR. Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Epidemiology of tuberculosis. Bloom, BR. ASM Press. Washington, DC.1994:47-62.
3. Organización Panamericana de la Salud.VII Reunión Interamericana de la Salud Animal a Nivel Ministerial. Estrategias y plan de acción para la erradicación de la tuberculosis bovina en las Américas. Washington, D.C., EUA, 1991.
4. Rentarúa ET, Hernández AJ. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. Exposure associated with management of colostrums and milk. Prev Vet. Med. 1996; 27: 23-37.
5. NOM-031-ZOO-1995 "Campaña Nacional Contra la Tuberculosis
6. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res. Vet. Sci. 2003; 74:1-15.
7. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animal and man: a review. Tubercle Lung Dis. 1995; 1:1-46.
8. Maher D *et al.* Tuberculosis deaths in countries with high HIV prevalence: what is their use as an indicator in tuberculosis programmer monitoring and epidemiological surveillance? Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005; 9:123-127.
9. Murray CJL, Styblo K, Rovillon A. Tuberculosis in developing countries burden, intervention and cost. Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis. 1990; 65:6-24.
10. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Heath Organization. Tuber. 1991; 72:1-6.
11. Clavijo AM, de Rolo M, Alfaro C, Corso M. Todo lo que usted debe saber sobre la tuberculosis bovina. Revista Digital CENIAP Especial 2004. Maracay, Aragua, Venezuela. 2004.
12. Buddle MB, Pollock MJ, et.al. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int. J. Parasitol. 2003;33:555-566.
13. Buddle MB, Pollock MJ, Skinner AM, Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. Int. J. Parasitol. 2003; 33:555-566.

14. Sommer HM, Good RC. *Mycobacterium*. In: Manual of of Clinical Microbiology. 4^a Ed. Editores: Lennette EH, Belows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Editorial, Washington DC. Am. Soc. Microbiol. 1985;216-248.
15. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E, Microbiologia Médica 16a ed. México D.F: Ed Manual Moderno.1999;343.
16. Skerman VB, Megowan V, Sneath PH. Approved list of bacterial names. Internat J System Bactiol,1980;30: 225-420.
17. Bernardelli A. Clasificación fenotípica de las micobacterias. Manual de procedimientos. Dirección de Laboratorio y Control Técnico. Buenos Aires, Argentina. 2007.
18. Alcaide FVF, Esteban MJ, González MJ, Palacios GJJ. Capítulo 9: Micobacterias. En: Cercenado E., Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2.^a ed. Madrid: SEIMC. 2005;1-93
19. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories. United State Departament Agriculture Ames, Iowa. 1993;14-37.
20. Rastogi N. Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug resistance. Res. Microbiol. 1991;142:462-476.
21. Felton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. Infect. Immun. 1996;64:683-690.
22. Lee RE, Brennan PJ, Besra GS. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Tuberculosis. Shinnick. Springer. 1996;1-25.
23. Besra GS, Chatterjee D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. Barry, R. Bloom, ed. ASM, Washington. 1994. Cap. 20.
24. Besra GS, Morehouse CB, Rittner CM, Waechter CJ, Brennan PJ. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. J Biol Chem. 1997; 272:18460–18466.
25. Berg S, Kaur D, Jackson M., Brennan PJ. The Glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis*; roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. Glycobiology. 2007; 17:35–56.
26. Davis D, Dulveco R. Eisen H, Ginseberg H. Tratado de Microbiología. 2^a edición . España. Salvat Editores. 1983; 868-892.
27. Steele JH, *Mycobacterium bovis* infection in animals and human. Iowa State University Regional and country status report. In CO Thoen, Steele JH. Press. Ames. 1995;169-172.

28. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 2003;74:1-15.
29. Thoen OCh. Tuberculosis in Wild and domestic mammals. *Tuberculosis, Pathogenesis, and Control*. Edited by Barry R. Bloom. ASM Press. Washington, DC. 1994; 157-162.
30. SENASICA, SAGARPA; Dirección General de Salud Animal; Cuestionario FAO/OIE/OMS – 2002. México
31. Gurría TF. Situación actual de la campaña contra la tuberculosis y brucelosis en México. *México Ganadero*. 1994;385: 21-28.
32. Zendejas HM, Milián SF, Cuador GJQ, Bello CG, Escalera AMA, Márquez HG, Casanova GL. Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in México. *Veterinaria italiana*. 2007;43(3): 629-634.
33. World Health Organization. 2009 Update Tuberculosis facts. Stop TB Partnership. www.who.int/tb/publications/2009/tbfactsheet_2009update_one_page.pdf
34. Raviglione MC, Zinder DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995;273: 220-226.
35. Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* 1993;149: 405-417.
36. López MLM, Díaz OF, Vallecillo MAJ, Esquivel SH, Gutiérrez PJA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev Latinoamericana Microbiol.* 2006; 48(2):173 – 178.
37. OIE (World Organization for Animal Health), 2004. Annual Animal Disease Status, Bovine Tuberculosis. Accessed May 3, 2006. Available from: <http://www.oie.int>
38. De Kantor IN, & Ritacco V.. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 2006; 112: 111-118.
39. Crevel RV, Ottenhoff THM, Van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Clin. Microbiol.* 2002; 294-309.
40. Rusell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5:39-47
41. Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 2002; 163(2): 115-127.
42. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascade in immunity to tuberculosis. *Immunol. Today.* 1999; 20: 307- 311.

43. Abbas A, Lichtman A. *Inmunología celular y Molecular*. 4ta ed. España: Ed McGraw Hill .2003; 354-360.
44. Kaufmann SH. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*. 1995;16: 338–342.
45. Villarreal-Ramos B, Reed S, Mc Aulay M, Prentice H, Coffey T, Charleston BC, Howard CJ. Influence of the nature of the antigen on the boosting of responses to mycobacteria in *M. bovis*-BCG vaccinated cattle. *Vaccine*. 2006; 24(47-48):6850-6858.
46. Woodworth JS, Behar SM. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells and their role in immunity. *Crit. Rev. Immunol*. 2006; 26(4):317-352.
47. Tizard IR. *Inmunología veterinaria*. 5ta ed. Ed McGraw Hill Interamericana, México 1996.
48. Herrera BTM, Torres RM, Juárez CE, Sada DE. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2005; 18:327-336.
49. Janeway Ch, Travers P. *Inmunologia: El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2° ed, Ed. Masson. España 2003.
50. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, ThomasUszynski S, Melian A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, and Modlin RL. An antimicrobial activity of cytotoxic mediated by granulysin. *Science* 1998; 282: 121-125.
51. Batoni G, Esin S, Harris RA, Kallenius G, Svenson SB, Anderson R, Campa M, Wigzell H. $\gamma\delta$ + and CD4+ $\alpha\beta$ + human T-cell subset responses upon stimulation with various Mycobacterium tuberculosis soluble extract. *Clin. Exp. Immunol*. 1998; 112: 52-62.
52. D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for $\gamma\delta$ T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol*. 1997; 158: 1217-1221.
53. Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kauffmann SHE. Protective role of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells in tuberculosis. *Eur. J. Immunol*. 1995; 25: 2877-2881.
54. MacHugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR. Identification of two distinct subset of bovine $\gamma\delta$ with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 1997; 92:340.
55. Hedges JF, Cockrell D, Jackiw L, Meissnes N, Jutila MA. Differential mRNA expression in circulating $\gamma\delta$ T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. *J. Leukocyte Biol*. 2003; 73:306.

56. Meissner N, Radke J, Hedge JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abramhansen M, Jutila MA. Serial analysis of gene expression of gene expression in circulating $\gamma\delta$ T cells subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J. Immunol.* 2003; 170:356.
57. Pollack JM, Pollack DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, Mackie DP. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Immunology* 1996; 87:236-241.
58. Cassidy JP, Bryson DG, Cancela MMG, Forster F, Pollock JM, Neill SD. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesion. *J. Comp. Pathol.* 2001; 124:46-51.
59. Bastida-Corcuera, FD., Butler JE, Yahiro S, Corbeil LB. Differential complement activation by bovine IgG2 allotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; 71:115-123.
60. Young DB, Garbe T, Lathigra R, Abou-Zeid C. Protein antigens: structure function and regulation. In: McFadden (Editor), *Molecular Biology of the Mycobacteria*. Surrey University Press, London. 1990;1-35.
61. Fifis T, Costopoulos C, Radford AJ, Basic A, Wood, P.R. Purification and characterization of major antigens from *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect. Immunol.* 1991; 59: 800-807.
62. Closs O, Harboe M, Axelsen N H, Bunch-Christensen K, Magnusson M. The antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. *Scand J Immunol.* 1980; 12:249-263.
63. Nagai S, Wiker HG, Harboe M, Kinomoto M. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1991; 59(1):372-382.
64. Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 1989;29: 91-101.
65. Hewinson RG, Russell WP. Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *J. Gen. Microbiol.* 1993;139: 1253-1259.
66. Matsuo T, Matsumoto S, Ohara N, Kitaura H, Mizuno A and Yamada T. Differential transcription of the MPB70 genes in two major groups of *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *Microbiology.* 1995; 141:1601-1607.
67. Fifis T, Rothel JS, Wood PR. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation. *Vet. Microbiol.* 1994;40: 64-81.

68. Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres L, Ramírez C, Cruz N. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1986; 52: 293-302.
69. Harboe M, Nagai S, Wiker HG, Sletten K, Haga S. Homology between the MPB70 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol.* 1995;42(1):46-51.
70. Araujo Z, Acosta M, et al. Immunitary response in tuberculosis and the role of *Mycobacterium tuberculosis* secretion antigens in its protection, pathology and diagnosis. *Review. Invest Clin.* 2008;49(3): 411-441.
71. Motta A, Schmitz C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro. *Immunology* 2007; 121(4): 462-472.
72. Rutherford SL, Lindquist S. Hsp 90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature.* 1998; 396: 336-342.
73. Dubaniewicz A, Dubaniewicz-Wybieralska M, et al. "*Mycobacterium tuberculosis* complex and mycobacterial heat shock proteins in lymph node tissue from patients with pulmonary sarcoidosis." *J Clin Microbiol* 2006;44 (9): 3448-3451.
74. Guinn KM, Hickey JM, Mathur KS, Zakel LK, Grotzke EJ, Lewinsohn MD, Smith S, Sherman RD. Individual RD-1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 2004; 51(2): 359-370.
75. Vordermeier HM, Chambers M A, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson RG. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 2006; 229-244.
76. 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.
77. Goulding CW, Parseghian A, Sawaya MR, Cascio D, Apostol MI, Gennaro ML, Eisenberg D. Crystal structure of a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* – MPT63 a 1.5 Å resolution. *Protein Science.* 2002; 11: 2887-2893.
78. Rambukkana A, Das PK, Chand A, Baas JG, Groothuis DG, Kolk HJ. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant *Mycobacterium tuberculosis* proteins in the 30- kDa region; identification and localization of 29/33 kDa doublet proteins on mycobacterial cell wall. *Scand. J. Immunol.* 1991;33: 763-775.
79. Harth G, Lee BY, Wang J, Clemens DL, Horwitz MA. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kDa major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1996;64: 3038-3047.

80. Chacón O, Realpe T, Barletta RG, Robledo J. Inactivación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis. *Biomédica*. 2004;24(1):165-187.
81. Leão SC, Lopes JD, Patarroyo ME. Immunological and functional characterization of proteins of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 complex using synthetic peptides. *J. Gen. Microbiol.* 1993;139: 1543-1549.
82. Azouaou N, Petrofsky M, Young LS, Bermúdez LE. *Mycobacterium avium* infection in mice is associated with time-related expression of Th1 and Th2 CD4⁺ T-lymphocyte response. *Immunol.* 1997;91: 414-420.
83. Harth G, Horwitz MA, Tabatadze D, Zamecnik PC. Targeting the *Mycobacterium tuberculosis* 30/32kDa mycolyl transferase complex as a therapeutic strategy against tuberculosis: Proof of principle using antisense technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:15614-15619.
84. Dussurget O, Stewart G, Neyrolles O, Pescher P, Young D, Marchal G.. Roles of *M. tuberculosis* Copper–Zinc superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 2001;69:529-533.
85. Hutter B, Singh M. Properties of the 40 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, a functional L-alanine dehydrogenase. *Biochem J.* 1999;343:669-672.
86. Nigou J, Gilleron M, Puzo G. Lipoarabinomannans: characterization of the multiacylated forms of the phosphatidyl-myo-inositol anchor by NMR spectroscopy. *Biochem J.* 1999 ; 337:453-460.
87. Nigou J, Vercellone A, Puzo G. New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level. *J Mol Biol.* 2000;299:1353-1362.
88. Stenger S, Modlin RL. Control of *Mycobacterium tuberculosis* through mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14(4):452-457.
89. International standard for purified protein derivative of bovine tuberculin 760. 22 ed. World Health Organization; 1986.
90. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* 2002; 85:379-389.
91. Zenteno CR, Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2003;16(3): 181-186.
92. Palmer MV, Waters WR, Thacker TC, Greenwald R, Esfandiari J, Lyashchenko KP. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. and Vaccine Immunol* 2006; 13:387-394.

93. Ramirez CC, Valero EG, Arriaga DC. Comparación del ELISA con la tuberculinización en el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. Tec. Pec. Méx. 1995;33(3): 148-158.
94. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, Francis B, Melville L, Small K, DeWitte K, Tolson J, Ryan TJ, Lisle GW, Cox JC, Jones SL. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 1992;31:71-79.
95. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. Field comparison of the interferon-gamma assay and the single intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. Aust. Vet. J. 1991;68: 286-290.
96. De la Rúa-Domenech, Goodchil AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Antemortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res Vet Sci. 2006; 81: 190-210.
97. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. Veterinary Microbiology 2006; 112: 171–179.
98. Brown F. Gordon D, VACCINE DESIGN. Ed Molecular Inglaterra: Medical Science Series 1993;24: 74-75.
99. Nossal GJV. Vaccines. In: Paul WE (Ed.) Fundamental Immunology, Lippincott-Raven, Philadelphia PA 1999; 1382-1425.
100. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy R, Heslop J, de Leslie GW, Stanford JL, Aldwell FE. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. Res. Vet. Sci. 1995; 59:10-16.
101. Buddle BM, Parlane NA, Keen DI, Aldwell FE, Pollock MJ, Lightbody K, Andersen P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated and *M. bovis* infected cattle by using recombinant Mycobacterial antigens. Clin Diag Lab Immunol. 1999; 1-5.
102. Buddle BM, Aldwell FE, Skinner MA, de Leslie GW, Denis M, Vordermeier HM, Hewinson RG, Wedlock DN. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. Vaccine. 2005; 23: 3581-3589.
103. Buddle BM, de Lisle GW, Pfelfer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccines. 1995;13: 1123-1130.

104. Buddle BM, Pollock JM et. Al. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *International Journal for Parasitology*. 2003; 33:555-566.
105. Guerin C. The history of BCG: early history. In: Rosenthal SR, ed. *BCG vaccination against tuberculosis*. London: Churchill. 1953.
106. Wedlock DN, Denis M, Skinner MA, Vordermeier HM, et al. Vaccination of Cattle with a CpG Oligodeoxynucleotide-Formulated Micobacterial Protein Vaccine and Mycobacterium bovis BCG Induces Levels of protection against Bovine Tuberculosis Superior to Those Induced by Vaccination With BCG alone. *Infection and Immunity* .2005;73(6): 3540-3546.
107. Haslov K, Andersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Arderson P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1995; 63(3): 804-810.
108. Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun*. 1997; 65(7): 2587-2592.
109. Hewinson RG, Russell WP. Processing and secretion by Escherichia coli of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *J Gen Microbiol*. 1993; 139(6): 1253-1259.
110. Kalra M, Grover A, Mehta N, Singh J, Kaur J, Sable SB, Behera D, Sharma P, Verma I, Khulle GK. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculosis mice. *Clin Immunol*. 2007; 125:173.
111. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, Griffiths KE, Marchal G, Leclerc C, Cole ST. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis . *Nat. Med*. 2003; 9:533.
112. Quinn PJ. Mechanisms of action of some immunomodulators used in veterinary medicine." *Adv Vet Sci Comp Med*. 1990; 35 :43-99.
113. Pappaterra M. Efecto *in vitro* e *in vivo* de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E. coli* y *Propionibacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2002.
114. Cooper AM, Dalton DK. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1993; 178(6): 2243-2247.
115. González G, Font P. Terapéutica en HIC. *Man Farm Hosp*. 2002.
116. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med*. 1993; 178: 2249-2254

117. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edin)* 2001;81:147-155.
118. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principia of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
119. Estrada CC, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet. Méx.* 2001; 32(3): 207-211.
120. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. *Nature.* 1970; 227: 248-254.
121. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 4530-4354.
122. Rosenberg IM. Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques. Chapter 7. Transfer and detection of proteins on membrane supports. Birkhauser. Boston. Printed in the U.S.A. 1996; 153-179.
123. Wedlock DN, Vesosky B, Skinner MA, De Lisle GW, Orme IM, Buddle BM., Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 2000; 68 (10): 5809-5815.
124. Mustafa AS., Mycobacterial gene cloning and expression comparative genomics, bioinformatics proteomics in relation to the development of new vaccines and diagnostic reagents. *Med Princ Pract.* 2005; 14(1):27.
125. Mustafa AS, Al-Attiyah R., Identification of *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic regions encoding antigens inducing protective cellular immune responses. *Indian J Exp Biol.* 2009;47:498-504.
126. Behr MA, Wilson Ma, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole- genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520.
127. Cataldi A, Romano MI, Bigi F. A western blot characterization of *Mycobacterium bovis* antigens recognized by cattle sera. *Res Microbiol.* 1994; 145(9):689-698.
128. Rhodes SG, Gavier-Widen D, Buddle BM, Whelan AO, Singh M, Hewinson RG, Vordermeier HM. Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 2000;68(5): 2573-2578.
129. O'Loan CJ, Pollock JM, Hanna J, Neill SD. Immunoblot analysis of humoral immune responses to *Mycobacterium bovis* in experimentally infected cattle: Early recognition of a 26 kilodalton antigen. *Clin diag Lab Immunol.* 1994;1(5):608-611.

130. Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, Zhao X, Vogelstein M, Spencer JS, McMurray DN, Gennaro ML. Immunological characterization of antigens encode by the RD1 region of the mycobacterium tuberculosis genome. *Scand J Immunol.* 2001; 54:448-452.
131. Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle 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(6): 3026-3032.
132. Havlir DV, Wallis RS, Boom WH, Daniel TM, Chernenak K, Ellner JJ. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.* 1991;95: 665-670.
133. Amadori M, Tameni S, Scaccaglia P, Cavirani S, Archetti LL, Giandomenico R Q., Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis* infected bovine herds. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 566-568.
134. Auer LA, Schleeauf SM. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology.* 1988; 18: 51-61.
135. Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Vet. Microbiol.* 1992;30: 343-354.
136. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust. Vet. J.* 1992;69: 1-4.
137. Fifis TC, Corner LA, Rothel JS, Wood PR. Cellular and humoral immune response of cattle to purified *Mycobacterium bovis* antigens. *Scand. J. Immunol.* 1994;39: 267-274.
138. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriaga DC, González SD, Estrada ChC. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Mex.* 2003; 34(1):13-26.
139. Hernandez PR, Orozco HA, Sampieri AL, Pavon LC, Velasquillo CJ, Larriva-Sahd J, Alcocer M, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and the pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996; 89:26-33.
140. Power CA, Wei G, Bretscher PA, Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous. Or intradermal route. *Infect. Immun.* 1998; 66:5743-5750.

11. ANEXO

REACTIVOS

ACRILAMIDA 30 - 0.8

Acrilamida 29.2 gr.

N-N' bisacrilamida 0.8 gr.

Agua deionizada 100.0 ml.

Filtrar y mantener a 4 °C en oscuridad / 30 días máximo.

TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris base 18.15 gr.

Agua deionizada 50.0 ml.

Ajustar a pH 8.8 con HCl 6 N, aforar a 100 ml.

SDS 10 %

Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10.0 gr.

Agua deionizada 90.0 ml.

No refrigerar.

PERSULFATO DE AMONIO (APS)

Persulfato de amonio 0.1 gr.

Agua deionizada 1.0 ml.

Hacer en el momento o congelar.

TRIS-HCl 0.5 M Ph 6.8

Tris base 6.0 gr.

Agua deionizada 60.0 ml.

Ajustar a pH 6.8 con HCl 6 N, aforar a 100 ml.

AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO Ph 8.3

Tris base 3.0 gr.

Glicina 14.4 gr.

SDS 1.0 gr.

Agua deionizada 500.0 ml.

Aforar a 1000 ml.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA (condiciones no reductoras)

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 ml.
Glicerol	2.5 ml.
SDS 10 %	2.0 ml.
Azul de bromofenol 0.5 %	0.2 ml.
Agua deionizada	3.55 ml.
Volumen total	9.5 ml.

No refrigerar

Para condiciones reductoras, adicionar 50 μ l de mercapto etanol a 950 μ l de amortiguador de muestra previo a su uso; preparar la muestra y calentar a 95°C por 4 minutos.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA (condiciones reductoras)

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	25.0 ml.
Glicerol	10.0 ml.
SDS 10 %	18-20 ml. 2.0 gr.
Azul de bromofenol 0.1 %	0.1 ml.
Mercapto etanol	5.0 ml.

Aforar a 50 ml

SOLUCION FIJADORA

Metanol	400.0 ml
Acido acético	70.0 ml
Agua deionizada	530.0 ml.

COLORANTE DE COOMASIE

Metanol	450 ml.
Acido acético	50 ml.
Azul de coomasie R-250	2 gr.
Agua destilada	500 ml.

Filtrar

DECOLORANTE

Metanol	400 ml.
Acido acético	70 ml.
Agua destilada	530 ml.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

Tris-base	3.025 gr.
Glicina	14.4 gr.
Metanol	200 ml.
Agua destilada	800 ml.

TBS 10X pH. 7.5

NaCl	80 gr.
KCl	2 gr.
Tris base	30 gr.
Agua destilada	700 ml
Ajustar a pH. 7.5 con HCl	
Aforar a 1000 ml.	

CBS 3X pH. 5.5

NaCl	2.92 gr.
Citrato de sodio	0.58 gr.
Agua destilada	70 ml.
Ajustar pH y aforar a 100 ml.	

TTBS

Tween-20	50 µl
TBS 1X	100 m.

TBS-3% GELATINA (bloqueo)

Gelatina	3 gr.
TBS	100 ml.
Calentar y agitar para su disolución.	

TTBS-1% GELATINA (buffer de anticuerpo)

Gelatina 0.5 gr.

TTBS 50 ml.

Calentar y agitar para su disolución.

PROTEIN G-HRP(conjugado)

Gelatina 0.4 gr.

TCBS 40 ml.

SOLUCION DE BLOQUEO

PBS 100 ml.

Tween-20 100 μ l.

Leche 1.5 gr.

TCBS

CBS 3X 20 ml.

Agua destilada 40 ml.

Tween-20 35 μ l.

PBS

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

Fosfato sódico dihidrogenado ($\text{NaH}_2 \text{PO}_4$) 0.32 gr.

Cloruro de sódio(NaCl) 8.5 gr.

Água destilada 1000 ml.

SOLUCION DE DESARROLLO DE COLOR

4-cloroalfanaftol 5 mg.

Metanol 1.7 ml

PBS 8.3 ml.

Agua oxigenada al 3% 17 μ l

GLOSARIO

Adyuvante	Sustancia que administrada simultáneamente con un antígeno intensifica la respuesta inmunitaria frente a éste.
Anergia	Estado funcional por el que un linfocito T no es capaz de ganar o ejecutar funciones efectoras, aun cuando recibe primera y segunda señales de activación
Anergia cutánea	Ocurre frecuentemente en los tejidos periféricos y consiste en la incapacidad para reaccionar a las pruebas de hipersensibilidad tardía, en la que se involucran una serie compleja de efectos inmunológicos, celulares y vasculares
Animal negativo	Es aquel animal que ha sido sujeto a una o varias pruebas diagnósticas oficiales de tuberculosis y cuyos resultados han sido negativos.
Animal reactor	Es el que ha sido sujeto a una o más pruebas diagnósticas oficiales de tuberculosis y cuyos resultados han sido positivos.
Anticuerpo	Glucoproteína secretada por las células plasmáticas como producto característico de

una respuesta inmune de base humoral y que presenta la propiedad de unirse de forma específica al determinante antigénico que indujo su síntesis. Aunque es sinónimo de inmunoglobulina, suele emplearse el término anticuerpo cuando se conoce su especificidad.

Antígeno

Molécula extraña reconocida por el sistema inmunitario, en concreto por anticuerpos preformados o por receptores específicos en linfocitos T o B . Tradicionalmente se aplica a los inmunógenos o moléculas que desencadenan la respuesta inmune

Bacterina

Preparación de bacterias inactivadas, destinadas a una inmunización activa.

BCG

(bacilo de Calmette-Guerin) cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis* que se ha cultivado en el laboratorio por reducción progresiva de su virulencia; se ha empleado como vacuna contra la tuberculosis.

Célula asesina K

Célula responsable de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, (sinónimo de célula NK).

Célula NK

Células que tienen la capacidad de matar células no diferenciadas, células tumorales, células infectadas por virus o bacterias, cuya acción no esta restringida por el MHC.

Poseen receptores para Fc por lo que también destruyen a la célula blanco mediante un mecanismo dependiente de anticuerpos.

Célula plasmática

Célula diferenciada de los linfocitos B, que produce y secreta inmunoglobulinas.

Célula presentadora de antígenos (CPA)

Células que procesan y presentan el antígeno o péptidos antigénicos asociados en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II al linfocito T.

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

Es un locus genético muy polimórfico que determina la expresión de los antígenos de histocompatibilidad que participan en las interacciones celulares durante la respuesta inmune.

Determinante antigénico

Parte de la estructura de un antígeno que se combina con el sitio de combinación del anticuerpo.

Electroforesis

Separación de moléculas en un campo eléctrico.

Epítopo o epítope

(Determinante antigénico) es la región del antígeno reconocida por un anticuerpo

específico o por el TCR. Un antígeno puede presentar un número variable de epítomos de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten un número variable de epítomos distintos; mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos por su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítomos diferentes.

Erradicación	Eliminación total de la tuberculosis bovina en un área geográfica delimitada
Hato	Conjunto de animales de una misma especie que se encuentra ubicado en una unidad de producción.
Hato afectado	Corresponde al hato en el cual se han identificado animales positivos a tuberculosis.
Hato libre	Hato que cuenta con la constancia correspondiente expedida por la Comisión.
Ig	Grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, producidas por linfocitos B y células plasmáticas y que son responsables de la inmunidad humoral.
IgA	Inmunoglobulina predominante en las secreciones externas. Normalmente se presenta en forma dimérica unida mediante la cadena J unido un polipéptido

denominado pieza secretora. La IgA sérica es en su mayor parte monomérica.

IgD Inmunoglobulina cuyo significado fisiológico no se conoce. Su concentración sérica es muy pequeña aunque paradójicamente la mayoría de linfocitos B maduros coexpresan en su superficie IgM y IgD.

IgE Inmunoglobulina involucrada en reacciones de hipersensibilidad inmediata con capacidad de unirse a basófilos y mastocitos a través de receptores de gran afinidad que estas células poseen para su extremo Fc.

IgG Inmunoglobulina predominante en suero, en el espacio extravascular, en las secreciones internas y en la fase secundaria de la respuesta inmunitaria.

IgM Principal inmunoglobulina que se produce en la respuesta primaria, su principal característica es su estructura pentámerica y su gran tamaño, lo que limita su ambiente exclusivamente intravascular.

Incidencia Número de nuevos casos de tuberculosis que aparece en una población animal determinada durante un periodo específico

en un área geográfica definida.

Inmunidad

Capacidad de defensa adquirida activa o pasivamente por un organismo para resistir a la agresión de agentes extraños a él.

**Inmunidad
adquirida
(adaptativa o
específica)**

Comprende un conjunto de mecanismos de reacción de alta especificidad que han sido adaptados al reconocimiento del patógeno o célula tumoral que los originó. Tras el contacto previo se generaron los procesos de presentación y activación de linfocitos específicos para la producción de anticuerpos y citocinas. El sistema inmune adaptativo se caracteriza además por contar con un mecanismo de memoria por el cual, ante un segundo encuentro con el mismo desafío, la respuesta es más rápida y más eficiente

Inmunidad humoral

Respuesta inmune mediada principalmente por anticuerpos y complemento.

Inmunidad innata o inespecífica

Conjunto de mecanismos de resistencia temprana que no requieren de un contacto previo con el agente agresor, sus componentes principales son: barreras fisicoquímicas (ej: piel, movimiento peristáltico, aparato mucociliar, etc.) moléculas solubles (ej: Lisozima, complemento, proteínas de fase aguda, interferones, citocinas proinflamatorias,

etc.), células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos) y células de citotoxicidad natural (NK). Todos estos mecanismos ejercen un control permanente de vigilancia que responden de manera inmediata a la agresión provocada por los patógenos; además de proveer un conjunto de señales indispensables para la activación de la inmunidad adaptativa.

Inmunidad
mediada por
células
Inmunización

Inmunidad en la cual participan predominante linfocitos T sensibilizados y macrófagos.

Proceso que induce un estado inmunitario específico, el cual se puede adquirir de forma activa dando por resultado una respuesta inmune primaria y formación de memoria o pasiva en la que no se forma memoria.

Interferon γ

Citocina producida por linfocitos T y células NK por la activación de los macrófagos.

Inmunógeno

Sustancia que introducida en un animal puede estimular la respuesta inmune.

kDa

1000 daltons, 1 dalton= décima parte de la masa del átomo de carbono.

Linfocinas

Factores solubles de naturaleza peptídica producidos por los linfocitos activados por

el antígeno o mitógenos que carecen de especificidad y no presentan restricción por las moléculas del MHC

Linfocito Tipo de leucocito o glóbulo blanco comprendido dentro de la serie agranulocítica

Linfocito T CD4 Linfocito cooperador (helper) tipo de linfocito T que reconoce epítomos en el contexto de moléculas MHC clase II de las células presentadoras del antígeno. Involucrado en la activación y dirección de otras células inmunitarias

Linfocito T CD8 Linfocito T citotóxico pertenecen a la línea de los linfocitos T encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular

Linfocito T cooperador (helper) Sinonimia linfocito CD4

Linfocito Th (Linfocito T “helper” o cooperador) población de linfocito T que expresan la molécula CD4 sobre su superficie. Los linfocitos Th se subdividen en dos subtipos que se diferencian fenotípicamente por el tipo de interleucinas que producen: Th1 (productores de IL2

Linfocitos B Células especializadas que poseen receptores tipo inmunoglobulina con

distribución clonal que tras interactuar con el antígeno específico

Linfocitos T

Células que emergen de la médula ósea y maduran o diferencian en el timo. Responsables de coordinar la respuesta inmune celular mediante la secreción de citocinas; además de llevar a cabo funciones de cooperación para que se desarrollen todas las formas de respuestas inmunes

M. bovis

Mycobacterium bovis.

MHC

Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MHC Clase I

Molécula constituida por una cadena polipeptídica altamente polimórfica unida no covalentemente a la β_2 microglobulina. Codificada por HLA-A, B y C en el humano y H-2K, D y L en ratón. Presentes en la superficie celular de casi todas las células. Estas moléculas presentan antígenos a linfocitos T CD8.

MHC clase II

Moléculas por dos cadenas polipeptídicas (α y β). Codificadas por HLA-DR, DQ y DP en humanos y I-A e I-E en ratón. Presente sólo en algunos tipos celulares, relacionados con la presentación antigénica a linfocitos CD4.

MHC clase III	Moléculas codificadas por genes situados dentro del MHC, que no están involucradas en la presentación antigénica. Incluyen algunos componentes del complemento.
Muestra	Sangre, suero, tejidos, órganos u otro definido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que tienen el propósito de ser analizados mediante pruebas de diagnóstico para identificar la presencia de tuberculosis.
PPD	Derivado Proteico Purificado, preparado a partir de filtrados de cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i> o <i>avium</i> , autorizado para su empleo por la Dirección.
Pruebas diagnósticas	Aquellas autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural
Respuesta inmune adquirida o adaptativa	Conjunto de elementos inmunes inducidos específicamente por un antígeno, y que guardan memoria inmunológica. En ella participan anticuerpos, linfocitos B y linfocitos T específicos al antígeno.
Respuesta inmune primaria	Respuesta inmune que se produce durante el primer contacto con un antígeno.
Respuesta inmune secundaria	Respuesta que se produce durante el segundo contacto con un antígeno. Juega un

importante papel la especificidad de la respuesta y en la memoria inmunológica.

Tuberculina	Antígeno que se utiliza para el diagnóstico de la tuberculosis bovina
Tuberculosis bovina	Enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico y progresivo, causada por el <i>M. bovis</i> , que afecta a los animales y al hombre, por lo que se considera zoonosis, se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, que merman la condición física y productiva, causando pérdidas económicas de consideración.
Unidad de producción	Rancho, finca, hacienda, granja, establo u otra similar.
Vacuna	Preparación de microorganismos (bacterias, virus o parásitos) completos o degradados, atenuados o muertos que al administrarse en un individuo o animal induce una respuesta inmune específica y de memoria que los protegerá ante posibles desafíos.
Vacunación	Inducción de inmunidad activa mediante la administración de agentes patógenos vivos atenuados o muertos o de sus productos de secreción.