



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EFFECTO DE LA PRESENCIA DE *Corynebacterium spp* EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA.

PRESENTA:

**BRENDA ARGELIA VIRIDIANA GIL CENTENO**

DIRECTORES: M en C. LAURA JARAMILLO MEZA

DR. FERNANDO DÍAZ OTERO

MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE DE MÉXICO

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

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

DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

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

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE Corynebacterium spp EN LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Que presenta la pasante: **Brenda Argelia Viridiana Gil Centeno**  
Con número de cuenta: **09912500-8** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Junio de 2012.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                     | <b>NOMBRE</b>                          | <b>FIRMA</b> |
|---------------------|--|--------------|
| <b>PRESIDENTE</b>   | MVZ. José Margarito Rojo López         |              |
| <b>VOCAL</b>        | MVZ. Humberto Gustavo Arellano Sánchez |              |
| <b>SECRETARIO</b>   | MVZ. Rafael Pérez González             |              |
| <b>1er SUPLENTE</b> | MC. Juan Sebastián Barrientos Padilla  |              |
| <b>2do SUPLENTE</b> | MVZ. Edna Maribel Legaspi Nuevo        |              |

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

Después de tantos tropiezos finalizo este proyecto, se que fue muy larga la espera pero por fin lo he logrado.

Llegar hasta aquí me costó mucho trabajo y ahora me doy cuenta que todas las desveladas y mal pasadas valieron la pena, porque que cierro uno de los ciclo más largos el cual me va a traer muchas recompensas a lo largo de mi vida..... GRACIAS

#### **A DIOS**

Por haberme dado la dicha de cumplir una meta mas en mi vida, cerrar este ciclo y empezar uno nuevo dándome fuerza y mucha salud para seguir adelante.

#### **A MI MADRE**

LIDIA RAQUEL CENTENO FRANCO Por haberme dado la vida además de enseñarme a no caer y siempre lograr mis metas, por hacerme una persona de bien y ser mi ejemplo a seguir. GRACIAS mamá por la paciencia que me has tenido y sobre todo por apoyarme sin pedir nada a cambio. Esta tesis es para ti porque tú me ayudaste hasta el final con todas tus palabras y consejos y eso es muy importante para mí. Te Amo Raquel.

#### **A MI ABUELO**

JOSE LUIS CENTENO HUERTA Por todo su amor y cariño que me ha dado y sobre todo por su sabiduría y enseñanzas las cuales me han ayudado a ser una persona luchadora y perseverante. GRACIAS PAPI WICHO Te Quiero Mucho.

#### **A MIS HERMANOS**

JORGE LUIS Y MARIA LUISA GIL CENTENO Por todas las alegrías y peleas, pero sobre todo por el apoyo y confianza brindado en este proyecto, por sus consejos y por ser como son. Sé que siempre voy a contar con ustedes GRACIAS PEKE, GRACIAS FLACO los Amo.

#### **A MI FAMILIA**

RUBEN, RAUL, RAFAEL, BERTHA, SILVIA, ROMAN, CHIO, GABY, ALEX, AIVLIS, HECTOR Y XIME Por todo su apoyo, los consejos, los momentos divertidos y buenos que hemos pasado en familia pero sobre todo por su confianza y cariño incondicional. Los Quiero Mucho tíos y primos.

#### **A MI AMORCITO.**

ERIK LUNAR SALINAS Gracias hermoso por aparecer en mi vida y brindarme tu amor, paciencia, confianza, por tus palabras de aliento que me ayudaron a seguir adelante con la tesis, por no dejarme vencer y demostrarme que soy fuerte y que nada es imposible. Gracias por tus desveladas y por momentos divertidos que me hiciste pasar durante la elaboración de este proyecto. Te amo Picicoso.

#### **A MI NUEVA FAMILIA**

MANOLO, PATY, MANUEL, ABRAHAM, YESENIA, TENOCH Y TONATIUH Por brindarme su cariño, confianza además de darme sus consejos y apoyo incondicional para poder lograr mis metas. Y por todos los momentos buenos y divertidos que hemos pasado. Los Quiero Mucho.

#### **A MIS AMIGAS**

ROCIO ARZATE, MIREYA BERNAL, CARINA LOPEZ Y TANIA FIGUEROA Por aceptarme en su vida con mis defectos y virtudes, por estar conmigo en la buenas y en las malas, por todos sus consejos y regaños, por toda la diversión y sobre todo por ser como son, las Quiero Mucho viejas y siempre estarán en mi corazón.

ANGELICA SANCHEZ KARINA MIRALRIO, JACQUELINE CALDERON, ANGELICA HERNANDEZ ALEXANDRA RESENDIZ, ADRIANA LUJAN, Y ESTHER GOMEZ Por todos esos momentos felices que pasamos juntas por ser mi apoyo durante esta etapa de mi vida y nunca dejarme caer. Por escucharme y darme un consejo siempre que lo necesitaba, por todas esas aventuras vividas, por permitirme ser parte de su vida y formar una bonita familia GRACIAS por todo Amigas las Quiero Mucho.

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** Por darme la oportunidad de ser una profesionista y permitirme ser parte de ella GRACIAS.

**A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN C-4** Por acogerme y brindarme todos los conocimientos necesarios para poder formarme como profesionista, por todos los momentos gratos y desagradables que pase en sus instalaciones y sobre todo por permitirme realizar este proyecto GRACIAS.

**AL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGIA ANIMAL (CENID MICROBIOLOGIA ANIMAL DEL INIFAP)** Por prestarme sus instalaciones para poder realizar este proyecto y así permitirme a ser una profesionista GRACIAS.

#### **A MIS ASESORES**

M en C. LAURA JARAMILLO MEZA, DR. FERNANDO DÍAZ OTERO, MVZ. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ Por brindarme su confianza, apoyo y sobre todo paciencia, por compartirme todos sus conocimientos para la realización de este trabajo. Por hacerme parte de su equipo y darme su amistad y entrega incondicional, por sus consejos y regaños que me ayudaron a ser una gran profesionista. GRACIAS POR TODO.

#### **A MI SUPER EQUIPO**

EVELY-NE QUEVILLON, GABRIELA VEGA, LYSETT CORONA, XOCHITL GONZALEZ Por brindarme su amistad sin conocerme, por su confianza, apoyo, por todos los momentos felices y divertidos, por sus consejos pero sobre todo escucharme en los momentos más difíciles. Gracias por ser incondicionales y enseñarme que soy fuerte y que puedo lograr lo que me proponga. GRACIAS Amigas las Quiero Mucho.

#### **A MIS SINODALES**

MVZ. JOSÉ MARGARITO ROJO LÓPEZ, MVZ HUMBERTO GUSTAVO ARELLANO SÁNCHEZ, MC. JUAN SEBASTIÁN BARRIENTOS PADILLA, MVZ. EDNA MARIBEL LEGASPI NUEVO Por todo su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo GRACIAS.

**LA INVESTIGACIÓN SE EFECTUÓ EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA ANIMAL (CENID-MICROBIOLOGÍA-ANIMAL) DEL INIFAP, COMO PARTE DE LAS INVESTIGACIONES DEL PROYECTO:**

**“DESARROLLO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ANIMALES VACUNADOS DE INFECTADOS NATURALMENTE EN LA TUBERCULOSIS BOVINA.**



**TRABAJO PARCIALMENTE FINANCIADO CON FONDOS FISCALES 2009.**

**PROYECTO N° 3216943P**

**LAS ACTIVIDADES DE CAMPO SE REALIZARON EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

# INDICE

## Resumen

|  |    |
|--|----|
| 1.- Introducción   | 1  |
| 1.1.- Definición de la enfermedad                                    | 1  |
| 1.2.- Importancia de la Tuberculosis en los humanos                  | 1  |
| 1.3.- Importancia de la Tuberculosis bovina en la Salud Pública      | 3  |
| 1.4.- Impacto económico de la Tuberculosis bovina en la Salud Animal | 4  |
| 1.5.- Generalidades del género <i>Mycobacterium</i>                  | 6  |
| 1.5.1.- Características de la pared celular de <i>Mycobacterium</i>  | 7  |
| 1.5.2.- Características antigénicas de <i>Mycobacterium</i>          | 10 |
| 1.6.- Patología de la tuberculosis                                   | 13 |
| 1.7.- Generalidades de <i>Corynebacterium</i>                        | 15 |
| 1.8.- Pruebas de diagnóstico de la Tuberculosis bovina               | 17 |
| 1.8.1.- Intradermorreacción (Prueba de tuberculina)                  | 17 |
| 1.8.2.- Prueba de Inmuno Absorción Ligado a Enzimas (ELISA)          | 19 |
| 1.8.3.- Prueba de interferón-gamma (INF- $\gamma$ )                  | 20 |
| 1.8.4.- Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)  | 21 |
| 2.- Justificación  | 23 |

|  |    |
|--|----|
| 3.- Hipótesis  | 23 |
| 4.- Objetivo general   | 24 |
| 5.-Objetivos particulares  | 24 |
| 6.- Materiales y Métodos   | 25 |
| 6.1.- Animales de estudio  | 25 |
| 6.2.- Diseño Experimental  | 25 |
| 6.3.- Preparación de los antígenos para la inoculación de los cobayos  | 29 |
| 6.4.- Obtención de los Extractos Proteicos del Filtrado de Cultivo (EPFC)  | 30 |
| 6.5.- Preparación del extracto sonicado de <i>Corynebacterium</i>  | 31 |
| 6.6.- Pruebas de intradermorreacción   | 31 |
| 6.7.- Prueba ELISA comparativo para <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i>  | 32 |
| 6.8.- Prueba de interferón gamma (IFN- $\gamma$ )  | 33 |
| 6.9.- Extracción de exudado nasal con hisopo para obtención de muestra de <i>M. bovis</i> (ADN)  | 34 |
| 6.10.- Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)   | 35 |
| 6.11.- PCR anidada   | 36 |
| 6.12.- Análisis estadístico  | 36 |
| 7.-Resultados  | 36 |
| 7.1.- Resultados de análisis de respuesta de anticuerpos en vaquillas vacunadas contra la tuberculosis bovina para <i>M. bovis</i> y <i>C. xerosis</i> | 36 |
| 7.2.- Resultados de análisis de respuesta hacia <i>M. bovis</i> y <i>C. xerosis</i> en vacas del ható de Cuautitlán Edo. de México.                    | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 7.2.1.- Evaluación de anticuerpos   | 42 |
| 7.2.2.- Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  | 43 |
| 7.2.3.- Prueba de intradermorreacción   | 44 |
| 7.2.4.- PCR anidada   | 46 |
| 7.3.- Resultados de análisis de respuesta hacia <i>M. bovis</i> , <i>M.avium</i> y <i>C. xerosis</i> en cobayos | 49 |
| 7.3.1.- Prueba de intradermorreacción   | 49 |
| 7.3.2.- Evaluación de anticuerpos   | 55 |
| 8.-Discusión  | 56 |
| 9.- Conclusiones  | 66 |
| 10.- Anexo  | 68 |
| 10.1.- Glosario   | 68 |
| 10.2.- Soluciones   | 70 |
| 11.- Bibliografía   | 72 |

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad infecciosa crónica producida por *Mycobacterium bovis*, que se caracteriza por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos, guarda importancia por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que ocasiona a la industria pecuaria. En México las pérdidas económicas debidas a la tuberculosis bovina se calculan en más de 500 millones de pesos anuales, tan solo por el desecho de bovinos enfermos o reactivos. Dado que la enfermedad se desarrolla lentamente, un animal infectado puede diseminar la infección a otros miembros de su rebaño antes de que empiecen a manifestarse los signos clínicos, por tanto la identificación oportuna de los bovinos tuberculosos es necesaria para establecer las mejores medidas de control en los hatos. Diferentes pruebas de diagnóstico se emplean para tal propósito, no obstante éstas poseen cierto grado de inespecificidad mostrando una proporción relativamente alta de resultados falsos positivos. Por tal situación, en algunas de ellas se realizan estudios comparativos con los antígenos de *Mycobacterium avium* para diferenciar entre animales infectados por *M. bovis* y aquellos sensibilizados por exposición a micobacterias ambientales. Este tipo de sensibilización se atribuye a la reactividad cruzada entre especies de micobacterias y géneros taxonómicamente cercanos como: *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. En particular, dentro de éste último género se encuentran especies con potencial patógeno reconocido para los bovinos, como son: *C. pyogenes*, *C. bovis*, *C. renale* y *C. pseudotuberculosis*, así como especies oportunistas, tal es el caso de *C. xerosis* y *C. amycolatum*. Debido a la elevada presencia de *Corynebacterium spp.* en los bovinos, y a su estrecha relación taxonómica con el género *Mycobacterium*, se estudió la interferencia de éste género bacteriano con las principales pruebas indirectas empleadas para el diagnóstico de la TB, basadas en la respuesta inmune, en casos de infección natural y en un modelo experimental. El estudio comprendió tres fases experimentales. En la primera se evaluaron mediante ELISAs comparativos a *M. bovis*, *M. avium* y *Corynebacterium xerosis* sueros de vaquillas que en su momento se vacunaron contra la TB, y que resultaron positivos al aislamiento de *C. xerosis* en muestras de exudado nasal. En la segunda se seleccionaron vacas positivas y negativas a diferentes pruebas diagnósticas de Tuberculosis (ELISA, Tuberculina, BOVIGAM) para evaluar su reactividad o respuesta inmune a *Corynebacterium* mediante pruebas de ELISA, intradermorreacción e INF- $\gamma$ , empleando el Extracto Proteico del Filtrado de Cultivo (EPFC) de *C. xerosis*; a estos animales se les tomaron muestras de exudado nasal y de leche para determinar por un lado, la posible presencia de *Corynebacterium*, y por el otro, para confirmar la posible infección por *M. bovis*

mediante PCR. En la tercera se formaron tres grupos de cobayos con cinco animales cada uno. El grupo 1 se inoculó con el EPFC de *M. bovis*, el grupo 2 con el sonicado de una suspensión de bacterias de *C. xerosis* (SNC) y el grupo 3 permaneció como control sin inmunizar. La respuesta de los cobayos se evaluó mediante pruebas de intradermorreacción empleando para los diferentes grupos la tuberculina bovina, la tuberculina aviar y un preparado proteico de *C. xerosis* para determinar la posible reactividad cruzada entre los preparados antigénicos empleados; además se evaluó la respuesta inmune humoral mediante ELISAs comparativos utilizando el EPFC de *M. bovis*, el EPFC de *M. avium* y un sonicado de la bacteria completa de *C. xerosis*. Los resultados de los ELISAs efectuados con los sueros de cobayos muestran que solo aquellos animales inoculados con el SNC (grupo 2) desarrollaron un nivel significativo de anticuerpos a esta preparación antigénica y no mostraron anticuerpos a los antígenos del EPFC de *M. bovis* o de *M. avium*. A diferencia los cobayos inoculados con el EPFC de *M. bovis* (grupo 1) mostraron niveles de anticuerpos significativos y comparables en los tres diferentes ensayos de ELISA, señalando con ello que en el EPFC de *M. bovis* además de estar presentes antígenos específicos de la especie, también hay un número importante de antígenos comunes a géneros bacterianos taxonómicamente relacionados. En tanto que, en la evaluación de las pruebas intradérmicas se observó que en los cobayos del grupo 2 reaccionan fuertemente al propio SNC, además del PPD de *M. avium* y del de *M. bovis*; mientras que los del grupo 1 reaccionan fuertemente al Derivado Proteico Purificado (PPD) bovis, y en menor grado también al PPD avium pero no a las preparaciones de *Corynebacterium*. Los resultados de intradermorreacción utilizando las preparaciones de *Corynebacterium* que se realizaron en vacas reactivas a la tuberculina pero negativas al aislamiento de *Corynebacterium* tampoco indujeron la hipersensibilidad tardía (HT). De acuerdo a los resultados la presencia o infección de *Corynebacterium spp.* no tiene influencia sobre las pruebas de diagnóstico tradicionalmente empleadas para identificar un bovino tuberculoso; sin embargo, la presencia o infección por *Mycobacterium bovis* si puede influir en las pruebas diagnósticas que se empleen para aquellas enfermedades producidas por *Corynebacterium* basadas en la respuesta inmune.

## **1. Introducción**

### **1.1. Definición de la enfermedad**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, crónica y progresiva que se caracteriza por la presencia de lesiones granulomatosas o tubérculos principalmente en linfonodos del sistema respiratorio y pulmón, pero puede extenderse o presentarse en órganos del sistema digestivo, reproductivo y nervioso. La enfermedad es producida por especies del género *Mycobacterium*, pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, siendo *M. tuberculosis* la especie representativa causante de la enfermedad en el humano; mientras que, en el ganado bovino y en otras especies animales domésticas y de vida silvestre la enfermedad es producida esencialmente por *M. bovis*.<sup>(1, 2)</sup>

### **1.2. Importancia de la tuberculosis en los humanos.**

Desde el siglo pasado, la tuberculosis se identificó como una enfermedad de índole social vinculada con la pobreza, por ende con las malas condiciones de vida y de trabajo. Aunque se trata de una enfermedad infecciosa controlable en el ámbito comunitario y curable de forma individual, dista mucho de poder erradicarse. Hoy en día continúa siendo el proceso infeccioso más importante en el mundo, debido a que su incidencia se ha incrementado más que haberse controlado, entre otras causas, por la aparición de cepas resistentes de *M. tuberculosis* y a la epidemia del SIDA. Se considera, según datos de la OMS, que al menos un tercio de la población mundial está infectada, y que anualmente aparecen cerca de 10 millones de nuevos casos; por lo cual se estima en más de 30 millones el número de personas tuberculosas y en más de 3 millones las que podrían morir a causa de la enfermedad. Por consiguiente, se considera dentro de las principales enfermedades infecciosas con mayor mortalidad, al diagnosticarse

en 7 de cada 100 decesos en el mundo; no obstante el 99 % de estas muertes ocurre en países subdesarrollados, y afecta sobre todo a los adultos jóvenes en su edad más productiva <sup>(3)</sup>.

Las circunstancias que favorecen la enfermedad son complejas, y son resultado de la interacción de factores medioambientales, socioeconómicos, culturales, demográficos; así como de características propias inherentes del individuo, como son: edad, raza, estado de nutrición e inmunológico, enfermedades intercurrentes, etc., e indiscutiblemente de la capacidad patógena del bacilo tuberculoso involucrado en el proceso. <sup>(4,5)</sup>

Debido a ello, los estados de inmunosupresión, como son los ligados a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la presencia de enfermedades concurrentes, como la diabetes *mellitus*, la desnutrición, la sobrepoblación, y la falta de recursos para enfrentar la enfermedad hacen difícil la solución de este problema. Como referencia en 2009, murieron de tuberculosis 1,7 millones de personas, de éstas 380 000 estaban infectadas con VIH; el mayor número de defunciones se registraron en la Región de África, donde el VIH ha provocado un rápido incremento de la epidemia de tuberculosis. <sup>(6,7)</sup>

En la República Mexicana el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE) en el año 2011 registró 19,445 casos de tuberculosis en todas sus formas clínicas <sup>(8)</sup> con una tasa de 16.03 por cada 100 mil habitantes. Del total de casos notificados 14,281 correspondieron a tuberculosis pulmonar. La dependencia informó que las incidencias más altas se registraron en los Estados de occidente y Golfo de México, mientras que las incidencias más bajas se presentaron en los Estados del centro. Cabe señalar que Tamaulipas y Baja California duplican la tasa nacional, y junto con Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua concentran 70% de los casos identificados en el país. <sup>(9,10)</sup>

### **1.3. Importancia de la tuberculosis bovina en Salud pública.**

Como se comentó antes, *M. tuberculosis* es el principal agente patógeno de la tuberculosis en humanos, sin embargo, la transmisión zoonótica de animales al humano por *M. bovis* es de gran impacto en salud pública; pese a que los datos de infección son variables y dispersos se estima que la especie es responsable de entre el 5 y el 10% de los casos en los humanos; no obstante la cifra puede ser mayor, debido a la inexactitud del diagnóstico que se realiza en los centros de salud; pues este comúnmente se realiza a partir de una baciloscopía, sin definir la especie micobacteria involucrada, debido a la necesidad de iniciar el tratamiento. Además las lesiones entre ambas especies son clínica y radiológicamente indistinguibles. Para lograr un diagnóstico asertivo se debe realizar el aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas y/o técnicas moleculares que permitan la tipificación de las especies.

El modo más común de transmisión de *M. bovis* al hombre puede ser por el consumo de leche cruda infectada o subproductos lácteos fabricados con leche infectada sin pasteurizar, produciendo linfadenopatías cervicales o lesiones a nivel intestinal y/o en la piel. <sup>(11)</sup>

Cuando la transmisión ocurre por inhalación de aerosoles, a partir de ganado enfermo, se asume que la infección primaria ocurrirá a nivel pulmonar con posibilidad de diseminación a órganos distantes. Otra forma de infección frecuente sobre todo en los rastros es por inoculación traumática durante la manipulación de canales infectados, causando lesiones en piel.

En los últimos años, la incidencia de tuberculosis humana por *M. bovis* ha disminuido en países desarrollados como resultado de buenas campañas de erradicación de la tuberculosis en los bovinos y de la pasteurización de la leche de consumo.

Por el contrario, en países en vías de desarrollo no existen programas intensos de pasteurización por lo que la presencia de la enfermedad en hatos lecheros representa un riesgo considerable de salud pública <sup>(12)</sup>. Así se ha observado existe correlación entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado y la prevalencia en humanos. <sup>(13)</sup>

En México, el riesgo se explica por la elevada prevalencia de la enfermedad en ganado de leche, y la falta de participación de un alto porcentaje de los establos en la campaña de erradicación. Además se estima que solo el 70 % de la producción de leche del país se pasteuriza; lo demás, se consume directamente o se transforma en derivados lácteos sin pasar por el proceso, lo que señala un riesgo latente de infección al humano, debido a ello existe interés por diseñar nuevas estrategias de control y erradicación de la enfermedad a través de métodos modernos de diagnóstico. <sup>(14,15,16)</sup>

#### **1.4. Impacto económico de la tuberculosis bovina en Salud Animal.**

La enfermedad tiene serias implicaciones económicas, aparte de las pérdidas directas por la muerte de los animales, es responsable de bajas en la producción de leche, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia. Debido a estos retrasos los animales que se tienen programados para que su primer parto lo tengan a los 2 años, el retraso en el desarrollo ocasiona que estén presentando su primer parto alrededor de los 36 meses de edad, dado que no se alcanza el peso adecuado (330-360 kg en raza Holstein Friesian) para su primera inseminación. La presencia de la enfermedad en los hatos reduce la fertilidad en un 6% y es causa el decomiso de canales en rastros.<sup>(17)</sup> Así las pérdidas económicas tan solo por el desecho de bovinos enfermos o reactores se calculan en más de 500 millones de pesos anuales en nuestro país.

Las pérdidas también se relacionan con el comercio interior y exterior, para tener idea de la problemática asociada con la enfermedad cabe mencionar que México exporta anualmente un promedio 1,2 millones de terneros a los Estados Unidos Americanos; no obstante, esta actividad se ha afectado en los últimos años ya que representa una barrera no arancelaria que se sujeta o relaciona con la prevalencia de tuberculosis en los diferentes Estados del país, es decir, sólo los Estados libres de TB están autorizados para exportar animales (Figura 1). <sup>(18)</sup>

**NOM-031-ZOO-1995**  
**Campana Nacional contra la Tuberculosis Bovina**  
2010



**Figura 1** Mapa de la Republica Mexicana donde muestra estados libres y control contra la TB. <sup>(19)</sup>

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 más bajos de prevalencia para ganado de carne en el norte del país (< 0.50%); en tanto que, los más altos se registran en ganado de leche principalmente en hatos localizados en el centro y sur de la República Mexicana (16.5%).<sup>(20)</sup> La razón por la que la prevalencia de la enfermedad es mayor en ganado lechero que en ganado de carne, se debe a que su vida útil es más prologada y el manejo de los animales es predominantemente estabulado o semiestabulado por tanto la densidad de población es mayor y el riesgo de adquirir infecciones por el contacto directo vaca-vaca se incrementa.<sup>(12)</sup>

La enfermedad es contagiosa y se propaga principalmente por contacto directo vía inhalación de aerosoles procedentes de los pulmones de animales infectados sin embargo, las becerras pueden infectarse al ingerir leche cruda de vacas tuberculosas.<sup>(21)</sup> Dado que la enfermedad se desarrolla lentamente, un animal puede diseminar la infección a otros miembros de su rebaño antes de que empiecen a manifestarse los signos clínicos; por tanto, el desplazamiento de animales domésticos infectados no detectados y el contacto con mamíferos de vida libre (zorros, coyotes, búfalos, alces y venados) infectados, son las principales formas de propagación.<sup>(22)</sup>

### **1.5. Generalidades del género *Mycobacterium***

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos rectos de 3 a 5 µm de longitud o ligeramente curvos en forma de maza, inmóviles, no esporulados, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes (cristal violeta), pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido. Se destaca en su

estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%). El contenido de bases de guanina más citocina en la molécula de ADN es de 62 a 70 moles %. <sup>(23)</sup>

El género incluye más de cien especies que se dividen en cuatro grupos para fines de estudio: El Complejo tuberculosis, formado por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. canettii*. <sup>(24)</sup> El Complejo *leprae*, que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murium*.

El Complejo avium que incluye a las especies *M. intracellulare* y *M. avium*, esta última dividida en cuatro subespecies: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *M. avium* subsp. *hominissuis*; En el cuarto grupo se incluyen micobacterias atípicas. <sup>(25)</sup>

Las especies pertenecientes al Complejo tuberculosis se caracterizan por ser microorganismos intracelulares obligados, aerobios, inmóviles, que se replican dentro de los fagosomas de los macrófagos. La temperatura óptima de crecimiento de estas especies es de 37°C con un rango entre 30 y 42°C; y su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la mayoría de las bacterias. *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. <sup>(26)</sup> Las formas saprófitas desarrollan con mayor rapidez, proliferan a 22° C, producen más pigmento y son menos ácido-resistentes que las formas patógenas. <sup>(27)</sup>

### **1.5.1. Características de la pared celular de *Mycobacterium***

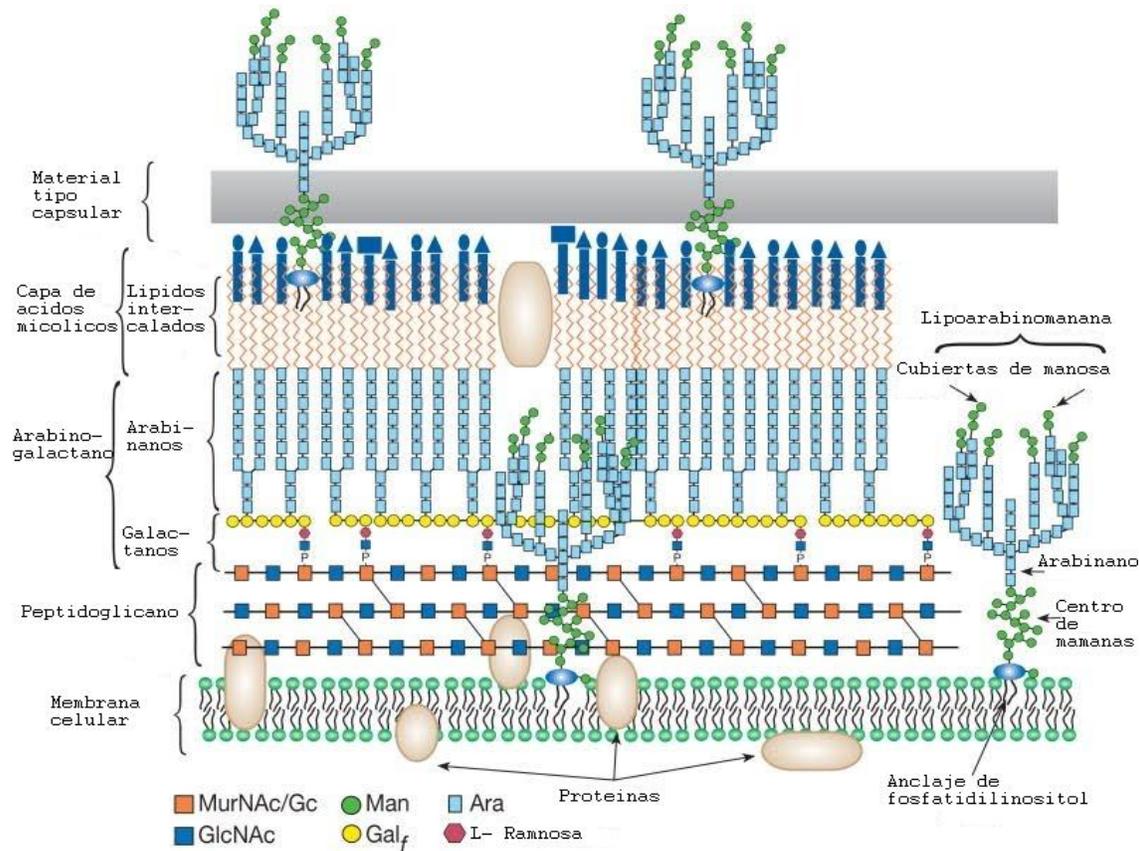
De manera general se conoce que la envoltura bacteriana provee protección y soporte a las bacterias; además de poseer mecanismos que permiten el intercambio de sustancias entre la bacteria y el medio ambiente. En el caso de las micobacterias esta envoltura muestra diferencias estructurales entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La envoltura micobacteriana no presenta la membrana externa característica de los organismos Gram-negativos y aunque

posee peptidoglicano como las bacterias Gram positivas, las moléculas unidas o asociadas a este polímero son, en las micobacterias, fundamentalmente de naturaleza lipídica en vez de proteínas y lipopolisacáridos, como en aquellas. <sup>(23)</sup>

La envoltura consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y, alrededor de ella, la pared celular. La primera le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección. La pared celular está constituida por tres capas, que por tinciones convencionales pueden apreciarse, estas son:

- Capa interna, moderadamente electrón-densa, compuesta por el peptidoglicano cuya estructura es similar a la de las bacterias Gram positivas.
- Capa media, más ancha que la anterior y electrón-transparente, compuesta por el polisacárido arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las micobacterias (70-90 átomos de carbono).
- Capa externa, de grosor variable electrón-opaca, de la cual no puede conocerse con las técnicas actuales, su exacta composición, aunque se le atribuye una estructura glucolípida (Figura 2). <sup>(28)</sup>

## ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE *Mycobacterium*



**Figura 2** Estructura de la pared celular de las Micobacterias por capas<sup>(29)</sup>

Químicamente la pared celular de la bacteria está 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-glicolilmurámico), 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).<sup>(28)</sup>

Otro grupo importante de componentes de la pared celular son los sulfatos de acil trehalosa, involucrados en la inhibición de la fusión fago-lisosoma, se les asocia con la capacidad de virulencia de *M. tuberculosis*.<sup>(30)</sup> La segunda molécula que domina la envoltura de las micobacterias, es el polisacárido lipoarabinomano (LAM), formado por residuos de D-arabinosa y D-manosa. El LAM exhibe un amplio espectro de funciones inmunoregulatorias, 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- $\gamma$ , 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.<sup>(31)</sup>

Además de los componentes anteriores existen proteínas asociadas a la pared, algunas con función enzimática, necesarias para la construcción y reconstrucción de los polímeros de la pared durante el proceso de división celular y crecimiento; otras recientemente descubiertas poseen función de porina. Estas últimas, encontradas en bajo número, lo que está de acuerdo con la baja permeabilidad de las micobacterias a las moléculas hidrofílicas.<sup>(23)</sup>

### **1.5.2. Características antigénicas de *Mycobacterium***

Los principales antígenos de las micobacterias pueden dividirse en dos grandes grupos:

- Los solubles citoplasmáticos.
- Los insolubles ligados a la pared celular.

En relación a la naturaleza de los antígenos solubles, se sabe que hay:

- a) De naturaleza polisacárida, comunes a todas las micobacterias y constituidos por arabinomananos, arabinogalactanos, glucanos.
- b) Lipídica, los monóxidos de fosfatidil inositol (PIM) constituyen una familia de lípidos polares que se encuentran presentes en la membrana plasmática de las micobacterias. Entre ellos podemos citar los glicolípidos fenólicos, bastante específicos para *M. tuberculosis* (PGL-Tbl). Otros como el fenoltiocerol que se une con el Ac micocerósico para formar el factor de virulencia fenoltiocerol-dimicocerato (PDIM).
- c) Las proteínas del *Mycobacterium* son las que le confieren sus principales propiedades antigénicas; actualmente más de 1000 proteínas han sido identificadas, pero solo alrededor de ciento cincuenta han sido bien caracterizadas.

Para su estudio se han agrupado en cuatro grupos de acuerdo a su función, secuencia y características físicoquímicas:

El primer grupo formado por proteínas de stress térmico (hsp, del inglés heat shock protein), son un grupo de polipéptidos esencialmente citoplasmáticos, que incrementan su síntesis frente a estímulos estresantes como los cambios en la temperatura, el incremento de daño oxidativo y la disminución de nutrientes; esta respuesta probablemente proteja a la micobacteria durante situaciones adversas, manteniendo la conformación funcional de proteínas esenciales y asistiendo en la reducción de proteínas desnaturalizadas. Se agrupan en familias dependiendo del peso molecular: hsp65 kDa o GroEL, hsp 10 kDa o GroES, hsp 70 kDa o ADNK, hsp 90 kDa, hsp 16 kDa entre otras. <sup>(32)</sup>

El segundo grupo son las lipoproteínas, incluye a las de 19 kDa, 26 kDa, 27 kDa y 38 kDa, fundamentalmente constitutivas de la pared celular pero pueden ser encontradas en el citoplasma, las de 19 y 38 kDa son las más importantes. Se considera que estas lipoproteínas están involucradas en la inducción de respuestas humoral y celular, en especial de la respuesta de las células T de memoria *in vitro*, y tienen un papel funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared celular. <sup>(33)</sup>

Un tercer grupo son las proteínas de secreción constituidas principalmente por proteínas de 12, 16, 19, 23, 26, 27, 30, 31, 31.5 y 41 kDa, algunas de éstas forman el complejo 85 que es el mayor constituyente del sobrenadante de los cultivos del *Mycobacterium tuberculosis*.

El último grupo está constituido por las enzimas, la L-alanina deshidrogenasa de 40 kDa y la superóxido dismutasa de 23 kDa, que están involucradas en los mecanismos de defensa del bacilo dentro de los macrófagos. <sup>(34, 35)</sup> El 35 % de los antígenos secretados por *M. tuberculosis*, está 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 estererasas. 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 está involucrada en la interacción con las células del hospedero facilitando los mecanismos de invasión celular. <sup>(36)</sup>

Estudiando los antígenos en doble difusión en gel se han establecido 4 grandes grupos con mayor o menor especificidad:

- a) Grupo I compuesto de antígenos comunes compartidos por todas las micobacterias e incluso algún otro género bacteriano como *Nocardia* y *Corynebacterium*.
- b) Grupo II serían antígenos propios de las micobacterias de crecimiento lento.
- c) Grupo III lo formarían antígenos de micobacterias de crecimiento rápido y nocardias.
- d) Grupo IV constituido por antígenos propios de cada especie. <sup>(37)</sup>

## 1.6. Patología de la tuberculosis

En la mayoría de los casos de campo, la enfermedad se observa en las vías respiratorias inferiores (VRS), principalmente en los pulmones y ganglios linfáticos asociados. Sin embargo, el tracto respiratorio superior (TRS) y los tejidos también pueden mostrar la enfermedad en un número significativo de casos. <sup>(38)</sup> Una vez que los microorganismos han alcanzado el tejido del hospedero en este caso el alveolo o los alveolos pulmonares, se desencadena una reacción inflamatoria inespecífica con exudación de polimorfonucleares y presencia de macrófagos (conocidos también como monocitos tipo II (macrófagos alveolares)) que fagocitan a los bacilos, sin embargo, éstos no mueren y se multiplican intracelularmente.

Este fenómeno inicialmente intra-alveolar puede tener lugar en linfonodos regionales y/o distantes y en otros órganos al ser transportados los bacilos por vía sanguínea, linfática, libremente o contenidos dentro de los macrófagos. En cualquiera de los lugares mencionados, con la fagocitosis de los bacilos por los macrófagos, se desencadena una respuesta inmune celular.

La información obtenida producto de la fagocitosis es transmitida por el macrófago inactivo a un linfocito T o B. Si la información es recibida por un linfocito B, éste se activa diferenciándose a células B memoria y células plasmáticas. Estas últimas sintetizan anticuerpos, los que facilitan la opsonización de los bacilos por los polimorfonucleares, los que tampoco pueden detener la proliferación de los bacilos al igual que los macrófagos inactivos como se mencionó.

Por otro lado, si la información obtenida de la fagocitosis del bacilo por el macrófago es transmitida a un linfocito T, éste al activarse se diferencia en células T memoria y células T productoras de diferentes sustancias conocidas como citocinas. Las citocinas activan a los macrófagos inactivos haciendo que éstos adquieran una morfología diferente por lo que ahora se les conoce como células epiteloideas, ya que cuando se encuentran agrupadas conforman un granuloma, que impide la proliferación intracitoplasmática de los microorganismos.

La colección organizada de macrófagos se conoce como granuloma. Cuando éste está conformado por macrófagos activados se conoce como un granuloma epiteloide. La fusión de las células epiteloideas, cuando ocurre, origina la formación de células gigantes multinucleadas, como la de Langhans, asociada clásicamente con el granuloma tuberculoso, en la cual los núcleos se disponen periféricamente.

El granuloma de origen tuberculoso (conocido también como tubérculo), por lo general presenta necrosis caseosa lo que lo distingue de otros granulomas no caseificantes. <sup>(39)</sup>

### 1.7. Generalidades de *Corynebacterium*.

Las corinebacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose: en suelo, agua, productos alimenticios y también en la mucosa y piel del hombre y animales. Son bacilos rectos ligeramente curvados, Gram positivos que miden de 3-6  $\mu\text{m}$ ; al agruparse adoptan una disposición típica en empalizada o con aspecto de letras chinas, no presentan motilidad, son catalasa positiva, anaerobias facultativas.<sup>(40)</sup> No poseen cápsula, no esporulan y son parcialmente ácido- alcohol resistentes. Las colonias en medio cistina-telurito son negro-grisáceas o gris metálico.<sup>(41)</sup> Forma colonias pequeñas grisáceas de aspecto granuloso, traslúcidas con centros opacos, y bordes convexos.<sup>(40)</sup> Poseen un gran contenido de guanina mas citosina (G+C). Se clasifican en no lipofílicas o lipofílicas, según si su crecimiento aumenta con la adición de lípidos al medio de cultivo. Las corinebacterias crecen de forma lenta en agar de sangre de carnero y producen colonias <0.5 mm de diámetro después de 24 h de incubación.<sup>(42)</sup>

La pared celular de *Corynebacterium* presenta elementos únicos en su género y tiene un alto contenido de lípidos, de los cuales el más notable es el ácido micólico. También contiene ácido meso-diaminopimélico así como polisacáridos como arabinosa, galactosa y algunos tipos de manosa. Sobre la base del contenido lipídico en la pared celular, las corinebacterias se agrupan junto a las micobacterias, nocardias y rodococos, dentro del grupo denominado "CMNR" por la similitud química y estructural de sus componentes lipídicos de la pared celular; de los cuales el más estudiado es el ácido micólico por la importancia que tiene en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* a diferencia de los otros tres componentes del grupo, el ácido micólico de *Corynebacterium spp* contiene cadenas de 22-36 átomos de carbono, y las cadenas que los constituyen son del tipo saturadas y monosaturadas, siendo las mayores el ácido hexadecenoico y hexadecanoico.<sup>(43, 44)</sup>

En particular, dentro del género *Corynebacterium* se encuentran especies con potencial patógeno reconocido para los bovinos, como son: *C. pyogenes*, *C. bovis*, *C. renale* y *C. pseudotuberculosis*, las cuales pueden producir infecciones en el aparato genitourinario, pielonefritis, mastitis, neumonías, problemas de piel, etc. Mientras que, especies del género habitualmente consideradas parte de la flora normal de esta especie animal actualmente han mostrado su potencial patogénico, tal es el caso de *C. xerosis* y *C. amycolatum*.<sup>(45,46)</sup>

### ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR DE *Corynebacterium*

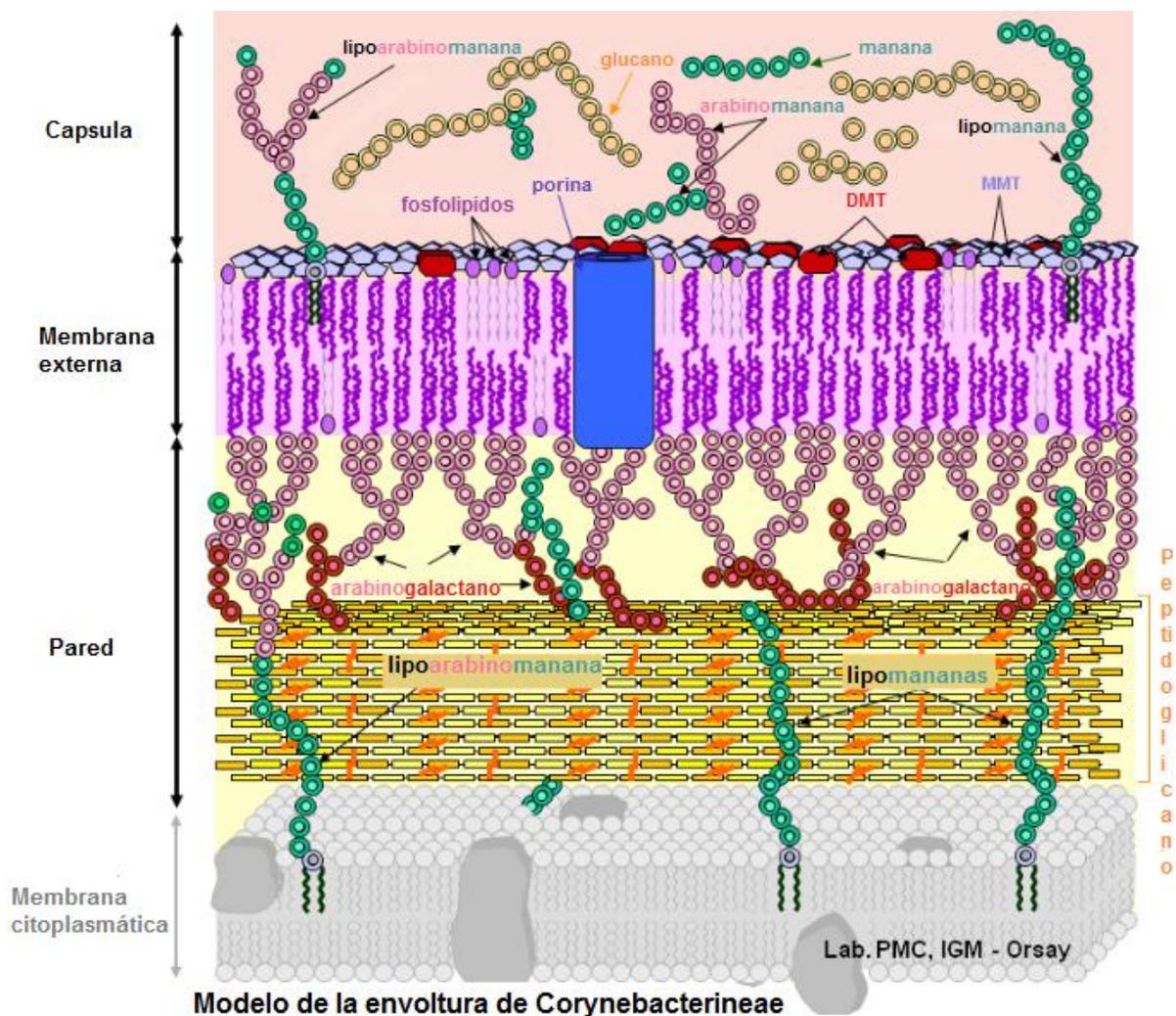


Figura 3. Estructura de la pared celular de las Corynebacterias por capas.<sup>(47)</sup>

## **1.8. Pruebas de diagnóstico de la Tuberculosis bovina**

### **1.8.1. Intradermorreacción (Prueba de tuberculina)**

Para el diagnóstico de rutina en campo la campaña contra la TB y de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995 recomienda la prueba intradérmica de la tuberculina (ID) o prueba de hipersensibilidad retardada en la que se emplea el derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis* <sup>(48)</sup>. El PPD es una preparación líquida que contiene un extracto peptídico de proteínas estructurales y de secreción producidas durante el cultivo de la micobacteria en medio sintético. El extracto se obtiene por precipitación de las proteínas luego del calentamiento y filtración del cultivo. Esta fracción proteica es capaz de desencadenar una reacción local (hipersensibilidad retardada tipo IV) en animales que han tenido contacto previo con el bacilo mediante la infección natural o artificial. <sup>(49)</sup> Muchos de los antígenos que derivan de *M. bovis* se encuentran también en especies de micobacterias ambientales no patógenas, lo que da lugar a problemas de sensibilización y especificidad de la prueba.

Por esta razón, la modalidad de en la tuberculina está incluido *M. avium* en el comparativo de la prueba y la interpretación se basa observando y registrando un aumento de grosor de la piel después de la inyección intradérmica de tuberculina bovina (PPD-bovino) que es mayor que la observada con tuberculina aviar (PPD aviar) <sup>(50)</sup>.

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, quimiocinas 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. <sup>(51)</sup>

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. <sup>(52)</sup>

Cuando se requiere mayor sensibilidad, como en casos de alta prevalencia, se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia), se utiliza la doble comparativa en el cuello. No obstante, como todas las pruebas de diagnóstico, la prueba de tuberculina tiene fallas. La simple caudal tiene sensibilidad de 72% al 91% y especificidad del 78% al 96%.

Los diagnósticos falsos positivos generan problemas económicos y sociales, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana, los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar. <sup>(53)</sup>

La razones de la incapacidad de la prueba tuberculina para detectar estas infecciones no son claras. Es posible que algunos animales se encuentren en una fase temprana de la infección y aún no han montado una respuesta de células mediadas lo suficientemente intensa que se puede detectar en el momento de la prueba, entre dos y tres semanas posinfección. en la mayoría de los casos. Otros animales pueden ser "anérgicos" porque son incapaces de montar una respuesta adecuada o la progresión hacia el estado de enfermedad ha sido rápida y ha dado lugar a la inmunosupresión de la respuesta celular. <sup>(45,54)</sup>

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. <sup>(52)</sup>

### **1.8.2. Ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

Es una técnica indirecta para la detección de anticuerpos específicos del suero a los antígenos específicos que cubren las paredes de los pozos de la placa. Después de la incubación y del lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, los anticuerpos que se unieron a los antígenos se pueden detectar agregando una antiglobulina (inmunosorbente) ligada químicamente a una enzima. Este complejo se une a los anticuerpos y, después de la incubación y del lavado, se detecta y mide con sólo agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligado a la enzima que se haya captado, la cual, a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está analizando. La intensidad del color se estima a simple vista o, a un mejor, mediante espectrofotometría. <sup>(51)</sup>

La evaluación *in vitro* de la respuesta inmune es actualmente un campo que brinda buenas alternativas para complementar el diagnóstico de la TB. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) ha sido utilizado para detectar anticuerpos en el suero contra los antígenos de *M. bovis*. Para la ELISA se han utilizado diferentes antígenos, tales como el PPD, el filtrado de cultivo, así como antígenos purificados, ya sean nativos o recombinantes. <sup>(45)</sup> 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. <sup>(55)</sup>

Teniendo en cuenta los posibles problemas asociados con la sensibilización del ganado por micobacterias no patógenas, éstas pueden tener un impacto sobre el diagnóstico preciso de infección de *M. bovis*; debido a ello, en los últimos años se han realizado investigaciones relacionadas con la evaluación de antígenos purificados muy específicos como marcadores de diagnóstico.<sup>(45)</sup> El antígeno inmuno-dominante ESAT-6 atrajo la atención en particular, porque, aunque el gen ESAT-6 está presente en *M. tuberculosis* y *M. bovis* virulenta, está ausente en *M. bovis* BCG y micobacterias ambientales.<sup>(56)</sup>

### **1.8.3. Prueba de detección de interferón-gamma (INF- $\gamma$ )**

La inmunidad celular hacia la micobacteria puede medirse *in vitro*, mediante la cuantificación del interferón gamma (INF- $\gamma$ ) liberado por las células T sensibilizadas después de la estimulación *in vitro* por antígenos específicos, comúnmente se emplean como antígenos, los PPD bovino y aviar. La producción de INF- $\gamma$  se cuantifica mediante un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich empleando anticuerpos monoclonales, empleando para el efecto un sistema comercial denominado BOVIGAM (Bovine Gamma Interferón Test).<sup>(57)</sup>

El uso estratégico de la prueba de interferón gamma (BOVIGAM) proporciona un medio para la identificación de bovinos infectados por *Mycobacterium bovis* en fase temprana, lo que garantiza su eliminación de un rebaño infectado.<sup>(44)</sup>

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%.<sup>(58)</sup>

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 IFN- $\gamma$  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. <sup>(45)</sup> En estudios experimentales, esta prueba ha mostrado detectar ganado infectado con *M. bovis* hasta 14 días pos infección. <sup>(50)</sup>

#### **1.8.4. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Por otra parte, la biología molecular ha desarrollado herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento. <sup>(45)</sup>

Además ha sido aplicado con éxito para la detección de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y es especialmente útil para la detección directa de *M. bovis* en muestras de tejido de la especie bovina. <sup>(59)</sup>

La metodología consiste, primeramente en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo mediante reacción en cadena de la polimerasa, es decir, la PCR propiamente dicha. Finalmente se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. <sup>(60)</sup>

Una PCR que tiene como blanco el gen que codifica la proteína MPB70, se considera específica para *M. bovis*.<sup>(61)</sup> Una sola copia de este gen está presente en cepas de *M. bovis* y otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, pero ausente en otras 24 especies y otros géneros bacterianos. La PCR MPB70 ha mostrado una sensibilidad del 85 a 91 % y una especificidad del 77 a 86 % a partir de lesiones sugestivas y de aislamientos.<sup>(62)</sup>

## **2. Justificación**

Debido a que diferentes especies del género de *Corynebacterium* pueden colonizar o infectar a los bovinos en algún momento de su etapa productiva, y de la estrecha relación taxonómica de este género bacteriano con *Mycobacterium bovis*, agente causal de la tuberculosis bovina, existe una fuerte probabilidad de que la respuesta inmune que se desarrolla en bovinos infectados con *Corynebacterium spp* interfiera con las pruebas diagnosticas comúnmente empleadas para identificar animales tuberculosos arrojando resultados falsos positivos.

## **3. Hipótesis**

La presencia de *Corynebacterium spp* en bovinos colonizados alterará el resultado de las pruebas de tuberculina, BOVIGAM y ELISA empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

#### **4. Objetivo general**

Determinar la interferencia que tiene la presencia de *Corynebacterium spp* en el diagnóstico de la Tuberculosis bovina basado en la respuesta inmune, en casos de infección natural y en un modelo experimental de infección

#### **5. Objetivos particulares**

- 1) Comprobar si se presenta una respuesta falso positiva en animales infectados y coinfectados con *Corynebacterium xerosis* y *Mycobacterium bovis* en las principales pruebas diagnósticas indirectas para la tuberculosis bovina.
- 2) Examinar la reactividad cruzada entre *Mycobacterium bovis* y *Corynebacterium xerosis* en cobayos inoculados con extractos proteicos de cultivo de estos microorganismos en las pruebas de ELISA y tuberculina.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Animales de estudio**

1.- 24 Becerras Holstein Friesian de 8-16 meses de edad de Celaya Gto. Utilizadas para estudio de vacunación contra la tuberculosis bovina.

2.- 22 Vacas Holstein Friesian en producción del hato lechero de Cuautitlán Edo. de México , reactoras a la prueba de la tuberculina doble comparativa.

3.- 15 Cobayos hembras de cepa Dunkin-Hartley de 4 meses de edad, utilizados para el análisis de reactividad cruzada entre *Mycobacterium bovis* y *Corynebacterium xerosis*. Protocolo evaluado por el CICUAE de FES-Cuautitlán.

### **6.2. Diseño experimental**

Para definir la influencia que tiene la presencia de *Corynebacterium spp* en las pruebas que comúnmente se emplean para el diagnóstico de la tuberculosis bovina: tuberculina, BOVIGAM y ELISA, se realizaron tres estudios independientes.

En el primero se utilizó una colección de sueros obtenidos de grupos de vaquillas que en el 2003 se vacunaron contra la TB y del grupo control sin vacunar para evaluar reacciones cruzadas mediante ELISA, debido a que durante el seguimiento de la respuesta inmune inducido por la vacunación el 55% de las vaquillas resultaron positivas al aislamiento bacteriológico de *C. xerosis* a partir de muestras de exudado nasal, bajo estas circunstancias fue necesario definir la influencia de la colonización por *C. xerosis* en la respuesta inmune hacia *M. bovis* en los animales vacunados.

El diseño experimental para el estudio de vacunación fue el siguiente: se utilizaron un total de 24 becerras Holstein Friesian de 8-16 meses de edad, las cuales se dividieron al azar en cuatro grupos de seis animales cada uno, y alojaron en corrales de aislamiento del CENID-Microbiología Animal del INIFAP durante el periodo experimental.

- El grupo I se inmunizó con  $1 \times 10^6$  UFC/ml de BCG cepa danesa de *M. bovis*, vía intradérmica. De acuerdo a estudios realizados por Skinner et al. (63)
- El grupo II se inoculó subcutáneamente en la tabla del cuello con 300  $\mu$ g del EPFC.
- El grupo III se inoculó subcutáneamente en la tabla del cuello con 300  $\mu$ g del EPFC pero dos días antes de la vacunación recibieron 200 mg de IFN- $\gamma$  bovino recombinante vía subcutánea.
- El grupo IV, control se inoculó 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  $1 \times 10^4$  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. La respuesta celular se monitoreo con la prueba de IFN- $\gamma$ , a través de los diferentes muestreos evaluando la producción de IFN- $\gamma$  inducido en cultivos de sangre estimulados con el PPD bovino y el PPD aviar (64,65)

La respuesta de anticuerpos de las vaquillas se evaluó el día 0 antes de la vacunación y en las semanas 9 y 18 después de ésta, mediante ELISA (ensayos inmunoenzimáticos) comparativos empleando como antígeno el EPFC de *M. bovis*, el EPFC de *M. avium* y el antígeno sonicado de *Corynebacterium xerosis*. En el segundo estudio se analizó el hato bovino de Cuautitlán Edo. de México cuya prevalencia de tuberculosis era del 28% de acuerdo a la prueba cervical doble comparativa (PCC), todos los animales se muestrearon en dos ocasiones con una diferencia de ocho meses entre uno y otro, para determinar anticuerpos a *M. bovis* mediante ELISAs comparativas empleando el EPFC de *M. bovis* y el de *M. avium*; al mismo tiempo los sueros se evaluaron con otro ensayo de ELISA usando un antígeno sonicado de *C. xerosis*, para determinar la posible reactividad cruzada.

Con los resultados de tuberculina y ELISA se seleccionaron primeramente 18 animales para evaluar la producción de IFN- $\gamma$  al PPD bovino, PPD aviar, al sonicado de *C. xerosis*.

Al realizar el segundo muestreo se seleccionaron aleatoriamente 22 animales para determinar la hipersensibilidad tardía al sonicado de *C. xerosis*, y de ellos se obtuvo sangre heparinizada para evaluar la producción de IFN- $\gamma$  inducido en cultivos de células estimulados con los antígenos PPD bovino, PPD aviar y el sonicado de *C. xerosis*, además se intentó el aislamiento bacteriológico de *Corynebacterium spp* en muestras de exudado nasal, y en éstos se aplicó una prueba de PCR simple y PCR anidada para determinar la presencia de *M. bovis* a fin de identificar posibles infecciones o coinfecciones por estos microorganismos en los animales.

En un tercer muestreo realizado al año y medio del primero se seleccionaron 16 animales para realizar el procedimiento descrito anteriormente y así confirmar la especificidad de las pruebas empleadas en el análisis.

En el tercer estudio se examinó la reactividad cruzada entre *M. bovis* y *C. xerosis* evaluando la respuesta inmune en grupos de cobayos inoculados con preparaciones antigénicas de estos microorganismos en las pruebas de ELISA y tuberculina.

Para lo cual se emplearon 15 cobayos hembras de raza americana, de cuatro meses de edad con los que se formaron tres grupos de cinco cobayos cada uno.

El grupo 1 se inoculó con el extracto sonicado de *C. xerosis*

El grupo 2 se inoculó con el EPFC de *M. bovis*

El grupo 3 se le inoculó PBS estéril como control

Se realizaron dos inoculaciones empleando el antígeno correspondiente con adyuvante incompleto de Freud y una con el antígeno correspondiente solo. Las inoculaciones se realizaron con un intervalo de 7 y 21 días después de la primera inoculación (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Esquema de inoculaciones aplicado al modelo experimental de cobayos

| Grupo | Inoculaciones | Vía de inoculación | Antígeno                           | Volumen |
|-------|---------------|--------------------|------------------------------------|---------|
| 1     | Dos           | Intramuscular      | Sonicado de <i>C. xerosis</i> + AI | 1 ml    |
|       | Una           | Intramuscular      | Sonicado de <i>C. xerosis</i>      | 1 ml    |
| 2     | Dos           | Intramuscular      | EPFC+AI                            | 1 ml    |
|       | Una           | Intramuscular      | EPFC                               | 1 ml    |
| 3     | Tres          | Intramuscular      | PBS Estéril                        | 1 ml    |

EPFC: extracto purificado de filtrado de cultivo de *M. bovis*; AI: adyuvante incompleto de Freud

### 6.3. Preparación de los antígenos para la inoculación de los cobayos

El CFPE de *M. bovis* a una concentración proteica de 1.2 mg/ml se diluyó con 4 ml de PBS estéril y adicionó un ml de adyuvante incompleto de Freud para tener una concentración final de 200 µg/ml, la mezcla se homogeneizó por 10 minutos en vortex a alta velocidad.

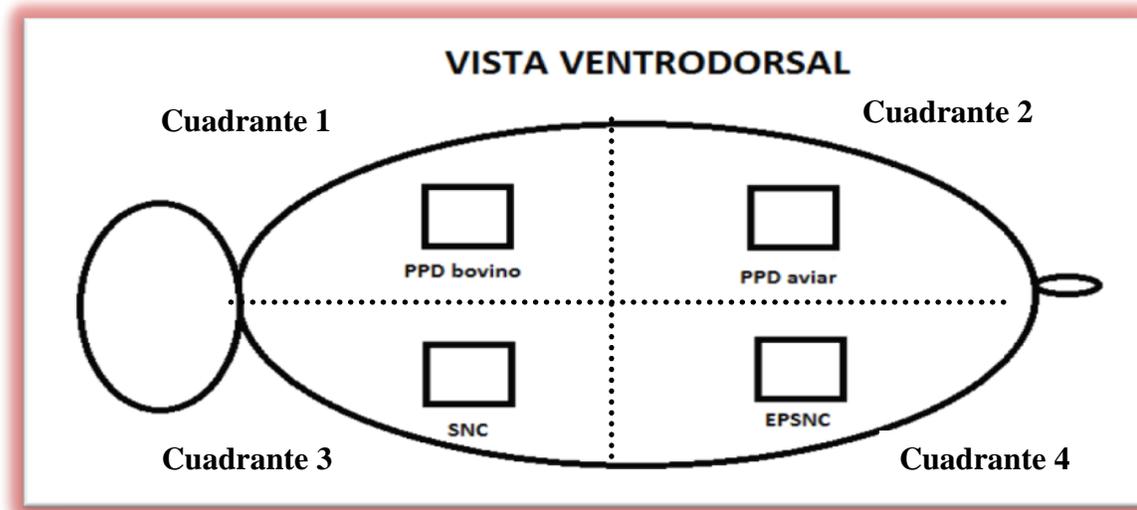
Mientras que del extracto sonicado de *Corynebacterium* (EPSNC) con una concentración de proteína de 170 µg/ml se tomaron directamente 5 ml y depositaron en un tubo estéril a éste se le adicionó 1ml de adyuvante incompleto de Freud, la mezcla se homogeneizó y cargo la jeringa para inocular 1ml por animal. <sup>(66)</sup>

Los animales del grupo control se inocularon con 1ml de PBS estéril cada uno.

A las tres semanas de la ultima inmunización se realizaron pruebas de hipersensibilidad tardía empleando la tuberculina bovina, la tuberculina aviar, el sonicado de *C. xerosis* (SNC) y un preparado proteico de éste último, 0.1 ml de cada uno de los antígenos se inoculó intradérmicamente en diferentes sitios de la región abdominal, (Figura 4). Las lecturas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas empleando un vernier.

Los cobayos se sangraron por punción directa al corazón para obtener los sueros sanguíneos que serían evaluados mediante tres ELISAs comparativas empleando el CFPE de *M. bovis*, el de *M. avium* y el sonicado de *C. xerosis*.

**Figura 4:** Esquema de aplicación de las preparaciones antigénicas para evaluar la hipersensibilidad tardía en los cobayos.



SNC: Sonicado del *Corynebacterium*; PPD-A: Purified Protein Derivative de *M. avium*; PPD-B: Purified Protein Derivative de *M. bovis*; EPSNC: Extracto Proteico del Sonicado de *Corynebacterium*

#### 6.4. Obtención de los Extractos Proteicos del Filtrado de Cultivo.

Se empleó la cepa AN5 de *M. bovis* y DN4 de *M. avium* para obtener los extractos proteicos del filtrado de cultivo que serían utilizados para la evaluación de la respuesta inmune mediante las pruebas de ELISA. Las micobacterias se cultivaron 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  $[(NH_4)_2 SO_4]$  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 resuspenderlo 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 (EPFC), la concentración de proteína del EPFC se determinó por el método de Bradford <sup>(67)</sup> y fue dividido en alícuotas de 1ml, las cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso. Por un procedimiento similar se obtuvo el EPFC de *M. avium* cepa D4 ER el cual fue utilizado en la prueba de ELISA comparativa.

### **6.5. Preparación del extracto sonicado de *Corynebacterium***

El antígeno sonicado se preparó a partir de un aislamiento de *Corynebacterium xerosis*, el cual se cultivo en agar infusión cerebro corazón (BHI) a 37 °C por 48 horas, al término de la incubación la masa bacteriana se cosechó en solución amortiguada de fosfatos (PBS). La suspensión bacteriana se sonicó mediante 10 ciclos de 59' de pulsación aplicando una amplitud de 40% con descansos de 59' entre uno y otro. Luego de este proceso la suspensión se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min, y el sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford. El sobrenadante constituyó el "extracto sonicado de *Corynebacterium*".

### **6.6. Pruebas de intradermorreacción**

Estas pruebas se emplearon para evaluar y comparar la respuesta inmune celular *in vivo* de los bovinos del segundo estudio hacia *M. bovis* y al *Corynebacterium*. La prueba de tuberculina doble comparativa se aplicó de acuerdo a como lo refiere la norma oficial de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina (NOM- 031-ZOO-1995), inoculando en la tabla del cuello del lado derecho, 100 µl de PPD aviar en la parte superior y 100 µl PPD bovino en la parte inferior. Al lado izquierdo se inoculó el SNC.

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

#### **6.7. Prueba ELISA comparativo para *M. bovis* y *M.avium***

Se sensibilizaron placas de ELISA (Maxisorb, NUNC) con los EPFC de *M. bovis*, el EPFC de *M. avium* y el sonicado de *C. xerosis* por separado a razón de 1 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. Catálogo P-9029, Sigma-Aldrich Chemicals. St. Louis MO., USA) disuelta en 10 ml solución amortiguadora de citratos pH 4.5, adicionando 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%]. La reacción se interrumpió a los 10 min. Mediante la adición de 50 µl/pozo de la solución de paro (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 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 DO<sub>492</sub> determinado previamente. <sup>(45)</sup>

### **6.8. Prueba de interferón gamma (IFN-γ)**

De cada animal se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre con heparina para su evaluación en los diferentes muestreos. 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); 45 µl del sonicado de *C. xerosis* (0.27 mg/ml) y un pozo sin estimular como control; las placas se incubaron durante 24 horas en estufa de CO<sub>2</sub> 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 mediante un ELISA sándwich comercial (BOVIGAM).

El ELISA se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, 50 µl de cada uno de los plasmas por duplicado se diluyeron 1:2 con 50 µl del diluyente provisto en el kit colocándolos en los pozos correspondientes 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

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 <sup>(68,69)</sup>.

### **6.9. Extracción de exudado nasal con hisopo para la obtención de muestra de *M. bovis* (ADN).**

Las muestras de exudado nasal se tomaron de cavidad nasal de los animales de estudio con un hisopo estéril sumergido en 5ml de PBS estéril, las muestras se mantuvieron a 4°C para la extracción de ADN y cultivo bacteriológico.

La extracción de ADN de moco nasal se realizó de la siguiente manera (método de bromuro cetiltrimetilamonio, lisozima y proteinasa K). Se tomó 1ml de sedimento de los tubos en donde se encontraban los hisopos nasales, se colocó en microtubos y se centrifugó a 12 000 rpm x 5 min, se decantó el sobrenadante. Después se agregaron 400 µl de TE 1X más 50 µl de lisozima (TSI) se agitó e incubó a 37°C durante 1 h. Enseguida se adicionaron 75 µl de SDS 10 % y 5µl proteinasa K, se agitó e incubó a 65°C durante durante 20 min. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de CTAB, se agitó hasta que la solución tomó una consistencia lechosa y se incubó a 65°C durante 10 min. Después se adicionaron 750 µl de una solución de cloroformo / alcohol isoamílico y se agitó para hacer una solución homogénea, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo (aproximadamente 600 µl) teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya que se podía contaminar el ADN. Inmediatamente, se adicionaron 360 µl de alcohol isopropílico, dejando la mezcla a -20°C durante 30 min, o toda la noche. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min y se descartó la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20 µl por encima del botón de ADN al cual se le adicionó 1 ml de etanol al 70 % frío a -20°C, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min

nuevamente se decantó el sobrenadante. Finalmente, se permitió que el ADN se secase a temperatura ambiente, aproximadamente por 20 min y se colocaron los tubos en una centrífuga de vacío a 45°C durante 20 min. El ADN se disolvió en 20 µl de agua inyectable y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La integridad del ADN se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y su cuantificación se realizó usando un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Gene Quant II, RNA/ADN Calculator).<sup>(70,71)</sup>

#### **6.10. Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Se extrajo ADN de cada muestra de exudado nasal por el método de Van Soolingen *et al.* (1995).<sup>(72)</sup> Como control positivo se empleo ADN de *M. bovis* AN5 y, como control negativo, agua Milli-Q.

Los iniciadores para la PCR fueron TB1-F 5' GAAACAATCCGGAGTTGACAA3' y el TBR-1 5' AGCACGCTGTCAATCATGTA3', que amplifican el gen MPB70 con un tamaño de producto de 372 pb, que identifica CMTB. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µl, se efectuó empleando 5 pM de cada iniciador a las siguientes concentraciones: 2.5 µl de búfer 10 X, 0.5 µl de dNTP (2mM), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.25 µl de la enzima *Taq* polimerasa (5U/µl) y 5 µl ADN de cada muestra problema. El termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) tuvo las siguientes condiciones: precalentamiento a 96° C por 15 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, constituidos de fases de desnaturalización a 94°C por 30 segundos y extensión a 71°C por 30 segundos. Después de la amplificación, sigue la fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio al 1 % y la reacción se visualizó en un analizador de geles (UVP Bioluminescence Systems, EpivChemi II Darkroom).<sup>(73)</sup>

### **6.11. PCR anidada.**

Posteriormente, utilizando una decima parte del producto obtenido en la reacción anterior se procedió a la amplificación de un fragmento de 208 pb del gen MPB70, dentro de la región de 372 pb, mediante una PCR anidada con los oligonucleótidos diseñados para este trabajo (M22/ 3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' Y M22/ 4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3' 35 ciclos de 30" a 94° C y 1' a 72°C), utilizando una misma temperatura de re-asociación y extensión.<sup>(53)</sup>

### **6.12. Análisis estadístico**

Para analizar los datos se emplearon pruebas no paramétricas para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

Cuando se compararon 2 grupos se utilizó la prueba de Mann-Whitney y para analizar tres o más grupos de datos la prueba de Kruskal-Wallis.

El análisis se realizó con el programa SigmaStat 3.5 (Point Richmond, CA, USA, 2006).<sup>(74)</sup>

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Resultados de análisis de respuesta de anticuerpos en vaquillas vacunadas contra la tuberculosis bovina para *M. bovis* y *C. xerosis***

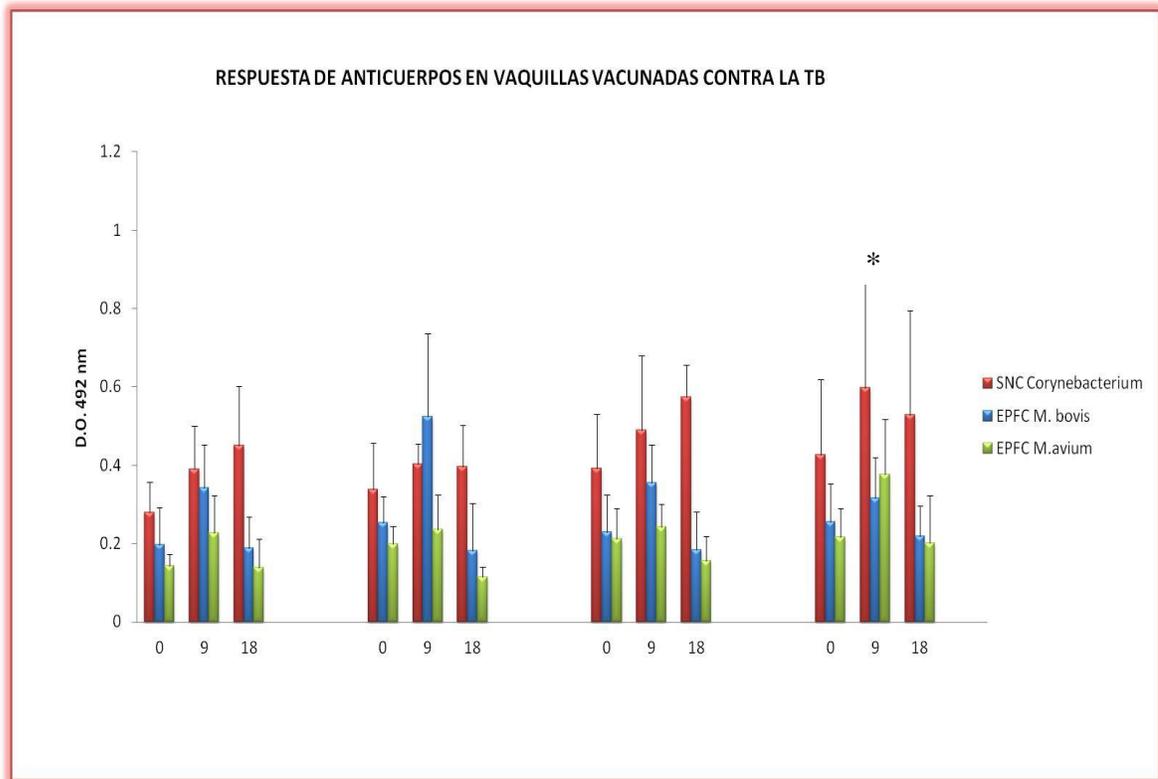
En la etapa pos vacunación del estudio de evaluación de vacunas contra la tuberculosis bovina el 55% de las vacas fueron positivas al aislamiento de *C. xerosis* en muestras de exudado nasal alrededor de la dieciochoava semana de haberse vacunado, considerando la estrecha relación taxonómica entre el género

*Corynebacterium* y *Mycobacterium* se analizó la posible influencia de esta bacteria en la respuesta inmune de los animales vacunados y control mediante pruebas de ELISA comparativos, para ello se evaluaron los sueros de los diferentes grupos en el tiempo cero antes de la vacunación, en la semana nueve y semana dieciocho.

En la gráfica 1 se presentan los resultados de la evaluación de anticuerpos al EPFC de *M. bovis*, EPFC de *M. avium* y al SNC en las vaquillas vacunadas contra TB en diferentes muestreos. En el tiempo cero antes de iniciar la vacunación las vaquillas mostraban un nivel promedio bajo pero significativo de anticuerpos a *C. xerosis*, los cuales sin embargo eran ligeramente más altos que los registrados para *M. bovis* y *M. avium*.

En la semana nueve pos vacunación los niveles de anticuerpos a *C. xerosis* se incrementaron en los diferentes grupos, pero fueron mayores en los grupos control y el vacunado con BCG; mientras que en los animales vacunados con el EPFC aumentaron los anticuerpos primordialmente para *M. bovis*. En la semana dieciocho hubo un aumento importante de anticuerpos a *C. xerosis* en los diferentes grupos vacunados y control, siendo no obstante más altos para éste último, lo cual correlacionó con el elevado porcentaje de aislamientos de la bacteria obtenidos en los animales de estudio, (Cuadro 2).

**Gráfica 1** Respuesta de anticuerpos en vaquillas vacunadas contra la TB.



**Gráfica 1** Promedios de los niveles de anticuerpos IgG hacia el SNC *Corynebacterium* EPFC *bovis* o EPCF *avium* en los animales vacunados contra TB en diferentes tiempos

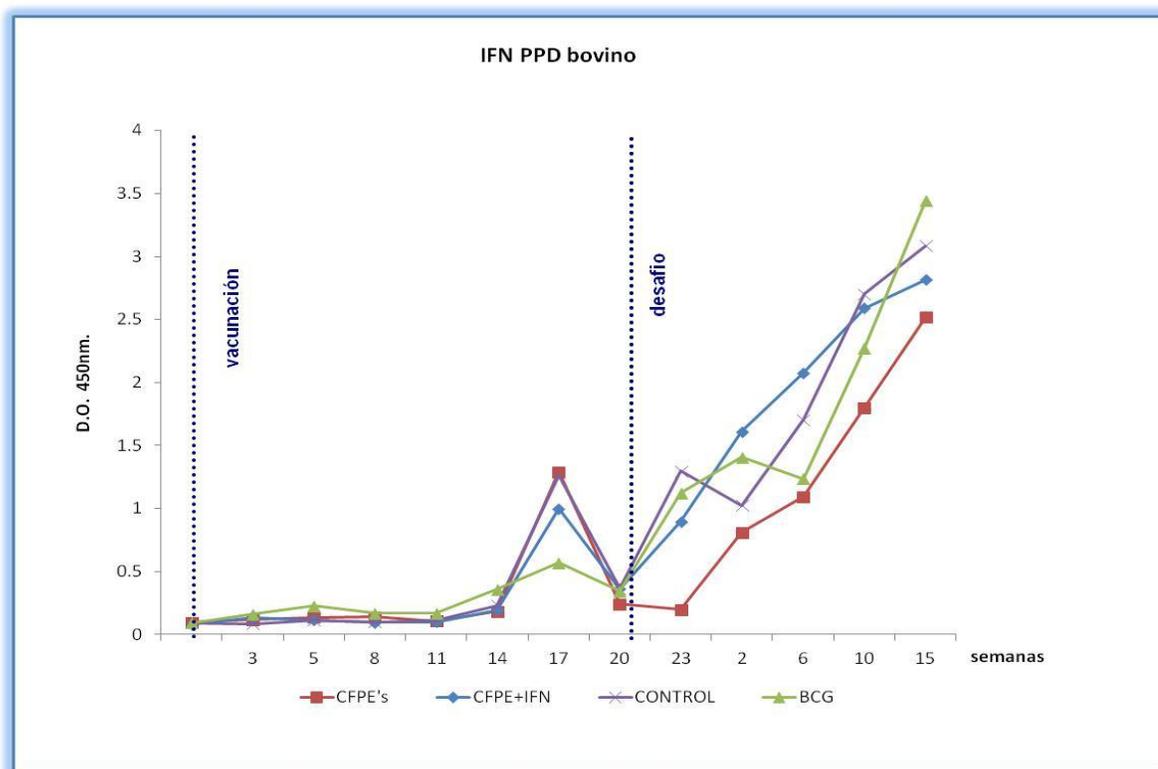
**Cuadro 2** Grupos de vaquillas vacunadas contra TB

| Grupo 1                                | Grupo 2     | Grupo 3    | Grupo 4        |
|--|-------------|------------|----------------|
| <b>IFN- <math>\gamma</math> + CFPE</b> | <b>CFPE</b> | <b>BCG</b> | <b>CONTROL</b> |
| 12                                     | 19*         | 6          | 8              |
| 22*                                    | 9*          | 3*         | 5- MUERTO      |
| 4*                                     | 25          | 24*        | 21             |
| 17*                                    | 11          | 13*        | 1*             |
| 23                                     | 20*         | 10         | 2              |
| 16*                                    | 14          | 7*         | 15*            |

\*Vaquillas positivas al aislamiento de *C.xerosis*

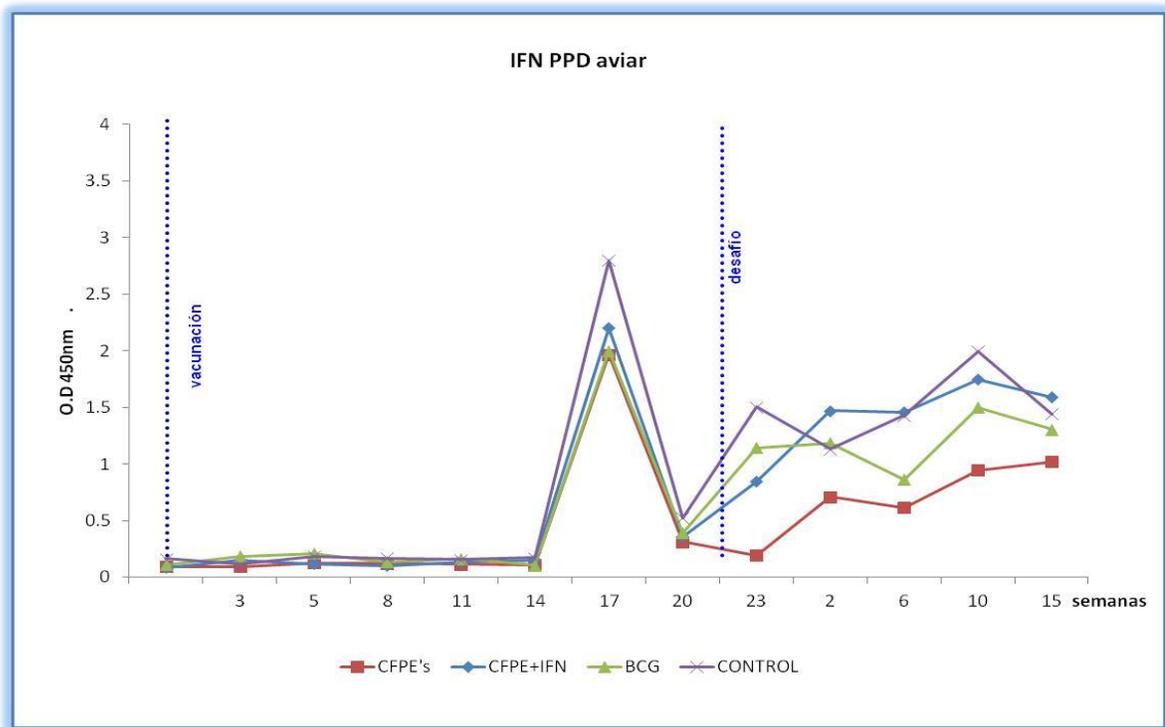
Cabe mencionar que en la evaluación de la respuesta celular la producción de IFN- $\gamma$  fue baja pero significativa en los grupos vacunados en las primeras semanas, en específico en los vacunados con BCG. Sin embargo, en el periodo comprendido entre las semanas 14 y 20 se observó un incremento altamente significativo en la producción de IFN- $\gamma$  en todos los grupos hacia el PPD aviar, situación que se relacionó en tiempo también con el aislamiento de *C. xerosis*. Circunstancia, que no afectó la respuesta inmune celular inducida por la vacunación, como se observa en los resultados de producción de IFN- $\gamma$  obtenidos en la etapa pos desafío con el PPD bovino para los diferentes grupos incluyendo el grupo control. Gráficas 2 y 3.

**Gráfica 2** IFN PPD bovino



**Gráfica 2.** Producción de IFN- $\gamma$  en sangre completa estimulada con PPD bovino en los diferentes grupos CFPE's, CFPE+INF y BCG. En diferentes tiempos.

**Gráfica 3 IFN PPD aviar**



**Gráfica 3.** Producción de IFN- $\gamma$  en sangre completa estimulada con PPD aviar en los diferentes grupos CFPE's, CFPE+INF y BCG. En diferentes tiempos.

Por otro lado, los resultados de HT realizados en la semana dieciocho posvacunación, muestran una respuesta en varios de los animales preferentemente al PPD aviar, situación que coincide en tiempo con la mayor producción de IFN- $\gamma$  hacia este antígeno (Cuadro 3). Sin dejar de mencionar que en la siguiente prueba de tuberculina realizada, en la etapa pos desafío prácticamente todos los animales fueron positivos al PPD bovino.

**CUADRO 3** Prueba de Tuberculina bovina y aviar

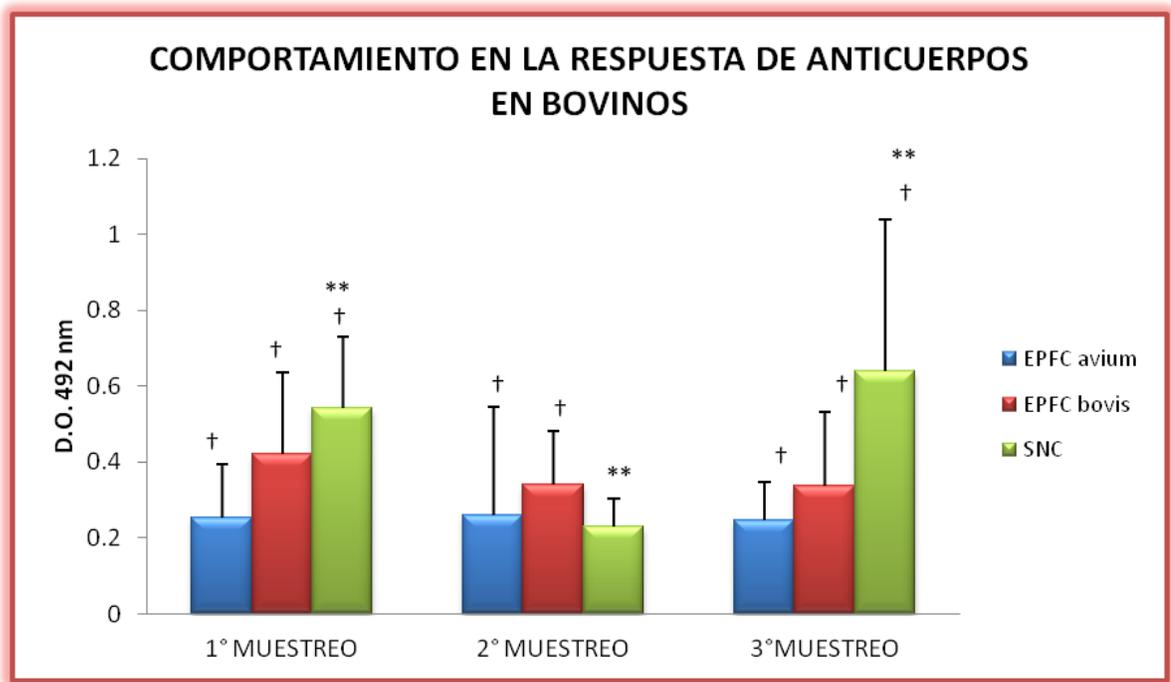
| GRUPO          | Nº ANIMAL | LECTURA INICIAL (milímetros)        | LECTURA FINAL A LAS 72 HRS (milímetros) *a / b | DIFERENCIA L (milímetros) *a / b | INTERPRETACIÓN |
|----------------|-----------|-------------------------------------|--|----------------------------------|----------------|
| CFPE's         | 9         | 5/4                                 | 15/5   | 10/1                             | -              |
|                | 11        | 5/5                                 | 5/5  | 0/0                              | -              |
|                | 14        | 7/6                                 | 11/20  | 4/14                             | +              |
|                | 19        | 6/6                                 | 6/6  | 0/0                              | -              |
|                | 20        | 6/7                                 | 21/7   | 15/0                             | -              |
|                | 25        | 6/6                                 | 6/6  | 0/0                              | -              |
| CFPE's + IFN-γ | 4         | 7/6                                 | 39/37  | 32/31                            | -              |
|                | 12        | 7/7                                 | 7/7  | 0/0                              | -              |
|                | 16        | 7/6                                 | 7/6  | 0/0                              | -              |
|                | 17        | 7/5                                 | 7/8  | 0/3                              | +/-            |
|                | 22        | 5/5                                 | 7/6  | 2/1                              | -              |
|                | 23        | 3/3                                 | 37/31  | 34/28                            | -              |
| BCG            | 3         | 7/6                                 | 36/32  | 29/26                            | -              |
|                | 6         | 5/5                                 | 18/9   | 13/4                             | -              |
|                | 7         | 4/4                                 | 4/4  | 0/0                              | -              |
|                | 10        | 6/6                                 | 12/24  | 6/18                             | +              |
|                | 13        | 7/7                                 | 16/7   | 7/0                              | -              |
|                | 24        | 9/8                                 | 9/33   | 0/25                             | +              |
| CONTROL        | 1         | 4/4                                 | 30/33  | 26/29                            | +/-            |
|                | 2         | 3/3                                 | 25/4   | 22/1                             | -              |
|                | 5         | MURIO ANTES DE UNA NEUMONIA CRÓNICA |  |                                  |                |
|                | 8         | 9/9                                 | 20/9   | 11/0                             | -              |
|                | 15        | 4/4                                 | 4/4  | 0/0                              | -              |
|                | 21        | 6/6                                 | 34/14  | 28/8                             | -              |

\*a/b Resultado tuberculina aviar/resultado tuberculina bovina, (+) positivo a tuberculina bovina, (+/-) sospechoso, (-)

## 7.2. Resultados de análisis de respuesta hacia *M. bovis* y *C. xerosis* en vacas del hato de Cuautitlán Edo. de México

### 7.2.1. Evaluación de anticuerpos

**Gráfica 4** Comportamiento en la respuesta de anticuerpos en bovinos



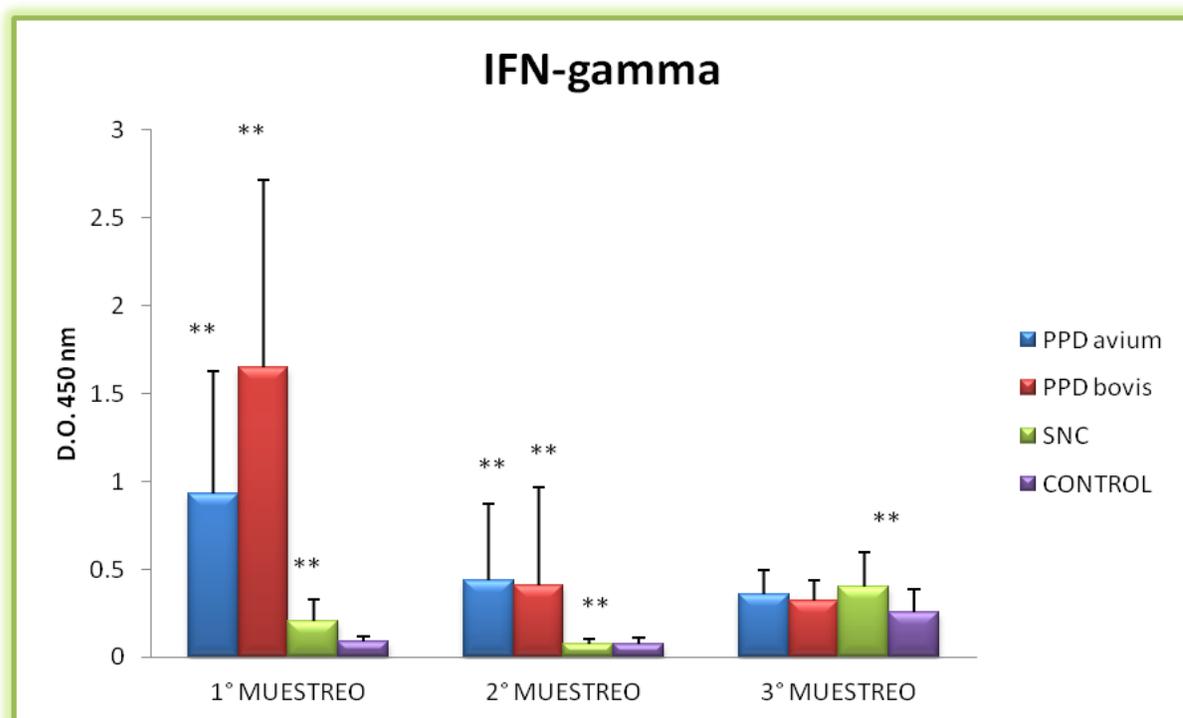
**Gráfica 4.** Resultados de ELISA comparativo de EPFC *bovis*, *avium* y sonicado de *Corynebacterium* muestreados en tres diferentes tiempos.

El análisis del comportamiento de la respuesta hacia los antígenos de *M. bovis*, *M. avium* y de *C. xerosis* en el hato bovino de Cuautitlán Edo. de México mediante los ensayos de ELISA comparativos muestra que existen diferencias entre ellos ( $P < 0.05$ ), observándose niveles más altos de anticuerpos a *Corynebacterium*, seguido de los anticuerpos a *M. bovis* y un nivel más bajo de éstos hacia *M. avium*. En el segundo muestreo también se observaron diferencias

entre los antígenos evaluados, pero los niveles fueron preferentemente a *M. bovis*, ( $P < 0.05$ ). En tanto que en el tercer muestreo los anticuerpos fueron más altos para el SNC existiendo diferencia entre los resultados de esta ELISA con la de *M. bovis* y la de *M. avium* ( $P < 0.05$ ) pero no entre estos dos últimos ensayos. En tiempo de muestreo existió diferencia para los diferentes antígenos evaluados, ( $P < 0.05$ ). (Gráfica 4).

### 7.2.2. Evaluación de la producción de IFN- $\gamma$

Gráfica 5 IFN- gamma



Gráfica 5. Producción de IFN -  $\gamma$  determinados en cultivos de sangre completa estimulados con PPD bovino, PPD avium y el SNC en los diferentes muestreos (n= 16).

Los resultados de interferón señalan diferencias en tiempo y en la respuesta hacia los diferentes antígenos; observándose en el primer muestreo los niveles más altos de producción para el PPD bovino mas que en los otros muestreos realizados comparativamente, ( $P < 0.05$ ). En este mismo muestreo la respuesta fue significativa para el PPD aviar pero no mayor a la que se observó con el PPD bovino. La respuesta con el SNC fue baja pero significativa en relación con el control sin estimular.

Para el segundo muestreo la respuesta entre los antígenos de PPD aviar y PPD bovino fue similar y significativa en relación al control y SNC.

En el tercer muestreo la respuesta de IFN- $\gamma$  fue baja para los diferentes antígenos, no obstante bajo los criterios de positividad de la prueba los animales resultaron positivos hacia dichos antígenos considerando el control sin estimular. Resulta interesante observar que existe un declive en la respuesta de producción de IFN- $\gamma$  hacia los diferentes PPD's, lo que contrasta al observar los niveles de producción basales que se incrementan en los diferentes muestreos (Gráfica 5).

### **7.2.3. Prueba de intradermorreacción**

Los resultados de la prueba de tuberculina comparativa realizada a este grupo de animales muestra un incremento gradual en el número de reactores al PPD bovino durante el seguimiento del estudio, al inicio el 46% del grupo fue reactor, en tanto que al final el 69% lo fue, lo cual correlaciona de manera negativa con el descenso en los niveles de producción de IFN- $\gamma$  en tiempo determinados para este grupo de animales. Resultados similares en el incremento de vacas rectoras se observaron durante el periodo de estudio (un año) a nivel de hato. La prevalencia inicial registrada fue del 36%, al final esta se incrementó al 50% (Cuadro 4).

**Cuadro 4** Resultados de la prueba de tuberculina en vacas evaluadas por IFN- $\gamma$  y ELISA 's comparativos a *M. bovis*, *M. avium* y *C. xerosis*.

| N° animal                     | PRIMERA TUBERCULINA |                  |            | SEGUNDA TUBERCULINA |                  |            | TERCERA TUBERCULINA |                  |            |  |
|-------------------------------|---------------------|------------------|------------|---------------------|------------------|------------|---------------------|------------------|------------|--|
|                               | Diferencia bovina   | Diferencia aviar | Diferencia | Diferencia bovina   | Diferencia aviar | Diferencia | Diferencia bovina   | Diferencia aviar | Diferencia |  |
| 13                            | 3                   | 3                | 0          | 25                  | 17               | 8          | 26                  | 19               | 7          |  |
| 53                            | 0                   | 0                | 0          | 5                   | 6                | 1          | 41                  | 24               | 17         |  |
| 60                            | 0                   | 0                | 0          | 7                   | 7                | 0          | 6                   | 6                | 0          |  |
| 63                            | 0                   | 0                | 0          | 4                   | 4                | 0          | 27                  | 27               | 0          |  |
| 64                            | 0                   | 0                | 0          | 7                   | 7                | 0          | 16                  | 16               | 0          |  |
| 126                           | 22                  | 15               | 7          | 14                  | 6                | 8          | 17                  | 26               | 9          |  |
| 135                           | 0                   | 0                | 0          | 5                   | 5                | 0          | 7                   | 7                | 0          |  |
| 880                           | 35                  | 24               | 11         | 24                  | 16               | 8          | 32                  | 18               | 14         |  |
| 890                           | 34                  | 30               | 4          | 33                  | 23               | 10         | 30                  | 21               | 9          |  |
| 906                           | 40                  | 50               | 10         | 33                  | 12               | 21         | 29                  | 21               | 8          |  |
| 927                           | 25                  | 13               | 12         | 33                  | 28               | 5          | 25                  | 14               | 11         |  |
| 928                           | 28                  | 18               | 10         | 15                  | 7                | 8          | 22                  | 11               | 11         |  |
| 935                           | 32                  | 20               | 12         | 25                  | 17               | 8          | 26                  | 17               | 9          |  |
| Porcentaje de vacas reactoras |                     |                  | 46%        |                     |                  |            | 61.5%               | 69%              |            |  |

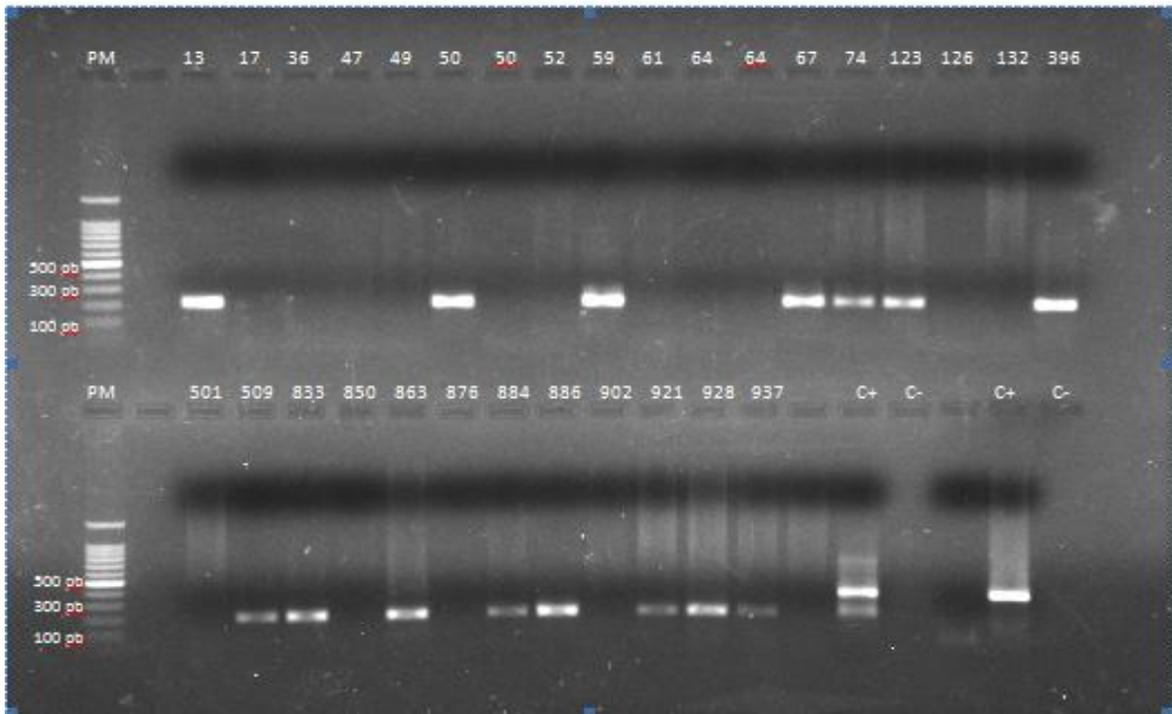
~ 45 ~

En dos periodos de tiempo de cinco meses entre uno y otro, se tuvo la oportunidad de que al momento en que los animales se tuberculinizaron mediante la doble comparativa se pudo aplicar una preparación de sonicado y un extracto proteico de *C. xerosis* para determinar posibles reacciones de hipersensibilidad tardía a éstos antígenos, sin observarse reacción alguna en ambas ocasiones, lo cual correlaciona con la baja producción de IFN- $\gamma$  determinado en los cultivos de sangre completa estimulados con este tipo de antígenos, señalando con ello su baja capacidad para inducir una respuesta celular, pese a observar niveles de anticuerpos significativos a *Corynebacterium* en los animales sobre todo en el ultimo muestreo realizado ( Gráficas 4 y 5).

#### **7.2.4. PCR anidada**

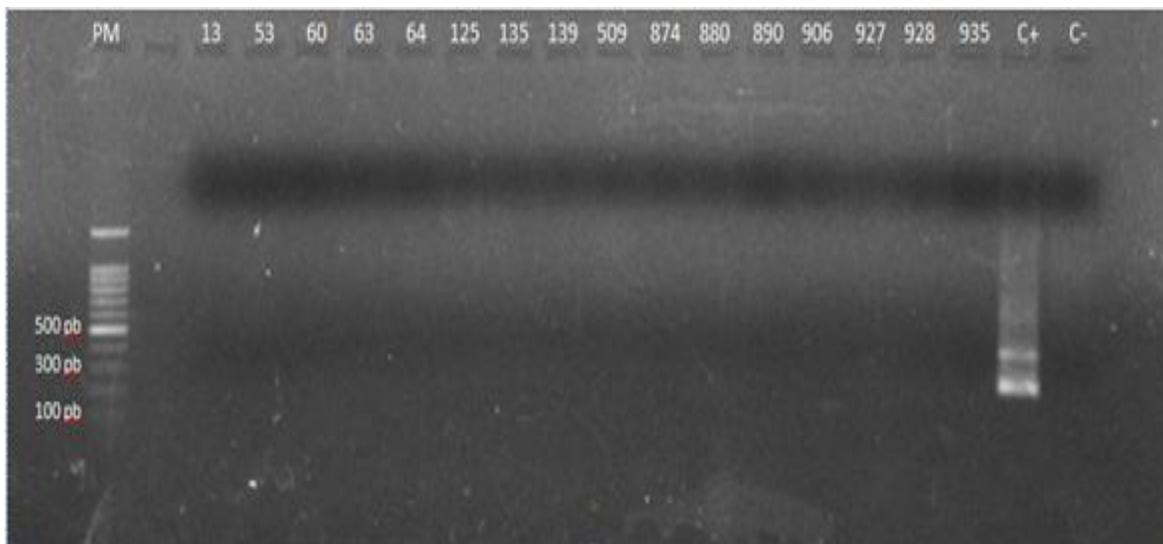
Todos los animales resultaron negativos al aislamiento de *Corynebacterium spp.* a partir de muestras de exudado nasal, en tanto que en un primer muestreo el 50% (15/30) resultó positivo a la PCR anidada para micobacterias del complejo tuberculosis (Figura 5), no así en un segundo muestreo en que todos los animales probados fueron negativos a la PCR,( Figura 6).

**Figura 5** PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales del primer muestreo del hato de Cuautitlán Edo. de México .



**Figura 5.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de vacas de Cuautitlán Edo. de México durante el primer muestreo. PM peso molecular; C+ control positivo (*M. bovis*); C- control negativo (agua).

**Figura 6** PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales del segundo muestreo del hato de Cuautitlán Edo. de México .

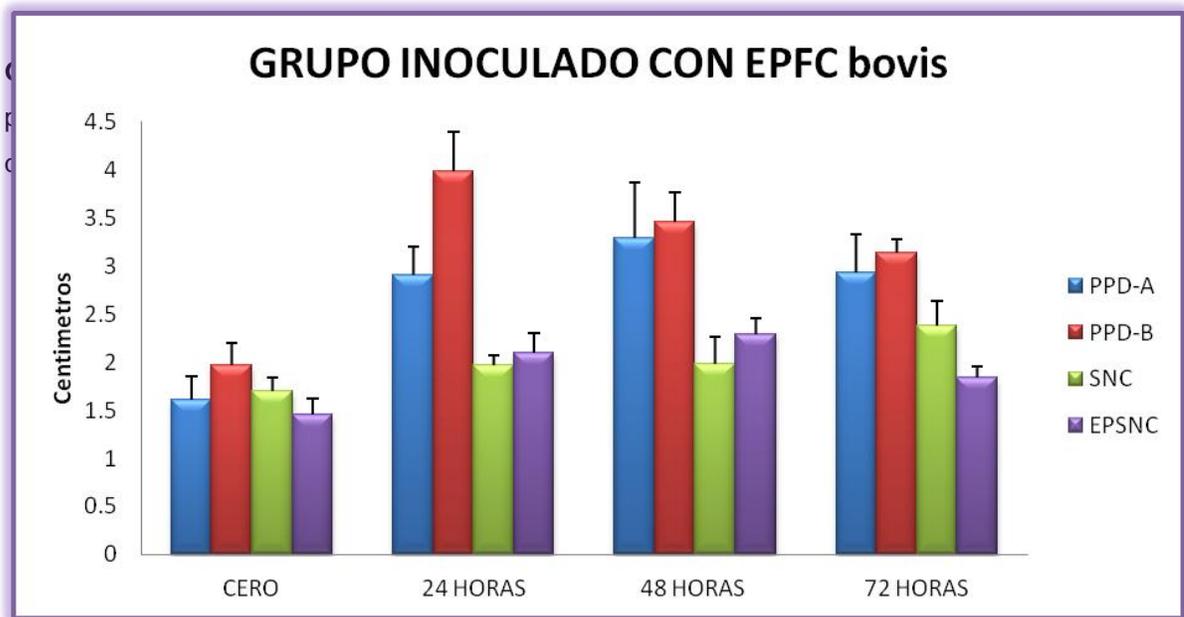


**Figura 6.** Detección del gen MPB70 mediante la PCR anidada a partir de muestras de secreciones nasales de vacas de Cuautitlán Edo. de México durante el segundo muestreo. PM peso molecular; C+ control positivo (*M. bovis*); C- control negativo (agua)

### 7.3. Resultados de análisis de respuesta hacia *M. bovis*, *M. avium* y *C. xerosis* en cobayos

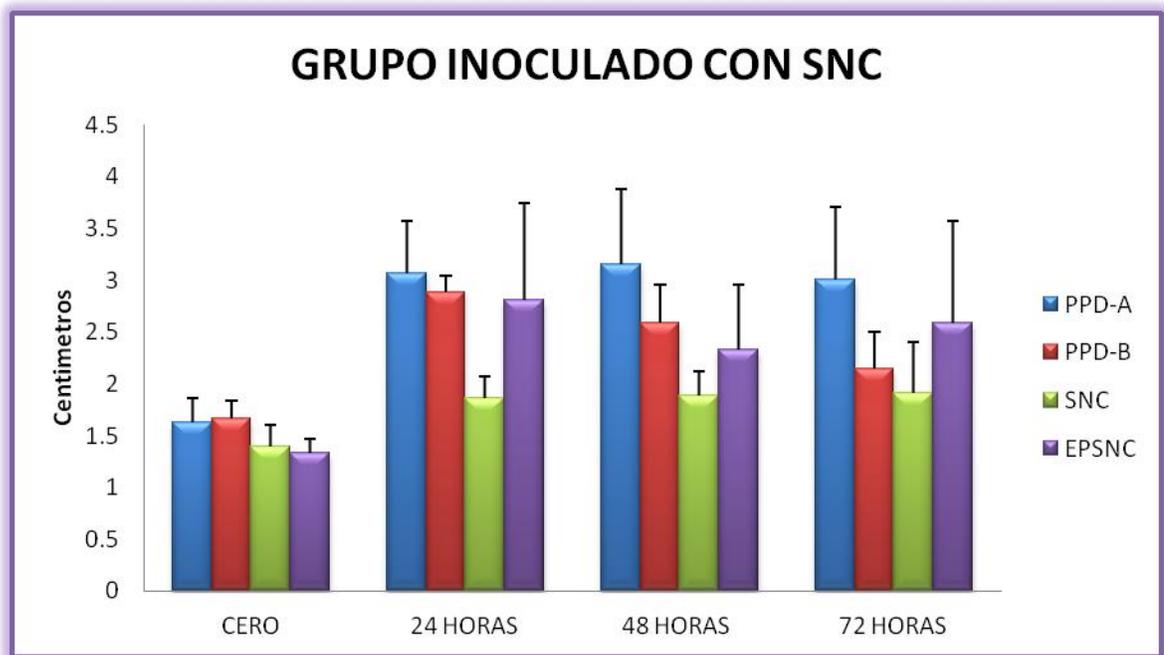
#### 7.3.1. Prueba de intradermorreacción

Gráfica 6 Grupo 1 inoculado con EPFC bovis



SNC: Sonicado del *Corynebacterium*; PPD-A: Purified Protein Derivative de *M. avium*; PPD-B: Purified Protein Derivative de *M. bovis*; EPSNC: Extracto Proteico del Sonicado de *Corynebacterium xerosis*.

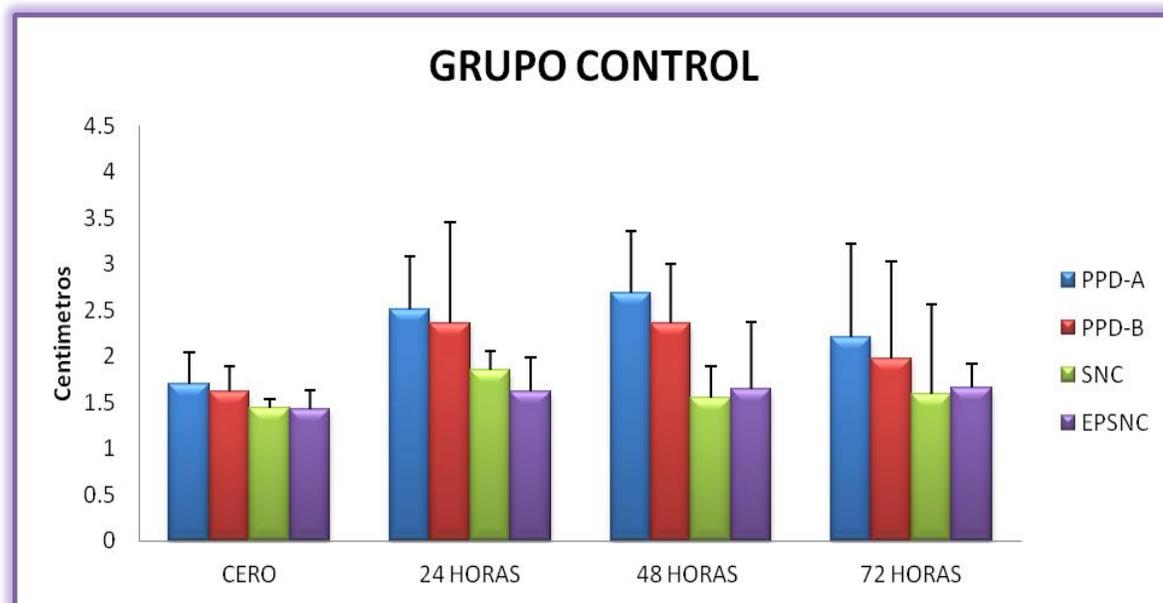
**Gráfica 7** Grupo 2 inoculado con SNC



SNC: Sonicado del *Corynebacterium*; PPD-A: Purified Protein Derivative de *M. avium*; PPD-B: Purified Protein Derivative de *M. bovis*; EPSNC: Extracto Proteico del Sonicado de

**Gráfica 7.** Resultados promedio de HT obtenidos con el PPD-bovis, PPD-avium y las preparaciones de *Corynebacterium* en el grupo 2 de cobayos inoculados con el Sonicado de *Corynebacterium xerosis*.

**Gráfica 8** Grupo 3 control



SNC: Sonicado del *Corynebacterium*; PPD-A: Purified Protein Derivative de *M. avium*; PPD-B: Purified Protein Derivative de *M. bovis*; EPSNC: Extracto Proteico del Sonicado de *Corynebacterium*.

**Gráfica 8.** Resultados promedio de HT obtenidos con el PPD-bovino, PPD-aviar y las preparaciones de *Corynebacterium* en el grupo 3 control sin inocular.

Cuadro 5 Resultados de la Hipersensibilidad Tardía en los cobayos a las cero, 24, 48 y 72 horas.

| GRUPO 1 Inoculado con EPFC de <i>M. bovis</i>            |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |
|--|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|------------|-----------|-------|-------|
| N° animal  | HORA CERO  |           |       |       | 24 HORAS   |           |       |       | 48 HORAS   |           |       |       | 72 HORAS   |           |       |       |
|  | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC |
| 1  | 1.88       | 1.7       | 1.72  | 1.45  | 4.49       | 2.81      | 2.03  | 1.6   | 3.53       | 3.55      | 1.9   | 3.23  | 4.31       | 4         | 4.04  | 1.8   |
| 2  | 1.7        | 1.23      | 1.62  | 1.1   | 3.16       | 2.58      | 1.74  | 1.91  | 3.46       | 3.13      | 1.52  | 1.54  | 2.16       | 1.9       | 1.62  | 1.55  |
| 3  | 2.42       | 2.13      | 1.59  | 1.46  | 5.64       | 3.92      | 2.02  | 2.13  | 4.49       | 4.32      | 1.97  | 1.62  | 4.24       | 4.05      | 2.26  | 2.24  |
| 4  | 1.9        | 1.51      | 1.84  | 1.59  | 2.94       | 2.64      | 1.81  | 2.55  | 2.97       | 2.69      | 2.03  | 2.28  | 2.53       | 2.22      | 1.84  | 1.65  |
| 5  | 1.91       | 1.47      | 1.69  | 1.65  | 3.68       | 2.55      | 2.26  | 2.32  | 2.82       | 2.77      | 2.5   | 2.74  | 2.42       | 2.51      | 2.11  | 1.94  |
| Promedio   | 1.962      | 1.608     | 1.692 | 1.45  | 3.962      | 2.9       | 1.972 | 2.102 | 3.454      | 3.292     | 1.984 | 2.282 | 3.132      | 2.936     | 2.374 | 1.836 |
| GRUPO 2 Inoculado con Sonicado de <i>Corynebacterium</i> |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |
| N° animal  | HORA CERO  |           |       |       | 24 HORAS   |           |       |       | 48 HORAS   |           |       |       | 72 HORAS   |           |       |       |
|  | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC |
| 6  | 1.8        | 1.64      | 1.77  | 1.5   | 2.87       | 2.71      | 2.21  | 3.07  | 2.35       | 2.32      | 2.27  | 2.53  | 2.16       | 2.1       | 2.09  | 1.99  |
| 7  | 1.59       | 1.85      | 1.24  | 1.46  | 3.14       | 3.69      | 1.82  | 2.16  | 2.09       | 3.65      | 1.72  | 2.69  | 1.83       | 2.67      | 1.49  | 2.42  |
| 8  | 1.5        | 1.85      | 1.36  | 1.24  | 2.81       | 3.05      | 1.88  | 1.88  | 2.82       | 3.2       | 1.73  | 1.78  | 2.54       | 4.02      | 2.06  | 3.28  |
| 9  | 1.57       | 1.3       | 1.3   | 1.2   | 2.72       | 3.42      | 1.74  | 2.71  | 3.01       | 4.06      | 1.94  | 1.55  | 1.74       | 3.22      | 1.34  | 1.39  |
| 10   | 1.89       | 1.52      | 1.29  | 1.25  | 2.9        | 2.46      | 1.69  | 4.25  | 2.69       | 2.57      | 1.75  | 3.07  | 2.46       | 3.01      | 2.57  | 3.84  |
| Promedio   | 1.67       | 1.632     | 1.392 | 1.33  | 2.898      | 3.066     | 1.866 | 2.614 | 2.592      | 3.16      | 1.892 | 2.324 | 2.146      | 3.004     | 1.91  | 2.584 |
| GRUPO 3 Control  |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |            |           |       |       |
| N° animal  | HORA CERO  |           |       |       | 24 HORAS   |           |       |       | 48 HORAS   |           |       |       | 72 HORAS   |           |       |       |
|  | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC | PPD bovino | PPD aviar | SNC   | EPSNC |
| 11   | 1.56       | 1.49      | 1.7   | 1.18  | 2.08       | 2.54      | 1.66  | 1.81  | 2.27       | 3.06      | 1.76  | 1.87  | 1.87       | 1.92      | 1.71  | 1.78  |
| 12   | 1.96       | 2.05      | 1.35  | 1.53  | 2.88       | 2.89      | 1.95  | 1.77  | 2.7        | 3.22      | 1.9   | 1.73  | 2.24       | 2.73      | 1.95  | 1.62  |
| 13   | 1.31       | 1.44      | 1.38  | 1.44  | 1.89       | 2.17      | 1.83  | 1.62  | 2.13       | 1.97      | 1.48  | 1.71  | 1.91       | 1.9       | 1.48  | 1.52  |
| 14   | 1.62       | 1.75      | 1.37  | 1.34  | 2.65       | 2.44      | 1.92  | 1.32  | 2.01       | 2.5       | 1.4   | 1.44  | 1.92       | 2.29      | 1.59  | 1.58  |
| 15   | 1.67       | 1.79      | 1.39  | 1.61  | 2.29       |           | 1.69  | 1.6   | 2.65       |           | 1.19  | 1.19  | 1.93       |           | 1.24  | 1.76  |
| Promedio   | 1.622      | 1.704     | 1.438 | 1.42  | 2.358      | 2.51      | 1.85  | 1.624 | 2.352      | 2.687     | 1.546 | 1.65  | 1.974      | 2.21      | 1.594 | 1.652 |

~ 52 ~

Los resultados de hipersensibilidad tardía (HT) mostraron una mayor respuesta hacia el PPD-bovino en el grupo 1 inoculado con el EPFC de *M.bovis* en relación con los otros antígenos evaluados (Cuadro 5), señalando el establecimiento de una respuesta específica en este grupo, la cual fue máxima a las 24 h,  $3.98 \pm 0.98$  vs 1.96 cm antes de inocular. Respuesta que disminuye con el tiempo sin dejar de ser significativa para el PPD bovino situado en el cuadrante 1. Con el PPD-aviar observado en el cuadrante 2 también se desarrolló una respuesta de HT importante pero no mayor a la que se observó con el PPD-bovino (cuadrante 1), la cual fue máxima a las 48 h. Con los preparados de *Corynebacterium* (cuadrantes 3 y 4) la respuesta de HT fue baja para este grupo, siendo el extracto proteico observado en el cuadrante 4 el que mostró mayor capacidad para inducir una reacción de hipersensibilidad sin ser significativa, (Gráfica 6).

Para el grupo 2 inoculado con el sonicado de *Corynebacterium*, la mayor respuesta de HT se observó también a las 24 h siendo relativamente similar con los antígenos del PPD-aviar (cuadrante 2), PPD-bovino (cuadrante 1) y el extracto proteico de *Corynebacterium xerosis* (cuadrante 4). 3.06, 2.88 y 2.81 respectivamente, no obstante, dos de los cobayos mostraron lesiones necróticas en el área donde se inoculó el extracto proteico (cuadrante 4),  $P < 0.05$ . El sonicado de *Corynebacterium* observado en el cuadrante 3 fue incapaz de desarrollar una respuesta de HT importante, pese a que fue utilizado para inocular a este grupo de cobayos, (Gráfica 7).

En el grupo 3, control se registró una respuesta inflamatoria con ambos PPD, sin embargo esta no fue significativa al compararla con el grupo 1 inoculado con el EPFC de *M. bovis*, ninguna de las preparaciones de *Corynebacterium* (cuadrantes 3 y 4) indujo respuesta en este grupo, (Gráfica 8).

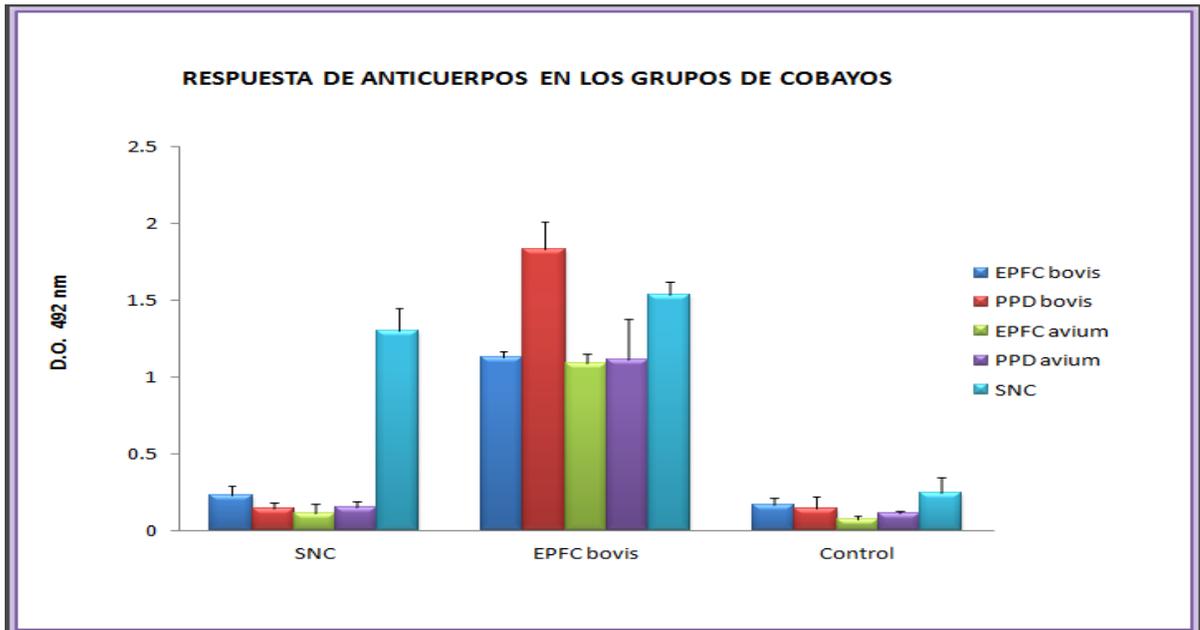
Por otro lado, los resultados de los diferentes ensayos de ELISA mostraron un nivel significativo de anticuerpos en el grupo 2 inoculado con el SNC, cuando los

sueros de estos animales se evaluaron con el mismo antígeno, con un valor promedio de  $1.3 \pm 0.15$  D.O, y un nivel reducido de anticuerpos cuando se hizo lo propio al emplear como antígenos el PPD bovino, el PPD aviar y los EPFC de *M. bovis* y el de *M. avium* en los otros ensayos de ELISA ( $P < 0.05$ ), señalando con ello el desarrollo de una respuesta humoral específica a los antígenos del SNC en este grupo, (Gráfica 9).

A diferencia de lo observado para el grupo 2 inoculado con SNC, en el grupo 1 inoculado con el EPFC los niveles de anticuerpos fueron significativos en los diferentes ensayos de ELISA, siendo más altos en aquel en el cual se empleo el PPD bovino seguido del de SNC, con valores de  $1.8 \pm 0.18$  y  $1.5 \pm 0.078$  D.O respectivamente. Los valores con el EPFC de *M. bovis*, PPD avium y EPFC de *M. avium* fueron también significativos comparando con el grupo 3 control,  $P < 0.05$ . Indicando el desarrollo tanto de anticuerpos específicos a *M. bovis*, como el de anticuerpos a los antígenos comunes compartidos con otras micobacterias, incluso con bacterias relacionadas como lo es el *Corynebacterium*, a diferencia de lo que se observó en el grupo inoculado con el SNC en los ensayos de ELISA, cuya respuesta fue altamente específica hacia los antígenos presentes en el SNC. En el grupo 3 control los valores en los diferentes ensayos de ELISA fueron bajos.

### 7.3.2. Evaluación de anticuerpos

**Gráfica 9** Respuesta de anticuerpos en los grupos de cobayos.



EPFC avium: Extracto Proteico de Filtrado de Cultivo de *M. avium*; EPFC bovis: Extracto Proteico de Filtrado de Cultivo de *M. bovis*; SNC Sonicado del *Corynebacterium*.

**Gráfica.9** Resultados de la evaluación de anticuerpos mediante ELISA's comparativos en los grupos de cobayos inoculados con el SNC, EPFC y control.

Los resultados de evaluación de anticuerpos con los diferentes ensayos de ELISA muestran que el grupo 3 de cobayos inoculado con el SNC respondió casi exclusivamente a los antígenos del SNC con un valor promedio de  $1.3 \pm 0.15$  D.O. contrastando con los valores bajos registrados en los otros ensayos de ELISA en los cuales se emplearon el EPFC de *M. bovis*, el PPD bovino, el EPFC de *M. avium* y el PPD aviar. Indicando el desarrollo de una respuesta específica a los antígenos del SNC en estos animales; a diferencia de lo observado para este grupo, en el grupo 1 inoculado con el EPFC de *M. bovis* los niveles de

anticuerpos fueron significativos en los diferentes ensayos de ELISA, siendo no obstante mas altos en aquel en el cual se empleó el PPD bovino seguido del de SNC, con valores de  $1.8\pm 0.18$  y  $1.5\pm 0.078$  D.O respectivamente.

Los valores con el EPFC de *M. bovis*, EPFC de *M. avium* y PPD aviar y fueron también significativos al compararse con el grupo 3 control. En este último grupo los valores en los diferentes ensayos de ELISA fueron bajos.

## 8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una de las principales afecciones en los hatos lecheros, donde las prevalencias pueden alcanzar cifras de más del 60%. El control de la enfermedad se basa en la identificación y eliminación de vacas rectoras a la prueba de la tuberculina, principal herramienta de diagnóstico que se emplea en nuestro país; la cual mide la respuesta inmune celular del animal al derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovino) en la modalidad simple cervical o anocaudal.<sup>(52)</sup> La prueba ha mostrado ser inespecífica mostrando una proporción alta de resultados falsos positivos; debido a ello, cuando un animal resulta positivo a la prueba simple, el diagnóstico debe confirmarse con la aplicación de la prueba doble comparativa, ésta permite hacer un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *M. bovis* y aquellos sensibilizados por exposición a otras micobacterias al aplicarse al mismo tiempo el PPD bovino y el PPD aviar (derivado proteico purificado de *M. avium*).<sup>(75)</sup>

Este tipo de sensibilización se atribuye a la reactividad cruzada entre especies de micobacterias y géneros taxonómicamente cercanos como: *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. Pese al empleo del PPD aviar para identificar la sensibilización de los bovinos por micobacterias ambientales, un número importante de reactores al PPD bovino sacrificados no muestra lesiones tuberculosas, debido en muchos de los casos a infecciones

recientes, o bien a infecciones en estado de latencia; de mayor preocupación son los casos de bovinos no infectados por *M. bovis* que resultan reactores al PPD bovino por la sensibilización con antígenos de reacción cruzada de micobacterias ambientales o bacterias relacionadas, como se comentó anteriormente, y que reaccionan al PPD bovino más que al PPD aviar, y por ello son enviados al sacrificio. <sup>(76)</sup>

La prueba de BOVIGAM es un prueba de diagnóstico alterna a la tuberculina, que permite determinar la respuesta inmune celular mediante la evaluación del IFN- $\gamma$  liberado por la estimulación *in vitro* de células sensibilizadas, en este caso en particular, a los antígenos micobacterianos. De manera similar a la prueba doble comparativa se emplean como antígenos el PPD bovino y el PPD aviar para estimular cultivos de sangre completa de los animales. <sup>(77)</sup>

Otro método utilizado para el diagnóstico de TB son las pruebas de ELISA cuyos valores de especificidad y sensibilidad varían de acuerdo al tipo de antígenos seleccionados para su ejecución, así como con el grado de avance de la enfermedad y/o con la heterogeneidad en el reconocimiento serológico de antígenos por los animales enfermos. Este tipo de inmunoensayos, normalmente se emplean como herramienta complementaria en el diagnóstico, ya que permiten detectar animales en estados avanzados de la enfermedad, que en muchos de los casos, por encontrarse en estado de anergia no resultan positivos a la prueba tuberculina. <sup>(45)</sup>

Igual que la prueba de la tuberculina la especificidad de las pruebas de BOVIGAM y ELISA pueden afectarse por la sensibilización de los bovinos por micobacterias ambientales o por bacterias filogenéticamente relacionadas. En particular, dentro del género *Corynebacterium* se encuentran especies con potencial patógeno reconocido para los bovinos, como son: *C. pyogenes*, *C. bovis*, *C. renale* y *C. pseudotuberculosis*, las cuales pueden producir infecciones en el aparato

genitourinario, pielonefritis, mastitis, neumonías, problemas de piel, etc. Mientras que, especies del género habitualmente consideradas parte de la flora normal de esta especie animal actualmente han mostrado su potencial patogénico, tal es el caso de *C. xerosis* y *C. amycolatum*.<sup>(46, 78)</sup>

Debido a que la tuberculosis y las infecciones por *Corynebacterium spp* pueden concurrir simultáneamente en los hatos, y al hecho de que estos microorganismos están estrechamente relacionados se investigaron las consecuencias que tiene la sensibilización de este último microorganismo en las principales pruebas diagnósticas indirectas empleadas para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, fundamentadas en la respuesta inmune.

Dada esta situación se realizó el análisis de un grupo de vaquillas utilizadas para la evaluación de vacunas contra la tuberculosis bovina, de las cuales se recuperó en alto porcentaje *C. xerosis*. Discurriendo sobre la relación taxonómica de este microorganismo con *M. bovis*, se tuvo la inquietud de que su presencia hubiera afectado la respuesta inmune inducida por la vacunación; debido a ello, se realizaron tres estudios independientes para analizar la influencia que pudo haber tenido y/o tiene la presencia de *C. xerosis* en la respuesta inmune de los animales vacunados y/o en las pruebas diagnósticas indirectas empleadas para la tuberculosis bovina; como son: la prueba de la tuberculina, ELISA y IFN- $\gamma$ .

En el primer estudio se utilizaron los sueros de las vaquillas que se vacunaron contra la TB, y los del grupo control sin vacunar para evaluar la posible reacción cruzada ante pruebas de ELISA comparativos empleando como antígenos el EPFC de *M. bovis*, el EPFC de *M. avium* y un antígeno sonicado de *C. xerosis*. El diseño experimental de vacunación contempló: un grupo vacunado con BCG; un grupo vacunado con el EPFC de *M. bovis*; otro grupo vacunado con el EPFC de *M. bovis* pero con un tratamiento previo con IFN- $\gamma$  bovino, y el grupo control.

Antes de iniciar la vacunación las vaquillas de los diferentes grupos mostraban en promedio un nivel bajo de anticuerpos hacia los antígenos de *M. bovis* y *M. avium*, que de acuerdo al punto de corte determinado para esta prueba los animales se consideraron negativos a tuberculosis; <sup>(45)</sup> no obstante, mostraron un nivel mayor de anticuerpos hacia *C. xerosis*, lo cual correlacionó con la presencia de la bacteria en tres de los 26 animales en estudio en esa etapa evaluada. En la semana nueve posvacunación, los niveles de anticuerpos a *C. xerosis* se incrementaron en los diferentes grupos, pero fueron mayores en los grupos control y vacunado con BCG; mientras que, en los animales vacunados con el EPFC aumentaron los anticuerpos primordialmente para *M. bovis*. En la semana dieciocho se registró un aumento importante de anticuerpos a *C. xerosis* para todos los grupos incluyendo el control, siendo no obstante más altos para éste último, lo cual correlacionó con el elevado porcentaje de aislamientos obtenidos de la bacteria, cercano al 56% en el total de los animales. Situación que no afectó la respuesta inmune celular inducida por la vacunación, como lo muestran los resultados de producción de IFN- $\gamma$  obtenidos en ese periodo en los cultivos estimulados con PPD bovino, comparando con aquellos obtenidos con el PPD aviar, los cuales se incrementaron significativamente en los diferentes grupos vacunados, pero fueron incluso mayor para el grupo control, señalando la especificidad en la respuesta inmune a los antígenos de *M. bovis* en los grupos vacunados.

Debido a la estrecha relación taxonómica entre los géneros *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, se considera que el incremento en la producción del IFN- $\gamma$  observado hacia *M. avium* pudo ser efecto de la presencia de las corinebacterias en las fosas nasales de las vaquillas; ya que, después del tratamiento con antibióticos los niveles de IFN- $\gamma$  disminuyeron significativamente en los diferentes grupos.

Consecutivo al desafío con una cepa de campo de *M. bovis* la producción de IFN- $\gamma$  fue altamente significativa en los cultivos estimulados con el PPD bovino para todos los grupos en los diferentes muestreos realizados, más que para los estimulados con el PPD aviar, señalando que pese a la presencia de *Corynebacterium* la respuesta hacia *M. bovis* inducida por la vacunación no se afectó y resultó ser específica en los grupos vacunados, incluso en el grupo control ante el desafío bacteriano. Así, los resultados de producción de IFN- $\gamma$  indican que la presencia de *C. xerosis* influyó más sobre la respuesta inmune celular a *M. avium*, que en la de *M. bovis*.

En el segundo estudio se analizó el comportamiento hacia las pruebas diagnósticas de un grupo de vacas del hato bovino de Cuautitlán Edo. de México - UNAM, que ha mostrado una prevalencia alta de tuberculosis, considerando que la elevada reactividad de los animales del hato se debiera en parte a infecciones por microorganismos relacionados en específico hacia *Corynebacterium*, dada su capacidad y frecuencia reportada para producir diferentes padecimientos en los bovinos, se muestrearon todos los animales del hato para analizar su respuesta inmune a *M. bovis* y a *C. xerosis* a fin de definir la posible reactividad cruzada mediante pruebas de ELISA comparativos.

Los resultados de ELISA comparativos señala diferencias entre los antígenos evaluados en función del tiempo. En el primer muestreo los niveles de anticuerpos fueron más altos a *Corynebacterium*, seguido de los que se registraron para *M. bovis*, observándose un nivel más bajo hacia *M. avium*. En el segundo muestreo también se observaron diferencias entre los antígenos evaluados, pero los niveles fueron preferentemente a *M. bovis*. En tanto que en el tercer muestreo los anticuerpos fueron mas altos para el SNC existiendo diferencia entre los resultados de esta ELISA con la de *M. bovis* y la de *M. avium* pero no entre estos dos últimos ensayos.

Además se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  inducido por el PPD bovino, PPD aviar y sonicado de *C. xerosis* en un grupo animales seleccionados por su repetida reactividad a la tuberculina; al mismo tiempo, se intentó el aislamiento bacteriológico de *Corynebacterium spp* en muestras de exudado nasal, y se realizaron las pruebas de PCR simple y PCR anidada para determinar la presencia de *M. bovis* para identificar las posibles infecciones o coinfecciones por estos microorganismos en los animales.

Los resultados de interferón señalan diferencias en tiempo y en la respuesta hacia los diferentes antígenos; observándose en el primer muestreo los niveles mas altos de producción para el PPD bovino mas que en los otros muestreos realizados posteriormente,  $P < 0.05$ . En ese muestreo la respuesta fue tambien significativa para el PPD aviar pero no mayor a la que se observó con el PPD bovino. La respuesta con el SNC fue baja pero significativa en relación con el control sin estimular.

Para el segundo muestreo la respuesta entre los antígenos de PPD aviar y PPD bovino fue similar y significativa en relación al control y SNC.

En el tercer muestreo la respuesta de IFN-  $\gamma$  fue baja para los diferentes antígenos, no obstante bajo los criterios de la prueba los animales resultaron positivos hacia dichos antígenos, considerando el control sin estimular. Resulta interesante observar que existe un declive en la respuesta de producción de IFN- $\gamma$  hacia los diferentes PPD's conforme el tiempo avanza, lo que contrasta con los niveles de producción basales, que se incrementan en los diferentes muestreos. Situación que difiere con el aumento del número de animales positivos a la prueba de tuberculina doble comparativa. Contrario a estas observaciones el número de animales positivos al PCR anidado para identificar la presencia de *M. bovis*, disminuye en los muestreos. Así, los resultados del incremento de positividad de animales reactores puede ser consecuencia de una inmunidad de memoria establecida por el contacto previo con este microorganismo, ya que el 50% de éstos fue positivo al inicio del estudio. La baja respuesta hacia el PPD

aviar indica la reducida sensibilización de los animales por micobacterias ambientales, no obstante se aisló *Mycobacterium fortuitum* a partir del exudado de fosas nasales de dos vacas del hato.

Para definir la posible participación de *Corynebacterium* en la respuesta de hipersensibilidad tardía hacia *M. bovis*, se tuvo oportunidad de que al momento en que los animales se tuberculinizaron mediante la prueba doble comparativa, se pudo inocular paralelamente una preparación de sonicado y una del extracto proteico de *C. xerosis*, para determinar posibles reacciones cruzadas en las pruebas de hipersensibilidad, en dos periodos de tiempo de cinco meses entre uno y otro; sin observar reacción alguna con los antígenos de este microorganismo en ambas ocasiones evaluadas a diferencia de la reactividad observada con *M. bovis*, lo cual correlacionó con el bajo nivel de IFN- $\gamma$  producido en los cultivos de sangre completa estimulados con los antígenos de *Corynebacterium*; señalando que a pesar de ser un microorganismo taxonómicamente relacionado y de su posible antigenicidad cruzada con el género *Mycobacterium*, un animal reactor al PPD bovino no responde en las pruebas de HT e IFN- $\gamma$  y a los antígenos de *Corynebacterium*, pese a observar niveles de anticuerpos significativos a esta bacteria en las vacas de estudio. El análisis bacteriológico realizado en muestras de exudado nasal fue negativo a *Corynebacterium spp* para todos los animales del grupo en los diferentes muestreos.

Con respecto a las pruebas de hipersensibilidad Acosta y col. <sup>(79)</sup> realizaron un estudio en cabras infectadas naturalmente con *C. pseudotuberculosis* para determinar la posible influencia de éste microorganismo en las pruebas de tuberculina. Las cabras referidas no presentaban antecedentes de tuberculosis, ni reactividad a la prueba de la tuberculina, para el efecto sometieron a los animales a varias intradermorreacciones con PPD bovino y PPD aviar, observando que en ninguna de ellas se indujo un resultado falso positivo, confirmando la especificidad de la prueba de tuberculina con respecto a infecciones por *Corynebacterium*

*pseudotuberculosis*, similar a lo que observaron estos investigadores en la prueba intradérmica, en nuestro estudio también se confirma la especificidad de la tuberculina, puesto que ningún animal positivo al PPD bovino reaccionó a los antígenos de *Corynebacterium xerosis*.

Acosta y col. observaron que existe un incremento en la respuesta inmune humoral hacia los antígenos MPB70 y A60 de *M. bovis* luego de las sucesivas tuberculinizaciones en las cabras infectadas por *C. pseudotuberculosis*. Análogo a estos resultados en los bovinos de FES-Cuautitlán, a pesar de que no hubo aislamientos de corinebacterias de exudados nasales los niveles de anticuerpos fueron altos, consecuencia de la reactividad cruzada entre algunos de los antígenos estructurales y de secreción de *M. bovis* y *Corynebacterium spp.*, como lo es el llamado complejo A60 y los componentes glicolípidicos de la pared celular. (80,81)

Para confirmar los resultados de hipersensibilidad tardía al PPD bovino, se realizó un tercer estudio empleando un modelo experimental de cobayos, en el cual se formaron tres grupos: el grupo 1, inoculado con el EPFC de *M. bovis*; el grupo 2, con el SNC de *C. xerosis* y el grupo 3, el control sin inocular. Los resultados de HT mostraron una mayor respuesta hacia el PPD-bovino en el grupo 1, la cual fue máxima a las 24 h. De igual modo, se registró una respuesta de HT con el PPD aviar observada en el cuadrante 2, siendo menor esta respuesta que la de PPD bovino.

Con los preparados de *Corynebacterium* observada en los cuadrantes 3 y 4 la respuesta de HT fue mucho menor, siendo no obstante el EPSNC en comparación con el SNC el que mostró mayor capacidad para inducir una reacción de hipersensibilidad.

Para el grupo 2 inoculado con el SNC, la mayor respuesta de HT se observó también a las 24 h siendo relativamente similar con los antígenos del PPD aviar, PPD bovino y el extracto proteico de *C. xerosis* respectivamente, no obstante,

dos de los cobayos mostraron lesiones necróticas en el área donde se inoculó el extracto proteico. Cabe mencionar que la HT observada en este grupo no rebasó a la que se registró en el grupo 1, con el PPD bovino. El sonicado de *Corynebacterium* fue incapaz de desarrollar una respuesta de HT importante, pese a que fue utilizado para inocular a este grupo de cobayos; resultados similares de HT al PPD bovino se han reportado en cobayos inoculados con *C. pyogenes* como modelo experimental de infección.<sup>(82)</sup>

De igual modo se ha informado de reacciones no específicas a la tuberculina en borregos y cabras infectadas por *C. pseudotuberculosis*.<sup>(83)</sup>

Los resultados observados en el grupo de cobayos inoculados con SNC, son contradictorios con aquellos observados por Acosta y col., en los que cabras infectadas por *C. pseudotuberculosis* no muestran HT al PPD bovino y al PPD aviar observada en los cuadrantes 1 y 2, situación que puede estar relacionada con el mayor estímulo antigénico suministrado a los cobayos con las repetidas inoculaciones y el uso de adyuvante para tal propósito.

En el grupo 3 se registró una respuesta inflamatoria con ambos PPD, sin embargo esta no fue significativa al compararla con el grupo 1. Ninguna de las preparaciones de *Corynebacterium* indujo respuesta en este grupo.

Llama la atención el hecho de que en el primer estudio realizado para definir la posible interferencia de *Corynebacterium* en las principales pruebas diagnósticas empleadas para la tuberculosis, se notó una respuesta importante en la producción de IFN- $\gamma$  hacia los antígenos de *M. avium* en los animales infectados por *C. xerosis*, éste hecho se asocia indirectamente con la mayor respuesta de HT igualmente con los antígenos del PPD aviar, que se registró en el grupo 2 de cobayos inoculados con el SNC de *C. xerosis*, y en los mismos bovinos del primer estudio.

Así los resultados de los estudios señalan que la presencia de corinebacterias no influye en la respuesta de hipersensibilidad tardía al PPD bovino, pero si puede afectar la respuesta de HT y producción de IFN- $\gamma$  al PPD aviar dando falsos

positivos a este. Situación que puede incluir el empleo de la tuberculina doble comparativa utilizadas en campo y la prueba de BOVIGAM, en la que se utiliza también ambos PPD, bovino y aviar.

Por otro lado, los resultados obtenidos en las diferentes ELISA's realizadas con los sueros de los cobayos indican que un animal infectado con *M. bovis* puede desarrollar una respuesta de anticuerpos a los antígenos de microorganismos relacionados como *Corynebacterium*, y *M. avium*, sin embargo su respuesta de anticuerpos es mayor a los propios antígenos de *M. bovis*. Al parecer, los antígenos comunes o de reacción cruzada se localizan principalmente en la pared celular de estos microorganismos. <sup>(84, 85)</sup>

No obstante, se comprobó que el empleo del ELISA comparativo establecido por Díaz y col. <sup>(43)</sup> fue adecuado para diferenciar la respuesta de anticuerpos específica hacia *M. bovis*, de aquella debida a la sensibilización por otras micobacterias y microorganismos relacionados, similar al uso y propósito que tiene la prueba de tuberculina doble comparativa.

En tanto que, la respuesta humoral de un animal infectado por *Corynebacterium* no muestra reactividad a los antígenos micobacterianos, solo responde a sus propios antígenos.

De acuerdo a las observaciones de los tres estudios realizados, las pruebas diagnosticas tradicionalmente empleadas para identificar animales tuberculosos no se afectan por la presencia de infecciones causadas por el género *Corynebacterium*, existiendo cierto grado de sensibilización que se refleja más en la reactividad hacia los antígenos de *M. avium* por lo que se recomienda que en las pruebas se incluya la evaluación comparativa entre *M. bovis* y *M. avium* para confirmar las infecciones por *M. bovis*.

## 9. CONCLUSIONES

1. En este trabajo la coinfección por *Corynebacterium spp*, no tiene influencia sobre las pruebas de tuberculina empleada para diagnóstico e identificación de un bovino tuberculoso.
2. La presencia o infección por *Mycobacterium bovis* si puede influir en las pruebas diagnosticas que se empleen para aquellas enfermedades producidas por *Corynebacterium* basadas en la respuesta inmune humoral.
3. En el modelo experimental de cobayos inoculados el sonicado de *C. xerosis* se induce hipersensibilidad tardía al PPD aviar, PPD bovino y a los propios antígenos de *Corynebacterium*; no obstante, la respuesta fue mayor al PPD aviar.
4. Por ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) se comprueba que la respuesta de anticuerpos en cobayos inoculados con SNC es propia a los antígenos de *C. xerosis*.
5. En cobayos inoculados con el EPFC de *M. bovis* se induce una respuesta de anticuerpos compleja, tanto a los propios antígenos de la especie, como a antígenos comunes a los géneros taxonómicamente relacionados.

6. La coinfección por corinebacterias no influye en la respuesta de hipersensibilidad tardía al PPD bovino, pero si puede afectar la respuesta de hipersensibilidad tardía y producción de IFN- $\gamma$  al PPD aviar en los bovinos.
  
7. Es recomendable que en las pruebas diagnósticas se incluya la evaluación comparativa entre *M. bovis* y *M. avium* para confirmar las infecciones por bacterias del complejo *M. tuberculosis*.

## 10. ANEXO

### 10.1 GLOSARIO

|   |   |
|---|---|
| ADN   | Ácido desoxirribonucleico                               |
| BCG   | Bacilo Calmette-Guérin                                  |
| BHI   | Infusión cerebro corazón                                |
| ° C   | Grados centígrados                                      |
| cm  | Centímetros   |
| DO  | Densidad óptica   |
| ELISA   | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas             |
| EPFC  | Extracto Proteico de Filtrado de Cultivo                |
| EPSNC   | Extracto proteico de sonicado de <i>Corynebacterium</i> |
| h   | Hora  |
| ID  | Intradérmica  |
| IFN- $\gamma$                                   | Interferón - gamma                                      |
| KDa   | Kilodaltones  |
| LAM   | Lipoarabinomanosa                                       |
| mAGP  | Micolil-arabinogalactano-peptidoglicano                 |
| ml  | Mililitros  |
| $\mu$ l   | Microlitros   |
| $\mu$ m   | Micrómetros   |
| NaCl  | Cloruro de sodio  |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Sulfato de amonio                                       |

|       |  |
|-------|--|
| nm    | Nanómetros                               |
| PBS   | Solución amortiguadora de fosfatos       |
| PBST  | Solución amortiguadora de fosfatos tween |
| PCC   | Prueba cervical doble comparativa        |
| PCR   | Reacción en cadena de la polimerasa      |
| pH    | Potencial de hidrógeno                   |
| PIM   | Monóxidos de fosfatidil inositol         |
| PPD   | Derivado proteico purificado             |
| SNC   | Sonicado de <i>Corynebacterium</i>       |
| Subsp | Subespecie                               |
| TB    | Tuberculosis bovina                      |
| UFC   | Unidades formadoras de colonias          |
| URT   | Tracto respiratorio superior             |

## 10.2 SOLUCIONES

### **SOLUCION DE PEGADO.**

Buffer de Carbonatos 0.06 M pH 9.6  
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 3.8gr/L  
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1.93gr/L  
Agua destilada 1L

### **SOLUCION DE LAVADO.**

Buffer Fosfatos (PBS) pH 7.4 con NaCl y 0.1 % de Tween 20  
Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1gr/L  
Fosfato sódico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32gr/L  
Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/L  
Tween 20 0.5ml/L  
Agua destilada 1L

### **SOLUCION BLOQUEADORA.**

Leche descremada en PBS y de Tween 20 al 0.1%  
Fosfato disódico hidrogenado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.1gr/L  
Fosfato sódico dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.32gr/L  
Cloruro de sodio (NaCl) 8.5gr/L  
Tween 20 0.5ml/L  
Leche descremada en polvo 1.5 gr/100ml  
Agua destilada 1L

### **SOLUCION DE REVELADO.**

Buffer citratos pH 4.5  
Acido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) 4.6 gr/L  
Citrato trisódico ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 7.4 gr/L  
Agua destilada 1L

Agregar al momento de su empleo:

Ortofenildiamina 4 $\mu$ g/10ml

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

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Cousins VD. Manual de normas para las pruebas de diagnóstico y las vacunas para animales terrestres 2008;2.4.7.  
[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.07\\_BOVINE\\_TB.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVINE_TB.pdf)
2. Bernard D. Tratado de Microbiología. 4ªed.México: Salvat Editores S.A. 1987:868-889.
3. [http://www.salud.gob.mx/docprog/estrategia\\_2/tuberculosis.pdf](http://www.salud.gob.mx/docprog/estrategia_2/tuberculosis.pdf).
4. Núñez RGM, Salinas MAM, Villarreal RE, Garza EME, González RF. Riesgo nutricional en pacientes con tuberculosis pulmonar: ¿cuestión del paciente o de los servicios de salud? Salud pública Méx, 2000;42(2):126-132.
5. Roldan MC. La tuberculosis: un fenómeno de edad, inmunosupresión y factores ambientales. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Corporación Universitaria Rafael Núñez. Cartagena (Bolívar), Colombia, 2010;2:78-86.
6. [http://www.who.int/whosis/whostat/ES\\_WHS10\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS10_Full.pdf).
7. <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/es/>
8. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem11/pdf/edit1112.pdf>
9. <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/descargas/pdf/guiaatenpacmfr.pdf>
10. [http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/proy\\_prog/14.\\_pct.pdf](http://www.spps.gob.mx/images/stories/SPPS/Docs/proy_prog/14._pct.pdf)
11. Rowe MT, Donaghy J. *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. International Journal of Dairy Technology,2008;61 (4) 317–326.
12. Torres LR. Correlación histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina con la presencia de *Mycobacterium bovis* Analizada mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Tesis de licenciatura) Cuautitlán Izcalli, Edo de Mex.2005.

13. Pérez GL, Milián SF, Díaz AC, Romero TC, Escartín ChM,. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud pública Méx* 2008;50(4) 286-291.
14. Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities. *Emerg. Infect. Dis. United States* 2008;14:909–916.
15. Harris NB, Payeur J, Bravo D, Osorio R, Stuber T, Farrell D, Paulson D, Treviso S, Mikolon A, Rodriguez LA, Cernek HS, Rast R, Ginsberg M, Kinde H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese Originating in Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007;73(3)1025–1028.
16. Milián SF, Pérez GL, Arriaga DC, Escartín ChM. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med.* 2010.97(1):37-44.
17. Zendejas MH, Milián SF, García CL, Cruz BG, Anaya EAM, Huitrón MG. La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina. *Téc Pecu Méx* 2007;45(3):279-278.
18. Zendejas MH, Milián SF, Cuador GJQ, Cruz BG, Anaya EAM, Huitrón MG et al. Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. *Vet Ital* 2007;43(3):629-634.
19. [http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs\\_18a\\_reunion/salon1miercoles900a1200/Jose\\_Alfredo\\_Gutierrez\\_Reyes.pdf](http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs_18a_reunion/salon1miercoles900a1200/Jose_Alfredo_Gutierrez_Reyes.pdf)
20. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/2010/diciembre/Documents/2010B565.pdf>
21. Rivera P, Giménez JF. La tuberculosis bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *Red Vet.* 2010;11:1695-7504.
22. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res. Vet. Sci.* 2003; 74:1-15.

23. [www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf)
24. Herrera LL, Pozuelo DR, Molina MT, Valverde CA, Saiz VP, Jiménez PMS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9):496–502
25. <http://hera.ugr.es/tesisugr/18585930.pdf>
26. 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 Department Agriculture Ames, Iowa. 1993;14-37.
27. [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/man\\_tbc.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_tbc.pdf).
28. Daffé MP, Draper: The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology* 1998;39, 131-203.
29. <http://egamor.blogspot.mx/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html>
30. Besra GS, Morehouse CB, Rittner CM, Waechter CJ, Brennan PJ. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J Biol Chem*. 1997; 272:18460–18466.
31. Davis D, Dulveco R. Eisen H, Ginseberg H. *Tratado de Microbiología*. 3ª ed. España. Salvat Editores. 1990.
32. Chang Z, Choudary A, Lathigra R, Quioco FA. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269:1956-1958.
33. Rees AD, Roman E, Moreno C. The effect of lipoylation on human epitope specific CD4 T-cell recognition of the 19, 000 MW mycobacterial antigen. *Immunol*. 1993; 80: 407-414.
34. Wiker HG, Harboe M. The antigen 85 complex: a majors secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Res* 1992; 56:648-661.
35. Rojas EO, Cabrera CR. Desarrollo de inmunógenos y vacunas contra lepra y tuberculosis. *Vacunas* 2000; 249-260.

36. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández de Larrea C, Rivas SB. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico: Revisión. Invest. clín. 2008, vol.49, no.3, p.411-441.
37. <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9.htm>.
38. Rodger JD, Connery NL, McNair, Welsh MD, Skuce RA, Bryson DG, et al. Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: A novel model to study bovine tuberculosis. Tuberculosis 2007;87:405–414
39. Ferrufino JC. Patología de la tuberculosis pulmonar <http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/4-2/v4n2ce4.pdf>.
40. [www.life.umd.edu/.../Corynebacterium.htm](http://www.life.umd.edu/.../Corynebacterium.htm)
41. Lennette HE, Edwin H, Spaulding, Earle H, Truant JP. Manual de microbiología clínica. Salvat Barcelona 1981. Cap 12 130-134.
42. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica. 18ª ed. Editorial Manual Moderno 2005 .343-352.
43. Cummins C.S. Chemical Composition and Antigenic Structure of Cell Walls of *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* and *Arthrobacter*. J. Gen Microbiol.(1962), 28,35-50.
44. Ruiz L, Barrera VG, Frias MM,. Linfadenitis Caseosa I: Aspectos históricos, etiológicos y clínicos.RECVET Revista Electrónica de Clínica Veterinaria ISSN;II(8),Agosto,2007
45. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriaga DC, González SD, Estrada-Chávez C. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares.Vet Méx 2003;34(1):13-26
46. Vela AI, García E, Fernández A, Domínguez L, Fernández GJF. Isolation of *Corynebacterium xerosis* from Animal Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol.2006;44: 2242-2243.
47. <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n080807/080707.pdf>.
48. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez.htm>

49. González SD, Díaz OT, Jaramillo ML, Santillán FM, Erazo GR, Díaz AC. Detección y descripción anatomopatológica de tuberculosis en una colonia de Ankole-Watusi. Técnica pecuaria en México; 2007.45,(001),101-109.
50. Sánchez R, Rosadio AR. Prevalencia de la Tuberculosis Bovina en la provincia de Parinacochas, Ayacucho Rev. Investig. Vet. Perú; 2002:13(2) 100-102.
51. Gormley E, Doyle ME, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay Veterinary Microbiology 112 (2006) 171–179
52. Tizard IR. Inmunología veterinaria. 8va ed. Ed McGraw Hill Interamericana, México 2009.
53. NOM-031-ZOO-1995 "Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina".
54. Estrada CC, Díaz OF, Arriaga DC, Villegas SN, Pérez GR, González SD. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet Méx 2004;35(3):225-236.
55. Zenteno CR, Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2003;16(3): 181-186.
56. Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. Veterinary Record 2000;146, 236-242
57. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández LC, Rivas SB. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Invest Clin 49(3): 411 - 441, 2008.
58. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Austr Vet J 1990;67(4):134-137.
59. 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: 286-29
60. Zumárraga JM, Meikle V, Bernardelli A, Abdala A, Tarabla H, Romano RI, Catald A. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J Vet Diagn Invest 2005 17:232–238.
  61. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiología. Hospital Clinic i Provincial, Barcelona. España. <http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t12.pdf>
  62. Wood PR, Ripper J, Radford AJ, Bundesen PG, Rylatt DB, Cottis LE, John M, Plackett P. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. J Gen Microbiol 1988;(134):2599-2604
  63. Milián SF, Harris B, Arriaga DC, Thomsen B, Stuber T, González SD, Álvarez OG, Santilla FMA, Morales LA, Estrada CC. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Rev Mex Cienc Pecu 2010;1(4):403-415.
  64. Skinner MA, Wedlock DN, Buddle BM. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. Rev. Sci Tech. 2001. 20;112-132.
  65. González SD, Díaz OF, Jaramillo ML, Pérez GR, Padilla UJ, Santillán FMA, Arriaga DC, Bojórquez NL. Evaluación de diferentes inmunogénos contra la tuberculosis bovina mediante la presencia de lesiones a la necropsia. Revista Veterinaria México 38(3) 271-284, 2007
  66. Díaz OF, Padilla J, Jaramillo L, González SD, Arriaga DC “Evaluation of BCG vaccine and *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins against bovine tuberculosis”. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1149:306-8.
  67. Díaz OF, García CL, Estrada ChC, Vega LMA, Banda RV, Arriaga DC. Respuesta inmune humoral de cobayos hacia componentes proteicos de Micobacterias. Téc Pecu Méx 2002;40(2):157-164.

68. 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.
69. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, Mc Cornick 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.
70. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edin)* 2001;81:147-155.
71. Morales LA, Peñuelas UK, Álvarez OG, Martínez VI, Maldonado J, Mendoza DG, Milián SF. Correlación entre PCR en exudado nasal y la relación de la tuberculina para la detección de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos. *Rev. Sci.* 2008;1:17-21.
72. Van Soolingen D, De Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. Manual for fingerprinting of *M. tuberculosis* strains. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection, 1995.
73. Cousins VD, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction from rapid diagnostic of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30:255-258.
74. Point Richmond, CA, USA, 2006.
75. [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.3.03\\_Tuberculosis\\_bovina.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.03_Tuberculosis_bovina.pdf)
76. De la Rúa-DR., Goodchild, AT, Vordermeier, H.M., et al. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81 (2)190-210.
77. Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of  $\gamma$ -interferon. *Res. Vet. Sci.* 1990;49: 46.

78. Homme J, Devriese LA, Vaneechoutte M, Riegel P, et al. Identification of Nonlipophilic Corynebacteria Isolated from Dairy Cows with Mastitis. *J. Clin. Microbiol.*1999;37: 954-957.
79. Acosta HB, Real VF, León VL, Santana GP, Ferrer QO, Déniz SS. Influencia de realizar sucesivas intradermorreacciones en ganado caprino infectado de forma natural por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. XX Jornadas Científicas de la SEOC. Madrid. Septiembre de 1995
80. Cocito C, Vanlinden F. Composition and immunoreactivity of the A60 complex and other cell fractions from *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol.* 1995;41:179-187.
81. Julian E, Cama M, Martínez P, Luquin M. An ELISA for five glycolipids from the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Tween 20 interference in the assay.*Journal of Immunological Methods.*2001; 251 (1-2), pp. 21-30.
82. Canham AS. The double intradermal test for tuberculosis in cattle, with reference to the "no lesion" reactor, nonspecific reactions and the part played by saprophytic acid fast organisms in causing sensitization to bovine and human tuberculin UNISA DVSc, 1941.
83. Shukla R, Nath N, Singh G. Observations on non-specific reactions to tuberculin in sheep and goats with *Corynebacterium ovis*. *Experientia*1970;27(2),204-205.
84. Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH. Cross-reactions between mycobacteria. II.Crossed immunoelectrophoresis analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. *Scand J Immunol* 1979; 9:115-24.
85. Abou ZC, Harboe M, Sundsten B, Cocito C. Cross-Reactivity of Antigens from the Cytoplasm and Cell Walls of Some Corynebacteria and Mycobacteria. *J Infect Dis.*1985; 151(1): 170-178