



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Asociación de la respuesta inmune con la resistencia natural a
patógenos intracelulares en ganado bovino”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.**

PRESENTA:

MARÍA ELENA AUCANCELA YUNGANLA

Tutor principal:

José Ángel G. Gutiérrez Pabello, FMVZ, UNAM.

Comité tutor:

Juan Joel Mosqueda Gualito, FCN, UAQ.
Miguel Ángel Alonso Díaz, FMVZ, UNAM.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Noviembre, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

ASOCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CON LA RESISTENCIA NATURAL A PATÓGENOS INTRACELULARES EN GANADO BOVINO.

Una estrategia para controlar o erradicar las principales enfermedades en un hato bovino, es la búsqueda de animales con alto grado de resistencia natural, la cual se ha relacionado con el sistema inmune. El grado de resistencia o susceptibilidad a microorganismos intracelulares en bovinos se ha caracterizado mediante ensayos microbicidas en macrófagos. El objetivo del presente trabajo fue asociar la respuesta inmune humoral y celular, consistente en la producción de anticuerpos (IgG) y de IFN- γ , respectivamente (contra *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*) con el fenotipo de resistencia natural a patógenos de vida intracelular, en ganado bovino *Bos taurus indicus* previamente caracterizados como resistentes o susceptibles. La producción de anticuerpos determinada mediante las técnicas de ELISA indirecta e Inmunofluorescencia indirecta, así como la producción de IFN- γ , determinada mediante un ensayo de liberación de IFN- γ , fueron evaluados en 20 bovinos, 10 caracterizados como resistentes y 10 como susceptibles. Se encontró una mayor producción de anticuerpos contra *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, en el grupo de bovinos susceptibles que en los resistentes ($p < 0.05$). La producción de anticuerpos contra *Babesia bigemina*, fue mayor en el grupo resistente que en el susceptible ($p < 0.05$). No hubo diferencia estadística significativa en la producción de anticuerpos contra *Anaplasma marginale* entre bovinos resistentes y susceptibles ($p > 0.05$). En ninguna de las muestras analizadas se observó producción de IFN- γ , por lo tanto, únicamente se pudo analizar la asociación entre producción de anticuerpos y el fenotipo. Determinando que una mayor producción de anticuerpos está asociada con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad para *Babesia bigemina* y MAP, respectivamente. Se concluye que existe una asociación entre la respuesta inmune humoral y la resistencia natural, pero se sugiere que es dependiente del antígeno.

Palabras clave: bovinos *Bos taurus indicus*, Resistencia natural, anticuerpos, IFN- γ

ABSTRACT

ASSOCIATION OF THE IMMUNE RESPONSE WITH NATURAL RESISTANCE TO INTRACELLULAR PATHOGENS IN CATTLE.

A strategy to control or eradicate the main diseases in a cattle herd is the search for animals with a high degree of natural resistance, which has been related to the immune system. The degree of resistance or susceptibility to intracellular microorganisms in bovines has been characterized by microbicidal tests on macrophages. The aim of the present work was: associate the humoral and cellular immune response, consisting of the production of antibodies (IgG) and IFN- γ , respectively (against *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*, and *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*) with the phenotype of natural resistance to intracellular living pathogens, in *Bos taurus indicus* bovines previously characterized as resistant or susceptible. Antibody production determined by indirect ELISA and indirect immunofluorescence assays, as well as IFN- γ production, determined by an interferon-gamma release assay, were evaluated in 20 bovines, 10 characterized as resistant and 10 as susceptible. Higher production of antibodies against *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* was found in the group of susceptible cattle than in the resistant ones ($p < 0.05$). The production of antibodies against *Babesia bigemina* was higher in the resistant group than in the susceptible group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the production of antibodies against *Anaplasma marginale* between resistant and susceptible cattle ($p > 0.05$). In none of the samples analyzed, IFN- γ production was observed, therefore, only the association between antibody production and phenotype could be analyzed. Overall, that higher production of antibodies is associated with the resistance or susceptibility phenotype for *Babesia bigemina* and MAP, respectively. It is concluded that there is an association between the humoral immune response and natural resistance, but it is suggested that it is dependent on the antigen.

Keywords: *Bos taurus indicus* bovines, Natural resistance, antibodies, IFN- γ

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres, Jaime Aucancela y Carmen Yunganaula + ejemplo de humildad, y esfuerzo que me han impulsado a alcanzar todos mis sueños.

A ti mamá que a donde vaya, siempre te llevo en mi corazón.

A todos mis amigos, que he tenido la fortuna de conocer a lo largo de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me ayudaron y me abrieron las puertas para poder llevar a cabo de la mejor manera la maestría y adquirir nuevos conocimientos y habilidades.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por la oportunidad que me dio para formar parte de su equipo de investigación en el laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis de la FMVZ, por sus consejos, su apoyo y confianza.

Al CEIEGT, por todo el apoyo para llevar a cabo el experimento.

A los integrantes del Comité Tutoral, Jurado y Maestros por su apoyo y disponibilidad: Dr. Miguel A. Alonso Díaz, Dr. Juan J. Mosqueda Gualito, Dr. Sergio Darío Rodríguez, Dr. Marco Antonio Santillán, Dra. Leticia Galindo Rodríguez, Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dra. Gladis del Carmen Fragozo González, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dr. Diego Josimar Hernández, Dr. Rodrigo Morales, Dra. Elizabeth Salinas, Dr. Francisco Preciado de la Torre, Blgo. Omar Cortéz Hernández.

Al programa de becas CONACYT y al proyecto PAPIIT IG200918.

Al Dr. Antonio J. Vallecillo Maza por su apoyo, sus consejos y porque gracias a usted pude contactar con el equipo de investigación que me abrió las puertas en México.

A mis compañeros del grupo de investigación a cargo del Dr. Gutiérrez Pabello, a cada uno gracias por su amistad, por sus consejos, por su apoyo a lo largo de este tiempo y sobre todo por hacerme sentir parte de este equipo que lo considero como una familia.

Infinitas gracias a mis padres, porque sin importar las dificultades siempre me apoyan para que yo pueda cumplir todos mis sueños, por sus sabios consejos ya que gracias a ellos hoy he logrado alcanzar una meta más en mi vida.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1 SISTEMA INMUNE	10
2.1.1 Sistema inmune innato	10
2.1.2 Sistema inmune adaptativo	11
2.2 Respuesta inmune celular	11
2.2.1 Interferón gamma (IFN- γ)	13
2.3 Respuesta inmune humoral	13
2.4 RESISTENCIA NATURAL	16
2.5 BABESIOSIS BOVINA	19
2.5.1 Respuesta inmune en bovinos	20
2.6 ANAPLASMOSIS BOVINA	21
2.6.1 Respuesta inmune en bovinos	22
2.7 PARATUBERCULOSIS BOVINA	23
2.7.1 Respuesta inmune en bovinos	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 OBJETIVO GENERAL	27
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1 Población de estudio	28
6.2 Colecta, conservación y transporte de las muestras de sangre.	29
6.3 RESPUESTA INMUNE HUMORAL	29
6.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra <i>B. bigemina</i>	29
6.3.2 ELISA-indirecto para medir la producción de anticuerpos contra <i>A. marginale</i>	30
6.3.3 ELISA-indirecto para medir la producción de anticuerpos contra MAP	32
6.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR	33
6.4.1 Obtención de los antígenos	33

6.4.2	Determinación de la producción de IFN- γ	33
6.5	Correlación entre la producción de anticuerpos y el fenotipo.....	35
6.6	Aislamiento e identificación de <i>Mycobacterium avium</i> sp. <i>paratuberculosis</i>	35
6.6.1	Cultivo	35
6.6.2	Microscopía	36
6.7	Variables del estudio.....	36
6.8	Análisis estadístico.....	36
7.	RESULTADOS	37
7.1	RESPUESTA INMUNE HUMORAL.....	37
7.1.1	Anticuerpos contra <i>B. bigemina</i> (IFI indirecta).....	37
7.1.2	Anticuerpos contra <i>A. marginale</i> (ELISA indirecto).....	39
7.1.3	Anticuerpos contra <i>M. avium</i> sp. <i>paratuberculosis</i> (ELISA indirecto)	41
7.1.4	Correlación entre la producción de anticuerpos y el fenotipo	42
7.2	RESPUESTA INMUNE CELULAR	44
7.2.1	Ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA).....	44
7.3	Aislamiento e identificación de MAP	47
8.	DISCUSIÓN	49
9.	CONCLUSIONES	59
10.	REFERENCIAS	60
11.	ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antígenos utilizados para estimular a los linfocitos en cultivos de sangre completa.....	333
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Proceso de activación de linfocitos B.....	14
Figura 2.- Estructura típica de un anticuerpo.....	166
Figura 3.- Frotis teñidos con Giemsa.....	20
Figura 4.- Glóbulos rojos infectados con <i>Anaplasma marginale</i>	222
Figura 5.- Inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos a <i>Babesia bigemina</i>	388
Figura 6.- Producción de anticuerpos específicos contra <i>Babesia bigemina</i>	399
Figura 7.- Producción de anticuerpos específicos contra <i>Anaplasma marginale</i>	4040
Figura 8.- Producción de anticuerpos específicos contra <i>Mycobacterium avium</i> sp. <i>paratuberculosis</i>	422
Figura 9.- Correlación de Spearman entre producción de anticuerpos y el fenotipo.....	433
Figura 10.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de <i>Anaplasma marginale</i>	455
Figura 11.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de <i>Mycobacterium avium</i> sp. <i>paratuberculosis</i>	455
Figura 12.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de <i>Babesia bigemina</i>	466
Figura 13.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de <i>Anaplasma marginale</i> y al PPDA en cultivo de sangre completa de bovinos.....	477
Figura 14.- Aislamiento e identificación de MAP.....	488

ABREVIATURAS

NK: Células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*)

TNF α : Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*)

ON: Óxido nítrico

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, del inglés *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)

PBS: Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*)

HRP: Peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*)

OPD: Diclorhidrato de orto-fenilendiamina (OPD, del inglés *o-phenylenediamine dihydrochloride*)

PPDA: Derivado proteico purificado de una cepa de *Mycobacterium avium*

BCR: Receptor de células B (BCR, del inglés *B cell receptor*)

TCR: Receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*)

IGRA: Ensayo de liberación de interferón-gamma (IGRA, del inglés *interferon-gamma release assay*)

MAP: *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ganadera bovina es una de las actividades más importantes y dinámicas a nivel mundial, que se ha ido incrementado sobre todo en los países en desarrollo, debido a la gran demanda de productos pecuarios por parte de los grandes mercados mundiales (Thornton, 2010; Borboa y Aguirre, 2018). Así, en un análisis de proyección se define que la demanda mundial de productos cárnicos bovinos incrementa a un ritmo anual de 1.2% entre 2007-2050 (Alexandratos, 2012). En México, la ganadería bovina también ha tenido un crecimiento sostenido durante la última década (Nájera, 2016). De tal forma que, se ha registrado un crecimiento anual de 1.8% en producción de carne de bovino entre 2007-2016 (DIEES, 2017). La producción bovina es la segunda actividad productiva de mayor difusión en las zonas rurales, después de la actividad agrícola, debido al suministro de carne, leche y sus derivados, siendo el ganado bovino el de mayor consumo en México (Rodríguez *et al.*, 2018, SAGARPA, 2018). Esta condición exige a los ganaderos ser más eficientes, sobre todo en el área de salud animal para poder comercializar productos inocuos para el consumo humano. En la actualidad existe el desafío de enfermedades causadas por una gran variedad de patógenos, muchos de estos de vida intracelular.

En las zonas tropicales y subtropicales del mundo, el ganado bovino se enfrenta a enfermedades transmitidas por garrapatas, como la babesiosis y la anaplasmosis (OIE, 2008; Bock *et al.*, 1999). Mientras que en el ganado lechero especializado la paratuberculosis o enfermedad de Johne, que es una enteritis granulomatosa de curso crónico transmitida a través de las heces y de la leche, es una de las principales enfermedades con distribución mundial (Martínez *et al.*, 2012).

Considerando la importancia de estas enfermedades y muchas otras en los hatos bovinos, es necesario tomar medidas sanitarias, de nutrición y de manejo adecuadas en las explotaciones ganaderas. La prevención y/o el control, de estas enfermedades causadas por patógenos intracelulares se ha basado

tradicionalmente en el uso de antibióticos, pesticidas, vacunación, diagnóstico, cuarentena y/o sacrificio. Sin embargo, estas medidas en ciertos casos no han sido muy eficientes y han generado complicaciones adicionales, como la presencia de sustancias químicas en los productos de origen animal para consumo humano, desencadenando pérdidas económicas para los ganaderos, y problemas de salud pública (Templeton, 1988). Así también, las restricciones que se presentan para poder realizar un efectivo control y eliminación de patógenos y sus vectores, como en el caso de enfermedades transmitidas por ectoparásitos, hacen necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.

Se han realizado varios estudios relacionados con resistencia natural en bovinos a ciertos patógenos. Siendo una alternativa que podría resultar favorable para el control de muchas enfermedades, el hecho de poder generar animales resistentes a ciertas enfermedades. Esta resistencia natural puede estar asociada con varios factores inherentes al huésped, uno de estos la respuesta del sistema inmune.

2. ANTECEDENTES

2.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmune (SI) está constituido por células y moléculas responsables de la defensa contra microbios infecciosos, sustancias extrañas no infecciosas o productos de células dañadas. De tal forma que la función básica del SI es mantener la homeostasis del tejido y la integridad del sistema, formando parte de procesos como desarrollo, reproducción y curación de heridas (Bertoni *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2018). El SI se divide en dos grandes grupos de mecanismos: innato y adaptativo.

2.1.1 Sistema inmune innato

El SI innato es un grupo de mecanismos inespecíficos que funcionan como la primera defensa que monta el organismo contra microbios, células dañadas o cualquier agente extraño. Entre los principales componentes de la inmunidad

innata están las barreras físicas y químicas, células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y otras células linfocíticas innatas como las NK, proteínas sanguíneas, incluidos miembros del sistema de complemento. Células como los macrófagos residen en varios tejidos y órganos, los mastocitos están presentes en piel y epitelios mucosos, y las células dendríticas se encuentran en epitelios, circulación sanguínea y órganos linfáticos; donde actúan como centinelas ante la presencia de microorganismos invasores. Los macrófagos y células dendríticas tienen funciones como: fagocitosis, presentación de antígenos y producción de citocinas, lo cual favorece a la eliminación de los antígenos. De tal forma que la respuesta inmune innata combate a los microbios mediante la inflamación proceso que recluta fagocitos y leucocitos, además actúa bloqueando la replicación del agente extraño (Banchereau y Steinman, 1998; Varol *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2018).

2.1.2 Sistema inmune adaptativo

El SI adaptativo es un conjunto de mecanismos de defensa que genera memoria inmunológica específica después de la exposición a un antígeno, de tal forma que monta una respuesta reforzada frente a exposiciones subsecuentes a un mismo antígeno. Además, se caracteriza por su especificidad, ya que los linfocitos tienen la capacidad de reconocer los epítopos del antígeno. Las poblaciones celulares fundamentales en esta respuesta son los linfocitos T y B, que expresan distintos receptores específicos para el antígeno, y activan una serie de factores como la muerte de células propias alteradas, liberación de citocinas como IFN-gamma (IFN- γ), y la secreción de anticuerpos específicos que opsonizan y neutralizan a los antígenos. Existen dos tipos de respuesta inmune adaptativa: la inmunidad celular y la inmunidad humoral (Litman *et al.*, 2010; Cadavid, 2011; Abbas *et al.*, 2018).

2.2 Respuesta inmune celular

Esta respuesta está mediada por los linfocitos T, que se originan en medula ósea, se seleccionan y maduran en timo, estos reconocen antígenos peptídicos unidos a

moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), y a diferencia de los linfocitos B no reconocen antígenos solubles, por lo que esta respuesta se monta principalmente frente a microorganismos intracelulares o fagocitados por las células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*). La interacción de los linfocitos T con el antígeno ocurren en los órganos linfoides secundarios como: bazo, ganglios linfáticos y tejido linfático mucoso, donde los antígenos son presentados por las APC. Luego de la interacción del linfocito T a través de su TCR, con el antígeno en la molécula del MHC, se activan los linfocitos T, se da una expansión clonal y se genera una población de linfocitos T efectores y de memoria. Dependiendo del origen de los péptidos (intracelular o extracelular) son presentados por las moléculas de MHC a los linfocitos T, así péptidos de origen intracelular son presentados por moléculas MHC de clase I a los linfocitos T CD8+ que tienen actividad citotóxica para destruir células infectadas, mientras que péptidos de origen extracelular son presentados por moléculas MHC de clase II a los linfocitos TCD4+, los cuales secretan citocinas para la comunicación con otras poblaciones celulares. Aunque también puede ocurrir un fenómeno de presentación cruzada, ya que, algunas células dendríticas tienen la capacidad de capturar e ingerir células infectadas por virus o células tumorales, y presentar los antígenos a través de moléculas de MHC de clase I a los linfocitos TCD8+ (Van den Elsen *et al.*, 1998; Szabo *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2018). Existen varios subgrupos de linfocitos TCD4+, y cada uno actúa frente a un tipo de microorganismo patógeno. Linfocitos como Th1 se caracterizan por producir IFN- γ el cual activa a los macrófagos para destruir microbios intracelulares, y los linfocitos Th2 producen citocinas como Interleucina (IL)-4, IL-5, e IL-13 que activan a los eosinófilos y mastocitos frente a parásitos helmínticos, y también IL-10 que inhiben ciertas funciones de los macrófagos (Gutiérrez, 2010; Abbas *et al.*, 2018). Además, los linfocitos Th2 son importantes en la respuesta inmune humoral, ya que a través de las citocinas que secretan regulan la producción de anticuerpos para luchar contra microorganismos extracelulares (Kidd, 2003).

2.2.1 Interferón gamma (IFN- γ)

Es una proteína homodimérica conocida como interferón inmune tipo II, producida por linfocitos TCD4+, NK, TCD8+ y células T γ/δ . Se produce en respuesta a la activación de receptores situados en la superficie de células infectadas o estresadas, luego del reconocimiento de un antígeno, por estimuladores de células T como la fitohemaglutinina o la concanavalina-A, o por la acción de citocinas como la IL-12 y la IL-18. El IFN- γ induce la transcripción de genes que intervienen en procesos inmunomoduladores, antivirales y antiproliferativos, así tiene la capacidad de incrementar la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos; también induce la diferenciación de linfocitos TCD4+ hacia el subgrupo Th1 inhibiendo el desarrollo de linfocitos Th2 y Th17; aumenta la expresión de las moléculas del MHC tipo I y II; y actúa sobre los linfocitos B lo que promueve a la producción de anticuerpos del isotipo IgG. Además, esta proteína tiene actividad proinflamatoria, ya que induce la expresión de citocinas como: IL-12, IL-15, TNF α y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), por lo que se considera forma parte importante de la inmunidad innata y adaptativa (Frucht *et al.*, 2001; Schroder *et al.*, 2004; Mata-Espinosa y Hernández-Pando, 2008).

2.3 Respuesta inmune humoral

La inmunidad humoral se caracteriza por la secreción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas que se diferencian de los linfocitos B, células que son producidas en la médula ósea y que, después de seleccionarse y diferenciarse, se almacenan en los órganos linfoides secundarios. La secreción de anticuerpos puede ser dependientes o independientes de linfocitos T, lo cual está condicionado por la naturaleza del antígeno (Golub, 1986). Así en caso de antígenos proteínicos es necesario la intervención de linfocitos T cooperadores, los cuales activan a las células B, estas proliferan y producen anticuerpos diferentes a IgM, lo cual se conoce como cambio de isotipo. Conforme se desarrolla la respuesta, aumenta la afinidad de los anticuerpos por los antígenos, a esto se conoce como maduración de la afinidad. Además de estos cambios, los

linfocitos T estimulan a las células B que se diferencien en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria (Abbas *et al.*, 2018).

En caso de antígenos no proteicos como los polisacáridos, glucolípidos y ácidos nucleicos, las células B no necesitan de linfocitos T para activarse. Estos antígenos están compuestos de epítopos antigénicos repetidos idénticos, los cuales pueden inducir un entrecruzamiento del complejo BCR en linfocitos B específicos, lo que lleva a su activación. Esta respuesta es rápida, sin embargo, se caracteriza por la producción en su mayor parte de anticuerpos IgM, a diferencia de la respuesta dependiente de T que es más lenta pero más eficiente (Abbas *et al.*, 2018). Los efectores finales de esta respuesta son específicos para cada antígeno, y contribuyen a su eliminación por células fagocíticas y el sistema de complemento, de tal forma que es la principal defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas (Surco, 2011).

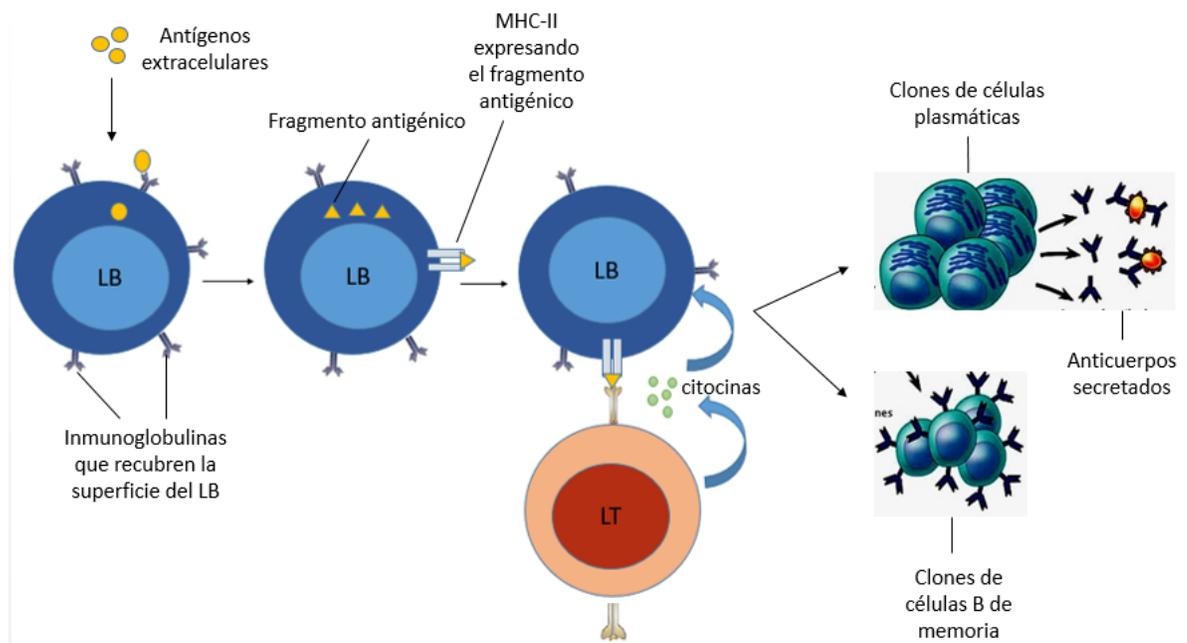


Figura 1.- Proceso de activación de linfocitos B (respuesta dependiente de linfocitos T). Un antígeno es reconocido por el receptor de un linfocito B (LB), esta célula lo internaliza, lo procesa y lo presenta a través de un MHC de clase II a un linfocito T cooperador (LTh), el cual lo reconoce a través de su receptor. La

sinapsis óptima entre LB y LT depende de la interacción de receptores y ligandos que permitan una transmisión específica de citocinas que van a activar a los LB y a su vez permitan su diferenciación (Tomado de: Mitchison, 2004; Papa, 2018).

Los anticuerpos son proteínas del tipo globulinas relativamente solubles, debido a su naturaleza globular se conocen también como inmunoglobulinas. Están conformadas por cuatro cadenas proteicas: dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas, las cuales se unen por medio de puentes disulfuro. Los extremos amino de las cadenas pesadas y ligeras tienen regiones variables con las cuales se unen al antígeno, a las cuales se conocen como regiones determinantes de complementariedad (Stanfield y Wilson, 2014). Las funciones de los anticuerpos unidos al antígeno, están mediadas por las regiones Fc por lo que tienen la capacidad de opsonización, neutralización, fijación del complemento, estimulación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y la expulsión de parásitos por hipersensibilidad tipo 1. Estas funciones varían dependiendo del isotipo de anticuerpo. Hay cinco isotipos denominados como: IgA, IgD, IgG, IgM e IgE (Nicholson, 2016; Abbas *et al.*, 2018).

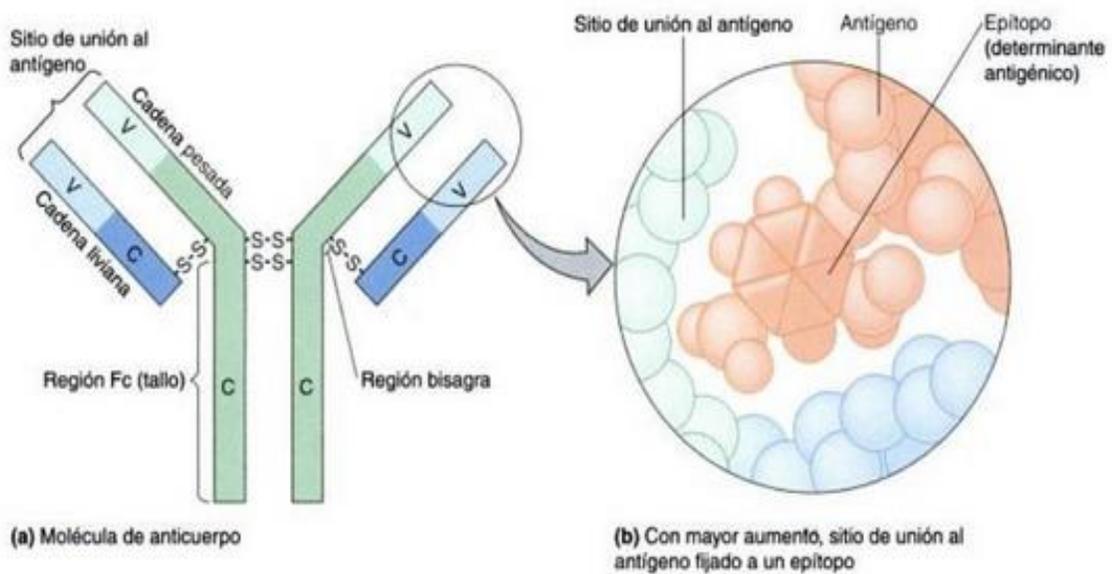


Figura 2.- Estructura típica de un anticuerpo: a) molécula de anticuerpo, b) sitio de unión al antígeno (Tomado de: Tortora *et al.*, 2007).

2.4 RESISTENCIA NATURAL

El término “resistencia natural se refiere a la capacidad de un individuo para evitar presentar el proceso de enfermedad cuando ha sido expuesto al agente causal de la misma, sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado” (Hutt, 1958). Es así que un animal puede resistir a una enfermedad a través de mecanismos inmunes o no inmunes. La variación observada en la resistencia natural se atribuye a factores como el estrés o la nutrición, pero el componente de variación más importante parece ser heredable y así se transmite de progenitores a la descendencia (Templeton, 1988).

Para identificar la resistencia natural se han realizado algunos estudios empleando el modelo bovino; por ejemplo, Qureshi *et al.* (1996) estudiaron la resistencia a patógenos bacterianos de vida intracelular, mediante ensayos bactericidas, observando que los macrófagos de bovinos resistentes poseen mayor capacidad para el control del crecimiento intracelular de microorganismos tales como: *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin* y *Brucella abortus*. De acuerdo con

los resultados de este estudio, los criterios que se utilizan para clasificar a los animales como resistentes o susceptibles se basan en la capacidad de los macrófagos para permitir el crecimiento bacteriano. Cuando dicho crecimiento sea superior a 65% se designan como susceptibles, y los bovinos que logren reducir el crecimiento a un 65% o menos se consideran como resistentes.

A partir de ello se han realizado estudios de resistencia en bovinos, y caracterización de macrófagos tanto de animales resistentes como susceptibles. En ensayos con *M. bovis* virulento, los macrófagos de los animales resistentes controlan mejor el crecimiento intracelular de dicho patógeno (Gutiérrez y Adams, 2003), además esos macrófagos inducen una mayor expresión de iNOS, y el control del crecimiento intracelular está relacionado con la producción de óxido nítrico (ON) (Esquivel-Solís *et al.*, 2013). Castillo (2009), realizó un estudio con el objetivo de identificar el efecto de la resistencia natural en la interacción de *M. bovis* con macrófagos bovinos activados por la vía alterna. Para lo cual activaron a los macrófagos por la vía clásica y alterna, con 10ng/ml IL-4 recombinante y 50ng/ml de LPS de *Escherichia coli* cepa lisa 026:B6, respectivamente. Luego los desafiaron con *M. bovis* BCG y *M. bovis* 9926. Para comprobar la activación alterna de los macrófagos, midieron producción de ON. Observando una disminución de la producción basal de ON inducido por LPS, siendo mayor el efecto en macrófagos de animales resistentes. También provoca la disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias comparando con la vía clásica, pero está se incrementa en presencia de la micobacteria. El índice de fagocitosis en macrófagos de animales resistentes es superior con ambas vías de activación celular. Y observaron un mejor control de la proliferación micobacteriana en macrófagos estimulados con IL-4 recombinante siendo similar en animales resistentes y susceptibles.

Adams (1988), publicó que los macrófagos de bovinos resistentes a patógenos intracelulares, restringen el crecimiento intracelular *in vitro*, producen más intermediarios reactivos de oxígeno y ON en comparación con macrófagos de

bovinos susceptibles; y sobre todo, que los bovinos resistentes tienen una respuesta de anticuerpos masiva y prolongada, mientras que la de los susceptibles es mínima y de poca duración. Sánchez *et al.* (2018), realizaron un estudio para determinar la capacidad de los macrófagos en el control de *M. bovis*, así como la producción de INF- γ por parte de los linfocitos en bovinos naturalmente infectados con este patógeno. Los autores no encontraron una correlación entre la susceptibilidad a *M. bovis* y la producción de IFN- γ . No obstante, tampoco se puede descartar que los macrófagos y linfocitos, tienen un papel fundamental en el control o la diseminación de la enfermedad, ya que existen varios factores que pueden estar influyendo en la respuesta inmune del hospedador.

El factor genético parece estar relacionado con la variación en la resistencia natural, por lo que se han realizado estudios para identificar genes y polimorfismos de nucleótido único (SNP) relacionados con la resistencia o susceptibilidad a ciertas enfermedades en bovinos (González *et al.*, 2018). Se han realizado estudios de resistencia a garrapatas comparando diferentes razas de bovinos. Donde las razas de ganado *Bos taurus indicus* son más resistente que el *B. taurus taurus*. Villar (2006), sugiere que el ganado *B. taurus indicus* es más resistente a las garrapatas en comparación con el ganado *B. taurus taurus* y que esa resistencia es altamente heredable (80%) en la progenie (Cebú), pero mucho menor en la progenie de razas puras Europeas *B. taurus taurus* (40%).

De igual forma existen estudios en los cuales clasifican a los bovinos como resistentes o susceptibles con base en la presentación del cuadro clínico. Bock *et al.* (1999), determinaron un alto grado de resistencia a Babesiosis en ganado *B. indicus* puro, basado en la observación de signos clínicos menos severos, pero una mayor susceptibilidad en cruza de *B. indicus* x *B. taurus*. Sin embargo, estos resultados podrían deberse a la resistencia del ganado *B. indicus* a las garrapatas, ya que en este estudio infectaron a los bovinos con garrapatas que tenían *B. bovis* y *B. bigemina*. Parker *et al.* (1985), al comparar la susceptibilidad de dos razas de

ganado bovino (Shorthorn y Brahman rojo), mediante la inoculación intravenosa de cepas de *Anaplasma marginale* y *Babesia bigemina*, identificaron reacciones menos severas en vaquillas Brahman que en las Shorthorn. Sin embargo, los mecanismos detrás de la variación en la respuesta frente a estas infecciones en las dos razas no se conocen con precisión. Es probable que ciertos mecanismos celulares estén involucrados, como se ha observado para Babesiosis en ganado Holstein-Friesian, donde la rápida estimulación de IFN- γ , IL-12 y la producción de ON previenen la presentación de un cuadro clínico severo en terneros luego de la inoculación por vía intravenosa de eritrocitos infectados con *B. bovis* (Goff *et al.*, 2001).

2.5 BABESIOSIS BOVINA

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas, de gran importancia económica en hatos ganaderos de regiones tropicales y subtropicales. Los patógenos causantes de esta enfermedad son *B. bovis* y *B. bigemina* (Figura 3), protozoarios transmitidos principalmente por la garrapata *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*. Los esporozoitos de babesia son inoculados por las fases de larva o ninfa de la garrapata. Estos ingresan al torrente sanguíneo e infectan a los glóbulos rojos, entonces se transforman en trofozoitos que se multiplican por gemación o fisión binaria dando lugar a los merozoitos, que salen e infectan a otros eritrocitos (Suarez *et al.*, 2019; Madruga *et al.*, 2001; Goncalves *et al.*, 2001). El periodo de incubación varía de 6-14 días, luego del cual se observan los signos clínicos, comenzando con fiebre de 41°C. La intensidad de los signos clínicos puede variar por la virulencia de la cepa, la cantidad inoculada, la edad, el estrés, la raza y en zonas enzoóticas el grado de inmunidad transferida por el calostro (Mahoney y Ross, 1972; López *et al.*, 2008). La sinología causada por *B. bovis* son: fiebre alta, ataxia, anorexia, shock circulatorio general y signos nerviosos, mientras que en infecciones por *B. bigemina* hay fiebre, hemoglobinuria y anemia (Santamarina *et al.*, 2018).

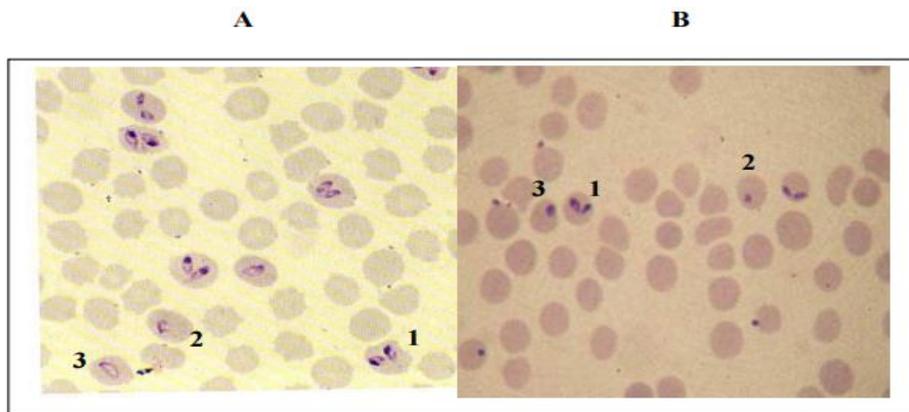


Figura 3.- Frotis teñidos con Giemsa. *B. bigemina* (A), *B. bovis* (B). 1: formas pares, 2: formas simples (merozoito), 3: trofozoito (Tomado de: Petrigh, 2010).

2.5.1 Respuesta inmune en bovinos

Se tiene un progreso considerable para entender la respuesta inmune a una infección causada por *B. bovis*, pero se desconoce la respuesta inmune a *B. bigemina*. Brevemente, para combatir la infección causada por *Babesia*, interviene el sistema inmune innato y adaptativo del hospedador. La inmunidad innata no es específica e incluye variables como edad, factores genéticos y la respuesta de las células. Con respecto a la edad, se ha observado que terneros presentan una mejor respuesta inmune innata en comparación con bovinos adultos (Petrigh, 2010). Así en terneros hay una producción temprana de IL-12, IFN- γ e iNOS, por el contrario, en adultos la producción de IL-12 e IFN- γ aparece más tarde en la infección y la iNOS no es inducida (Goff *et al.*, 2001). La primera línea de defensa está conformada por monocitos activados, macrófagos y neutrófilos, los cuales emplean especies reactivas de oxígeno y nitrógeno para eliminar a los merozoitos y producen citocinas para regular la respuesta inflamatoria. Además, los macrófagos secretan IL-1 β , IL-12, TNF α y ON (Shoda, 2000).

La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por la producción de anticuerpos que al parecer actúan como opsoninas incrementando la fagocitosis. Los isotipos que se producen son IgG1 e IgG2, que fijan el complemento y tienen mayor actividad como opsoninas (McGuire *et al.*, 1979). En la respuesta celular

principalmente intervienen las células T helper CD4+, y el perfil de citocinas es Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF α) o Th0 (IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF α). Cabe señalar que el perfil Th1 produce abundante IFN- γ que activa a las células fagocíticas y promueve la producción de IgG2 por parte de los linfocitos B (Rodríguez *et al.*, 1996).

2.6 ANAPLASMOSIS BOVINA

Es una enfermedad infecto-contagiosa presente en regiones tropicales y subtropicales. Causada por *A. marginale* que es una rickettsia intraeritrocítica (Figura 4), que ocasiona una anemia hemolítica por la destrucción extravascular de glóbulos rojos. Es transmitida biológicamente por garrapatas de la familia Ixodidae, *R. microplus*, entre otras, y de forma mecánica por moscas, tábanos o iatrogenia. Una vez en el torrente sanguíneo, *A. marginale* ingresa a los eritrocitos por endocitosis, durante el proceso se forma una vacuola que encierra a la forma infectiva de *Anaplasma*. Se multiplican por fisión binaria y forman un cuerpo de inclusión con 8-12 cuerpos iniciales, luego salen de las células sin destruirlas e infectan a otros eritrocitos (OIE, 2015).

El periodo de incubación va de 3 a 4 semanas. La infección tiene una etapa aguda que se caracteriza por fiebre, anemia, debilidad, pérdida de peso, disnea, ictericia, bilirrubinemia, mientras que la fase hiperaguda se caracteriza por taquicardia, taquipnea, salivación, fiebre de 41°C y muerte súbita en 24 horas. Los animales adultos son los más susceptibles cuando sufren una primoinfección, mientras que los jóvenes son resistentes gracias a la inmunidad transferida por el calostro (Rodríguez *et al.*, 2009; Becerro, 2019).

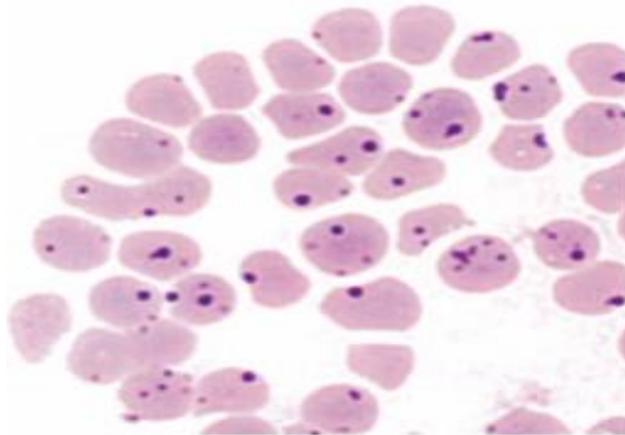


Figura 4.- Glóbulos rojos infectados con *Anaplasma marginale* (Tomado de: Rodríguez *et al.*, 2003).

2.6.1 Respuesta inmune en bovinos

En una primera infección se genera una respuesta inmune celular, donde los macrófagos y las células NK juegan un papel muy importante para eliminar a los cuerpos iniciales de *Anaplasma*. Así los macrófagos los fagocitan, procesan y presentan el antígeno a los linfocitos T CD4+, que se activan y secretan IL-2 e IFN- γ . La respuesta Th1 induce la producción de IgM e IgG2 por parte de los linfocitos B, y a su vez activan macrófagos. Además, se ha observado una respuesta de células Th2 que secretan IL-4, IL-6, IL-10, los cuales estimulan a la producción de IgG1 (Brown *et al.*, 1998a; Rodríguez *et al.*, 2003; Córdoba, 2016).

En un estudio realizado por Bautista *et al.* (2003) observaron un incremento en los niveles de IgG al día 51 pos-infección y se incrementan aún más luego de la reinfección con la misma cepa. Lo mismo sucedió con los niveles de producción de IFN- γ , además observaron un incremento en la cantidad de linfocitos TCD8+ después de la reinfección, lo cual sugiere que estas células tienen un papel activo en la producción de IFN- γ .

2.7 PARATUBERCULOSIS BOVINA

La paratuberculosis (PTB) conocida también como enfermedad de Johne afecta a la población mundial de rumiantes y ocasiona grandes pérdidas económicas (Zapata *et al.*, 2008). Es una enfermedad crónica granulomatosa del tracto digestivo causada por *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis* (MAP). Descrita por primera vez en Alemania por Johne y Frothingham en 1884. Está mediada principalmente por la respuesta inmune que se desarrolla en el animal, más que por las toxinas que produce MAP. MAP es una bacteria Gram positiva, ácido alcohol resistente, posee características que le ayudan a sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos, como los componentes de su pared celular y productos de secreción que neutralizan a los productos antibacterianos (Zapata *et al.*, 2008).

Se transmite principalmente por la vía fecal-oral, a través de la leche o calostro. La infección generalmente ocurre en terneros, pero presentan los signos clínicos a los 2 años de edad, debido a que tiene un periodo de incubación muy largo que va de 2 a 5 años (Valentin-Weigand y Goethe, 1999; Martínez *et al.*, 2012). Dependiendo de la resistencia de los animales, puede ocurrir que los bovinos se infecten, eliminen a las bacterias y presenten signos clínicos o permanezcan como portadores sanos, es decir están eliminando a los microorganismos, pero no presentan síntomas. En animales con enfermedad clínica avanzada hay un gran número de bacterias en heces y leche, y se observa emaciación, diarrea profusa, edema mandibular, caquexia y puede llegar a la muerte de los animales (Maroudam *et al.*, 2015).

2.7.1 Respuesta inmune en bovinos

Los animales desarrollan inicialmente una respuesta celular mediada por linfocitos Th1 y posteriormente montan una respuesta inmune humoral caracterizada por producción de IgG1 e IgG2. De tal forma que se ha asociado una respuesta inmune celular con baja carga bacteriana, mientras que la respuesta humoral está asociada con incremento de dicha carga y eliminación de MAP en las heces

(Magombedze *et al.*, 2016). También se ha descrito que para una eliminación efectiva de las micobacterias se requiere de la acción coordinada de IFN- γ derivado de linfocitos Th1 e IL-1, IL-6, TNF α y GM-CSF producidos por macrófagos. Sin embargo, cuando la bacteria ingresa a las células, desactiva la maquinaria de defensa de los macrófagos, lo cual puede ocurrir a nivel transcripcional, transduccional o postransduccional de la expresión de genes, lo que lleva a una falla en la defensa y permite que los bacilos sobrevivan (Valentin-Weigand y Goethe, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando la importancia de lograr controlar y erradicar estas y muchas otras enfermedades en un hato bovino, surge la necesidad de buscar alternativas como la gestión de recursos genéticos con la finalidad de reforzar la resistencia natural a patógenos, encontrados en algunas poblaciones ganaderas. Entre las estrategias, se podría aplicar la selección de la raza adecuada al medio de producción; y la selección para fines de cría de individuos con alto grado de resistencia natural (FAO, 1999).

Existen varios estudios de resistencia a patógenos, en los cuales se ha podido relacionar con algunos factores como edad, raza, e incluso se ha mencionado que está característica de resistencia podría heredarse. De acuerdo a la información generada a lo largo del tiempo, se sabe que resultaría muy ventajoso poder generar una población de bovinos resistentes a patógenos, de gran importancia en la ganadería y con ello se reducirían las pérdidas económicas. Existen diferentes formas de identificar a los individuos con mayor resistencia a patógenos, Qureshi *et al.* (1996) propusieron el uso de un ensayo microbicida, para determinar en el ganado bovino el fenotipo de resistencia a patógenos como: *B. abortus*, *M. bovis* BCG o *Salmonella dublin*. Esta técnica se fundamenta en la capacidad de los macrófagos para controlar el crecimiento bacteriano intracelular de individuos caracterizados como resistentes o susceptibles a un desafío in vivo con *B. abortus*. Por lo tanto, un individuo que resistió la infección por *B. abortus*, se podría esperar que tuviera una respuesta inmune más robusta que un individuo que no resistió el desafío. Y probablemente suceda el mismo efecto cuando los animales son infectados con otros patógenos intracelulares. En el presente estudio se propuso medir los efectores finales de la respuesta inmune humoral y celular específicos a *A. marginale*, *B. bigemina* y MAP en bovinos caracterizados como resistentes o susceptibles a *B. abortus* o *M. bovis* BCG.

El conocer qué aspectos influyen para que un animal sea naturalmente resistente es de importancia. La información que se genere permitirá una caracterización

más detallada de bovinos naturalmente resistentes a los patógenos intracelulares *B. abortus* y *M. bovis* BCG, y entender en parte el comportamiento del sistema inmune de estos bovinos. Además, se podrá definir si bovinos caracterizados como resistentes a determinadas bacterias intracelulares tienen una mejor respuesta inmune frente a otros patógenos intracelulares facultativos.

4. HIPÓTESIS

Los bovinos caracterizados como resistentes a patógenos bacterianos de vida intracelular, tienen una mayor producción de Inmunoglobulina G (IgG-total) en contra de *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, así como una mayor producción de IFN-gamma en comparación con los bovinos caracterizados como susceptibles.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Asociar la producción de IgG-total e interferón-gamma contra *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, con el fenotipo de resistencia natural a patógenos de vida intracelular, en bovinos Cebú previamente caracterizados como resistentes o susceptibles por medio de ensayos microbicidas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir la respuesta inmune humoral, mediante la identificación de IgG total contra *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, en bovinos Cebú caracterizados como resistentes o susceptibles a patógenos bacterianos de vida intracelular.
2. Medir la respuesta inmune celular, mediante la identificación de IFN-gamma contra *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*, en bovinos Cebú caracterizados como resistentes o susceptibles a patógenos bacterianos de vida intracelular.
3. Asociar la producción de IgG-total e IFN-gamma con el fenotipo de resistencia natural en bovinos Cebú.

6. METODOLOGÍA

6.1 Población de estudio

El estudio se realizó en bovinos cebú de la raza Brahman que se encuentran en un hato libre de tuberculosis y brucelosis bovina, perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM, ubicado en el Municipio Martínez de la Torre en el Estado de Veracruz. Esta región se caracteriza por tener un clima tropical, temperatura promedio anual de 23.4°C, y precipitación anual de 1840mm. Estado en el cual predomina la garrapata *R. microplus*, responsable de la transmisión de *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale*. Además, existe el antecedente de la presencia de MAP en la región.

Los bovinos que se incluyeron en el estudio fueron 20 hembras de entre 3 y 13 años (promedio 6.5 años) de edad, las cuales fueron previamente caracterizadas como resistentes (10) o susceptibles (10) a patógenos de vida intracelular mediante el empleo de ensayos microbicidas utilizando *M. bovis* BCG o *B. abortus* (Anexo 1).

Se evaluó el nivel de producción de anticuerpos (IgG total) e IFN- γ frente a *B. bigemina*, *A. marginale* y *M. avium* spp *paratuberculosis*. El análisis de las muestras se realizó en: el Laboratorio de Investigación en Tuberculosis Bovina del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM; en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro; en el Laboratorio de Anaplasmosis bovina del CENID-PaVet, INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias), Jiutepec, Mor., y en el Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y Paratuberculosis Bovina del CENID en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP, en Cuajimalpa, CDMX.

6.2 Colecta, conservación y transporte de las muestras de sangre.

Se realizaron tres muestreos con intervalos de un mes (octubre, noviembre, diciembre del 2019), para tener mejores posibilidades en la evaluación de la respuesta inmune. En cada muestreo los bovinos seleccionados para el estudio se colocaron en una manga, se sujetaron correctamente y se procedió a tomar las muestras de forma aséptica (arteria coccígea). Para medir la producción de anticuerpos se colectaron 10ml de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante, mientras que para medir la producción de IFN- γ se colectaron 10ml de sangre en tubos vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante (Sánchez *et al.*, 2018). Luego de la colecta, las muestras se transportaron al laboratorio protegidas de la luz solar. Las muestras sin anticoagulante se conservaron a temperaturas de refrigeración hasta su procesamiento, mientras que las muestras con anticoagulante se procesaron durante las primeras horas de haberse obtenido.

6.3 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Extracción del suero sanguíneo de las muestras colectadas.

Una vez que se dio el proceso de coagulación, se tomaron los tubos con las muestras, se centrifugaron a 2500 x g por 15 min, luego se procedió a extraer el suero, con la ayuda de una micropipeta se obtuvo la mayor cantidad de suero posible y se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml y 0.5 ml. El suero se conservó a -20°C, hasta su procesamiento.

6.3.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra *B. bigemina*

Este proceso se realizó de acuerdo a lo publicado en el manual de la OIE (2008) con algunas modificaciones.

Los frotis sanguíneos (realizados con sangre infectada con *B. bigemina*), necesarios para realizar las pruebas de inmunofluorescencia fueron donados por el grupo de investigación del Dr. Juan Mosqueda del Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de

Querétaro. Los frotis se conservaron a -80°C . Todas las muestras de suero inicialmente fueron analizadas, utilizando la dilución 1:80, empleada para diagnóstico (Zapata *et al.*, 2011). Luego se realizaron diluciones dobles seriadas (1/40-1/640) de los sueros problema para determinar el título de anticuerpos, la dilución de los sueros control fue de 1:80. En los portaobjetos con el antígeno (frotis sanguíneos) se marcaron 6 círculos con esmalte negro para crear divisiones hidrofóbicas, y con la ayuda de una micropipeta se añadieron 50 μl de cada dilución de suero por pozo. Las preparaciones se incubaron a 37°C durante 30 min en una cámara húmeda. En cada portaobjeto de prueba se emplearon como controles diluciones de sueros positivos y negativos. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron cuidadosamente tres veces con PBST20 (PBS Tween 20). El conjugado (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Rabbit Anti-Bovine IgG (H+L)) (Jackson Immuno Research Laboratories, Baltimore, USA) se diluyó 1/200 en PBST20, una vez secos los pozos se añadió en cada segmento de prueba 50 μl del conjugado. Luego se incubó a 37°C durante 30 min, y se realizaron lavados como se describió anteriormente. Se eliminó por completo el PBS, y los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente cubiertos de la luz. Finalmente se colocó una gota de glicerina con PBS (1:1), y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia (Microscopio Leica DM2500, Alemania). La seroreactividad se estableció como la presencia de fluorescencia evidente sobre glóbulos rojos parasitados.

Los resultados se expresan como títulos de anticuerpos, por lo que se obtuvo el título promedio geométrico (TPG) por animal (promedio de tres muestreos), esto porque la media geométrica es afectada por valores extremos en menor cantidad que lo es la media aritmética. Finalmente se obtuvo la media por grupo (resistente y susceptible)

6.3.2 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA-indirecto) (PAAdianaVET) para medir la producción de anticuerpos contra *A. marginale*

Para medir la producción de anticuerpos en los sueros, se empleó un kit de ELISA indirecto denominado PAAdianaVET (elaborado en el Centro Nacional de

Investigación en Parasitología Veterinaria del INIFAP, para el diagnóstico de Anaplasmosis Bovina) que utiliza un antígeno crudo de *A. marginale* preparado en el INIFAP. Primero se hidrató la placa, para ello se extrajo cuidadosamente del empaque plástico teniendo cuidado de no tocar la parte inferior de la misma, ya que se puede distorsionar la lectura de la densidad óptica. Se depositó en cada pozo 200 µl de Solución de SSAFT20 (solución salina reguladora de fosfatos pH 7.2/Tween 20) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se eliminó el contenido de la placa, se depositó en cada pozo 200 µl de solución de bloqueo, se tapó e incubó por 60 min a 37° C, y se realizaron tres lavados con 200µl de SSAFT20 por 5 min. Luego se diluyeron 1:100 en solución de SSAFT20 todas las muestras de suero problema utilizando tubos para micro-centrífuga de 1.5 ml nuevos. Los controles positivo y negativo se diluyeron 1:50 ya que están preservados v/v en glicerina. Se homogenizaron en vortex cada una de las diluciones por 10 seg. Se agregó 200 µl de suero diluido por pozo, iniciando con los controles blanco, positivo y negativo, identificando la distribución de las muestras y se incubó la placa a 37°C por 60 min. Se realizaron 3 lavados como se describió anteriormente. Para preparar el conjugado se diluyó 1:5000 el anticuerpo secundario anti-IgG bovino conjugado con fosfatasa-alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), en Solución de SSAFT20 (21 ml de SSAFT20 + 21 µl de conjugado para 1 placa). Se agregó 200 µl del conjugado diluido por pozo, nuevamente se incubó la placa cubierta a 37°C por 60 min, y se realizaron 3 lavados con SSAFT20. Para preparar la Solución de Substrato, se disolvió la pastilla SIGMA FAST TRIS BUFFER (No. T-8790) en 20 ml de agua bidestilada y se agregó la pastilla SIGMA FAST p-NPP (No. N 2765), una vez preparado el substrato se eliminó el contenido de la placa, se lavó tres veces y se depositó 200 µl por pozo del substrato previamente preparado y se incubaron las placas por 60 min a 37°C. Finalmente, la reacción se registró mediante un espectrofotómetro (Microplate RDR-Imark W/SW MpM6 - BioRAD), ajustado a una longitud de onda de 405 nm. Los datos se expresaron en valores de Densidad Óptica (OD).

Para el análisis de los resultados se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: el valor promedio de los pozos blanco, el promedio de los valores positivos y negativos con sus respectivas desviaciones estándar. La línea de corte se estableció tomando el valor promedio de los negativos más tres veces su desviación estándar.

6.3.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA-indirecto) para medir la producción de anticuerpos contra MAP

Para medir la producción de anticuerpos contra MAP, se utilizó la técnica de ELISA indirecta de acuerdo a lo descrito por Martínez *et al.* (2012), para ello se utilizaron sueros controles positivos y negativos y un conjugado anti IgG bovino marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos sensibilizados con antígeno protoplasmático de MAP cepa 3065, aislada de una muestra de heces de ovino. Las placas fueron bloqueadas y estaban listas para su uso. Para iniciar los ensayos se realizó una dilución de los sueros problema de 1:160, así en cada placa se colocaron en sus pozos correspondientes 100 µl de los sueros testigos negativos o positivos; y 100 µl de los sueros (diluidos) problema por triplicado, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min en agitación, y se realizaron cuatro lavados con 300 µl de PBST. Luego se agregó 100 µl del conjugado (dilución 1:10000) en cada pozo, se incubaron a temperatura ambiente por 30 min en agitación, se eliminó el contenido de la placa y se lavó cuatro veces con PBS-Tween. Posteriormente se agregó a cada pozo 200 µl de OPD (SIGMAFAST™ OPD Tablet set, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en agitación, cubiertos de la luz. Finalmente se agregó 50 µl de la solución de paro. La lectura se realizó con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Labsystems - Multiskan Ascent Microplate Reader 354, California, USA), ajustado a una longitud de onda de 492 nm. Se analiza cada resultado y se compara con el punto de corte establecido (0.22), todos los valores iguales o superiores se consideraron positivos.

6.4 RESPUESTA INMUNE CELULAR

Para medir la producción de IFN- γ contra *B. bigemina*, *A. marginale* y *M. avium* spp *paratuberculosis*, se realizó un ensayo IGRA empleando cultivos de sangre completa (Parsons *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2018).

6.4.1 Obtención de los antígenos

El antígeno crudo de *B. bigemina* fue donado por el grupo de investigación en Babesiosis bovina del Dr. Juan Joel Mosqueda de la Universidad Autónoma de Querétaro. El antígeno crudo de *A. marginale* fue donado por el Dr. Sergio Rodríguez Camarillo, PhD. Coordinador de la Unidad CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP, Col. Progreso, Jiutepec, Mor. Y el antígeno de MAP, que se utilizó fue el PPD aviar (PPDA) que viene incluido en el kit comercial BOVIGAM® (*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle (Prionics, Schlieren-Zurich, Suiza)).

Tabla 1. Antígenos utilizados para estimular a los linfocitos en cultivos de sangre completa.

Patógeno	Antígeno
<i>B. bigemina</i>	Extracto crudo de merozoitos de <i>B. bigemina</i> cepa Nayarit
<i>A. marginale</i>	Extracto crudo de cuerpos iniciales de <i>A. marginale</i> cepa Tizimin
<i>M. avium</i> spp <i>paratuberculosis</i>	PPD aviar del kit BOVIGAM

6.4.2 Determinación de la producción de IFN- γ

Para evaluar la producción de IFN- γ , se colectaron muestras de sangre en tubos vacutainer con heparina de sodio como anticoagulante de todos los animales

incluidos en el estudio. Una vez colectadas las muestras se procesaron durante las primeras 10 horas de haberse obtenido.

Previo al análisis de las muestras de los 20 bovinos, se procedió a verificar la funcionalidad de los antígenos, por lo que se obtuvieron muestras de animales que se sabía que tenían la infección. Así para probar el antígeno crudo de *A. marginale* se tomaron muestras de sangre de un bovino hembra perteneciente al INIFAP de Jiutepec, Morelos, la cual tenía una anaplasmosis activa. Se probaron dos concentraciones del antígeno 15 µg/ml y 20 µg/ml, con el fin de definir la cantidad a usar. En el caso del antígeno crudo de *B. bigemina*, se utilizaron muestras de cuatro bovinos seropositivos a la infección pertenecientes al INIFAP de Jiutepec-Morelos, los estímulos se llevaron a cabo con 15 µg/ml y 20 µg/ml de antígeno. Para probar la funcionalidad del PPDA que viene incluido en el kit Bovigam, se tomaron muestras de cinco ovinos pertenecientes al CEIEGT de la FMVZ de la UNAM, un hato con antecedentes de paratuberculosis. En este caso las muestras se incubaron por 20, 68 y 120 horas con el objetivo de decidir el tiempo de incubación óptimo que permita obtener una cantidad medible de IFN-γ. Una vez definido las concentraciones y el tiempo de incubación, se procedió a analizar las muestras problema.

Los estímulos se realizaron en placas (Corning™ Microplacas de poliestireno fondo plano) para cultivo celular de 96 pozos. La sangre completa se diluyó a razón de 1:5 en Medio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado con penicilina y estreptomycin; de tal forma que se colocaron en cada pozo 208 µl de sangre completa y 52 µl de Medio RPMI 1640 suplementado con penicilina y estreptomycin. Se incubaron por triplicado con PPD aviar (PPDA) (5 µg/ml), antígeno crudo de *A. marginale* (15 µg/ml) (Bautista *et al.*, 2003; Dernivoix *et al.*, 2017), 10 µl de PBS 1X estéril (control negativo), y 10 µl del mitógeno concanavalina ConA (1 µg/µl) (control positivo). Se incubaron por 5 días en una incubadora a 37°C con 5% CO₂. Luego se recuperaron los sobrenadantes y se depositaron en placas de 96 pozos, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su

procesamiento. Posteriormente se evaluó la producción de IFN- γ a través del kit comercial BOVIGAM® (Prionics, Schlieren-Zurich, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las densidades ópticas (OD) se registraron en un lector de placas de ELISA automático (ELx808TM, BIOTEK Instruments, Inc. USA), utilizando el filtro de 450nm (Sánchez *et al.*, 2018).

6.5 Correlación entre la producción de anticuerpos y el fenotipo

Se realizó un análisis de Correlación de Spearman (Spearman, 1904) para medir la relación entre la producción de anticuerpos y el fenotipo de resistencia o susceptibilidad en los 20 bovinos cebú. Los resultados de los ensayos para medir anticuerpos se expresan en OD o títulos promedios geométricos de anticuerpos (TPG), mientras que el fenotipo se define en base al % de sobrevida, es decir capacidad de los macrófagos para permitir el crecimiento bacteriano, cuando el crecimiento sea igual o inferior al 65% para *M. bovis* BCG o 70% para *B. abortus* se consideran resistentes, y cuando es superior al 65% o 70% respectivamente se designan como susceptibles. De tal forma que los análisis de correlación se realizaron entre las OD o TPG y los % de sobrevida registrados por animal.

6.6 Aislamiento e identificación de *Mycobacterium avium* sp. *paratuberculosis*

6.6.1 Cultivo

Adicionalmente se tomaron muestras de heces de los 20 bovinos (2g/animal). Las cuales se mantuvieron en tubos 50ml (Corning™ Falcon™) a -20°C hasta su procesamiento. El cultivo se realizó en Medio Herrold con yema de huevo y Micobactina, el cual se preparó de acuerdo a lo descrito por Payeur et al. (1993). Para desinfectar las muestras se colocaron 40 ml de cloruro de hexadecilpiridinio (HCP) en cada tubo, se mantuvieron en agitación por una hora y luego se dejó reposar toda la noche. Se colectó 5 ml del sobrenadante y de la capa intermedia que separa el sedimento, y se transfirió a tubos BD Vacutainer® de vidrio de 10 ml. Posteriormente se agregó a cada tubo 5 ml de Zephiran (0.3%), se incubaron

por 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2500 x g. Se descartó parte del sobrenadante, dejando la pastilla con 2 ml del sobrenadante, del cual se tomaron 10-20 µl para sembrar en los medios de cultivo. Cada muestra se distribuyó por toda la superficie del medio, desde dentro hacia afuera. Los medios se incubaron a 37°C, y se observaron cada semana, durante cinco semanas.

6.6.2 Microscopía

A la tercera semana de incubación se observaron colonias características de MAP en cultivos de 11 bovinos. Posteriormente se tomaron muestras de las colonias, se realizaron frotis y se examinaron al microscopio. Las muestras fueron teñidas según el método de Ziehl-Neelsen (Carter, 1990; Weber *et al.*, 2009).

6.7 Variables del estudio

En el presente estudio se incluyeron las siguientes variables: como variables explicativas, bovinos de raza Brahman resistentes y susceptibles a patógenos bacterianos intracelulares, que hayan estado en contacto con *B. bigemina*, *A. marginale* y/o MAP. Como variables de respuesta, nivel de producción de anticuerpos específicos y secreción específica de IFN-γ contra cada uno de los patógenos mencionados.

6.8 Análisis estadístico

Para comparar el nivel de producción de anticuerpos y de INF-γ frente a *B. bigemina*, *A. marginale* y MAP, entre bovinos caracterizados como resistentes o susceptibles a patógenos bacterianos de vida intracelular, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (Mann y Whitney, 1947). Mientras que para determinar una asociación entre la producción de anticuerpos con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad en bovinos cebú, se realizó una Correlación de Spearman (Spearman, 1904). El análisis estadístico se desarrolló usando GraphPad Prism versión 8 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

7. RESULTADOS

7.1 RESPUESTA INMUNE HUMORAL

7.1.1 Anticuerpos contra *B. bigemina* (IFI indirecta)

Se realizaron cinco diluciones dobles seriadas de cada suero problema (1:40-1:640) para detectar anticuerpos contra *B. bigemina*. Se consideraron seropositivos toda muestra en la cual se observaba fluorescencia en los eritrocitos parasitados como indicativo de que los anticuerpos se adhieren a la pared de los merozoitos de *B. bigemina* (Figura 5). Como se realizaron tres muestreos se obtuvo un total de 60 muestras, todas fueron seropositivas a la dilución 1:80. Posteriormente se tituló cada muestra de suero, por lo que, por cada bovino se obtuvieron tres valores (por tres muestreos), los cuales se promediaron. Los resultados se presentan como título promedio geométrico por animal en cada grupo (Figura 6A, B) (Anexo 2). Finalmente se obtiene el título promedio geométrico por grupo, en los resistentes se observa un título promedio de 1:463, mientras que en los susceptibles fue de 1:266. Al comparar los títulos promedio se determinó que hay una diferencia estadística significativa en la producción de anticuerpos entre el grupo resistente y susceptible ($p=0.0123$) ($p<0.05$) (Figura 7C).

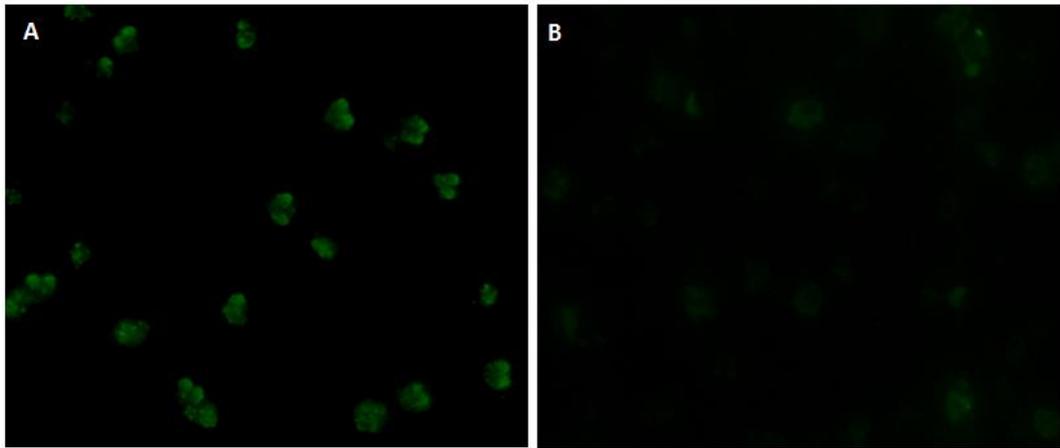
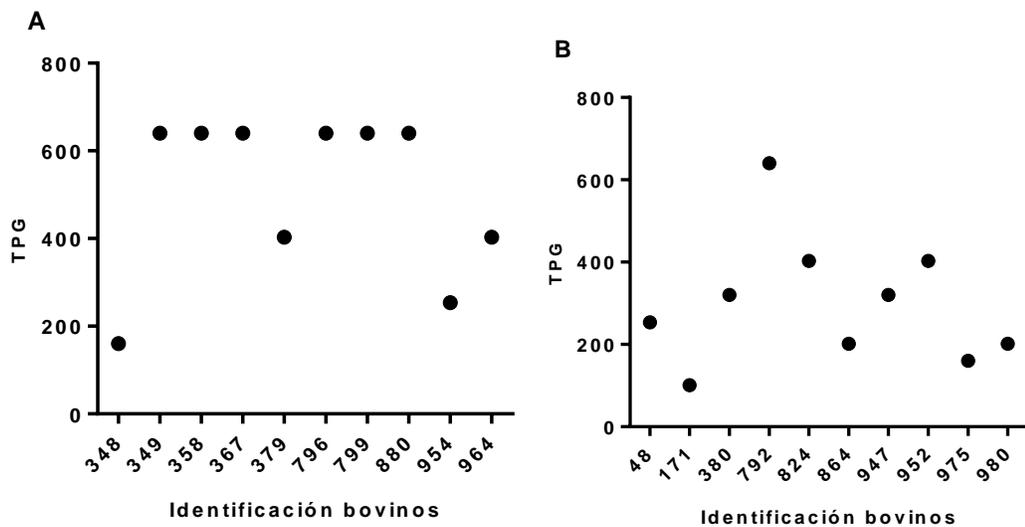


Figura 5.- Inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos específicos a *Babesia bigemina*. **(A)** Merozoitos fluorescentes (formas ovaladas) en el interior de eritrocitos infectados. **(B)** Eritrocitos no parasitados.



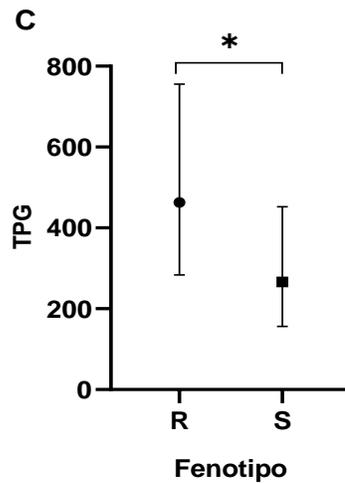


Figura 6.- Producción de anticuerpos específicos contra *Babesia bigemina*.

Título promedio geométrico de tres muestreos por animal, en el grupo resistente (A) y susceptible (B). (C) comparación de título promedio de anticuerpos entre el grupo resistente (R) y susceptible (S). $p=0.0123$ *(significativo) $p<0.05$. (Media geométrica \pm SD geométrica).

7.1.2 Anticuerpos contra *A. marginale* (ELISA indirecto)

Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia, se procedió a determinar el punto de corte, el cual fue de 0.192 (OD), de tal forma que se consideró positiva toda muestra que registró una densidad óptica igual o superior al punto de corte. De los 20 bovinos estudiados 10 fueron seropositivos, de los cuales cinco pertenecen al grupo resistente y cinco al susceptible (Anexo 3). Se realizaron tres muestreos por animal, al final se promediaron las absorbancias registradas, así en la Figura 7 (A, B) se presentan las OD promedio por animal en cada uno de los grupos. Posteriormente se promediaron las OD por grupo. Los resistentes muestran una OD en promedio de 0.305, mientras que en los susceptibles es de 0.222. Se realizó una comparación de medias empleando la prueba U de Mann Whitney, a través de la cual se determinó que no existe diferencia estadística significativa en la producción de anticuerpos contra *A. marginale* entre el grupo de bovinos resistente y el grupo susceptible ($p=0.0556$) ($p>0.05$) (Figura 7C).

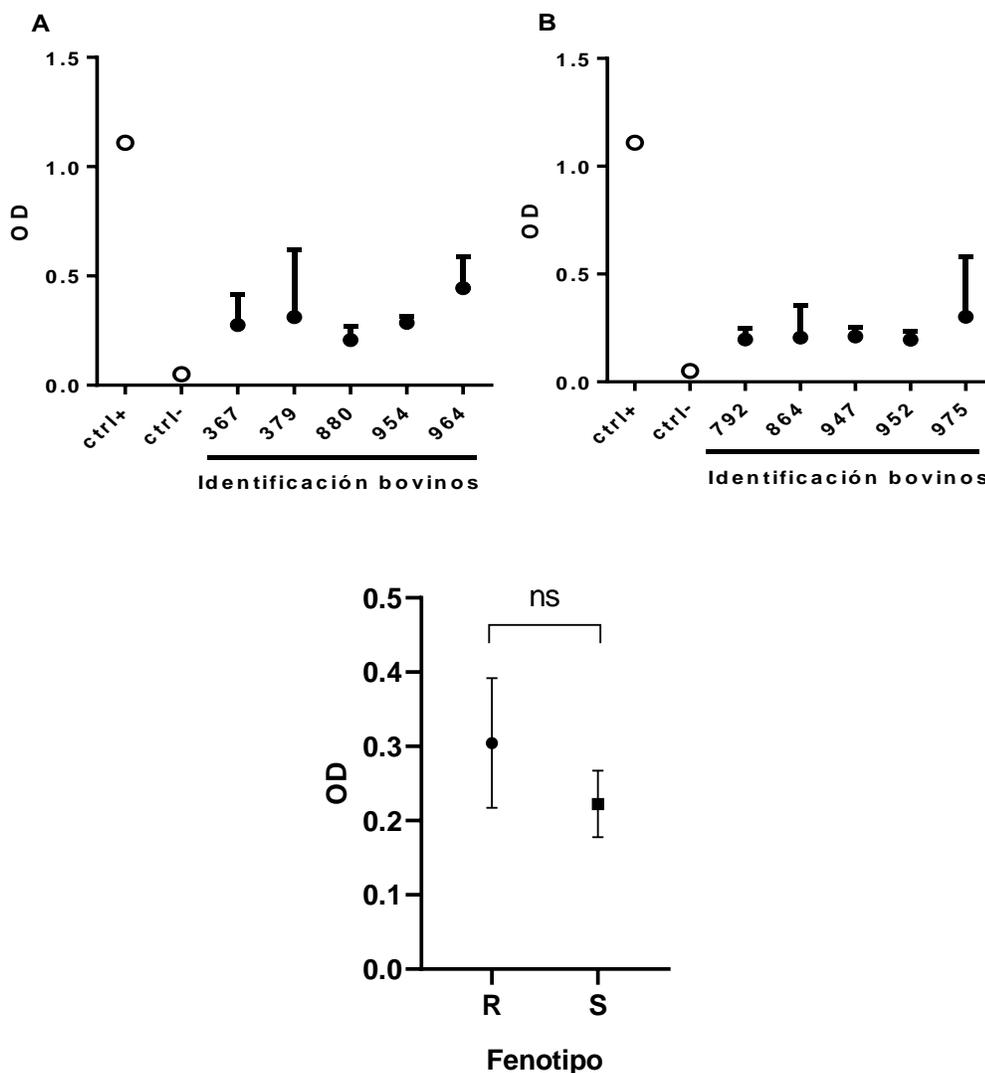
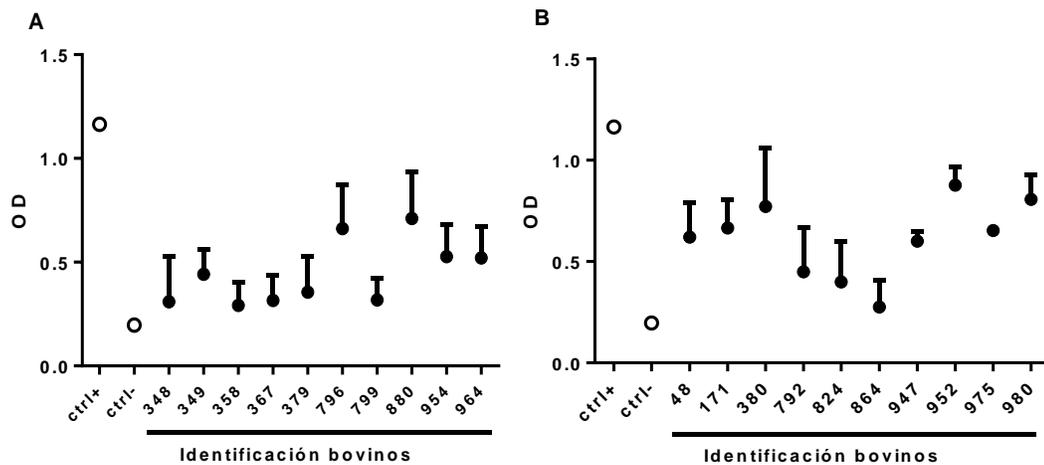


Figura 7.- Producción de anticuerpos específicos contra *Anaplasma marginale*. (A, B) OD registradas por animal en cada uno de los grupos, A: Resistentes, B: Susceptibles, cada círculo (●) representa el promedio de tres muestreos por animal. Controles de la técnica (○). (C) comparación de medias entre los grupos resistente (R.) y susceptible (S.) ($p=0.0556$) ns (no significativo) $p > 0.05$. (Media \pm SD).

7.1.3 Anticuerpos contra *M. avium* sp. *paratuberculosis* (ELISA indirecto)

Se analizó cada muestra por triplicado, y se registraron las densidades ópticas, cada resultado se analizó en base al punto de corte establecido (0.22 OD), de tal forma que los 20 bovinos fueron serológicamente positivos (Anexo 4). Para comparar el nivel de producción de anticuerpos entre el grupo de resistentes y susceptibles, se promediaron las densidades ópticas obtenidas de todos los animales en los tres muestreos, así en el grupo de resistentes se observaron OD que van entre 0.291-0.711 con un promedio de 0.445, mientras que en el grupo de susceptibles las OD fueron de 0.275-0.877 con un promedio de 0.609 (Figura 8A, B). Al comparar las medias entre los grupos se determina que existe una diferencia estadística significativa de la producción de anticuerpos ($p=0.0376$) ($p<0.05$) (Figura 8C).



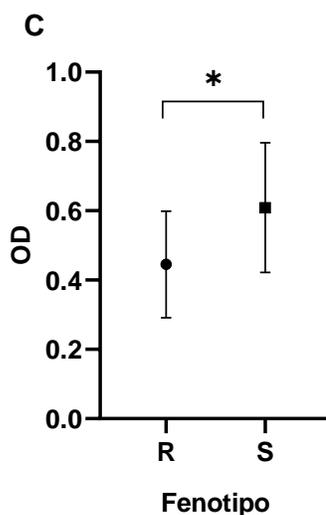


Figura 8.- Producción de anticuerpos específicos contra MAP (A, B) OD registradas por animal, A: grupo resistente, B: grupo susceptible, cada círculo (●) representa el promedio de las OD de tres muestreos. Controles de la técnica (○). (C) comparación de la producción de anticuerpos entre grupo resistente (R.) y susceptible (S.). ($p=0.0376$) $*p<0.05$. (Media \pm SD).

7.1.4 Correlación entre la producción de anticuerpos y el fenotipo

Los 20 bovinos demostraron correlación negativa entre los niveles de producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina* representados como el título promedio geométrico y % de sobrevida (que define el fenotipo) ($r=-0.6280$, $p=0.0015$) (Figura 9A). Sin embargo, solo el 39% de la variabilidad observada en el título de anticuerpos está explicada por la relación con el % de sobrevida ($r^2=0.3944$). Por el contrario, los mismos animales demostraron correlación positiva entre niveles de producción de anticuerpos específicos a MAP representados por OD y % de sobrevida de los 20 bovinos, se encontró una correlación con pendiente positiva ($r=0.4301$, $p=0.0292$). En este caso, el 18% de la variabilidad observada en las OD está explicado por la relación con % de sobrevida registrado en cada individuo ($r^2=0.1849$) (Figura 9B). Al analizar los resultados obtenidos de los 10 bovinos que registraron producción de anticuerpos contra *A. marginale*, no se encontró una

correlación estadística significativa entre niveles de anticuerpos (representados por OD) y % de sobrevivida ($r=-0.3951$, $p=0.1286$) (Figura 9C).

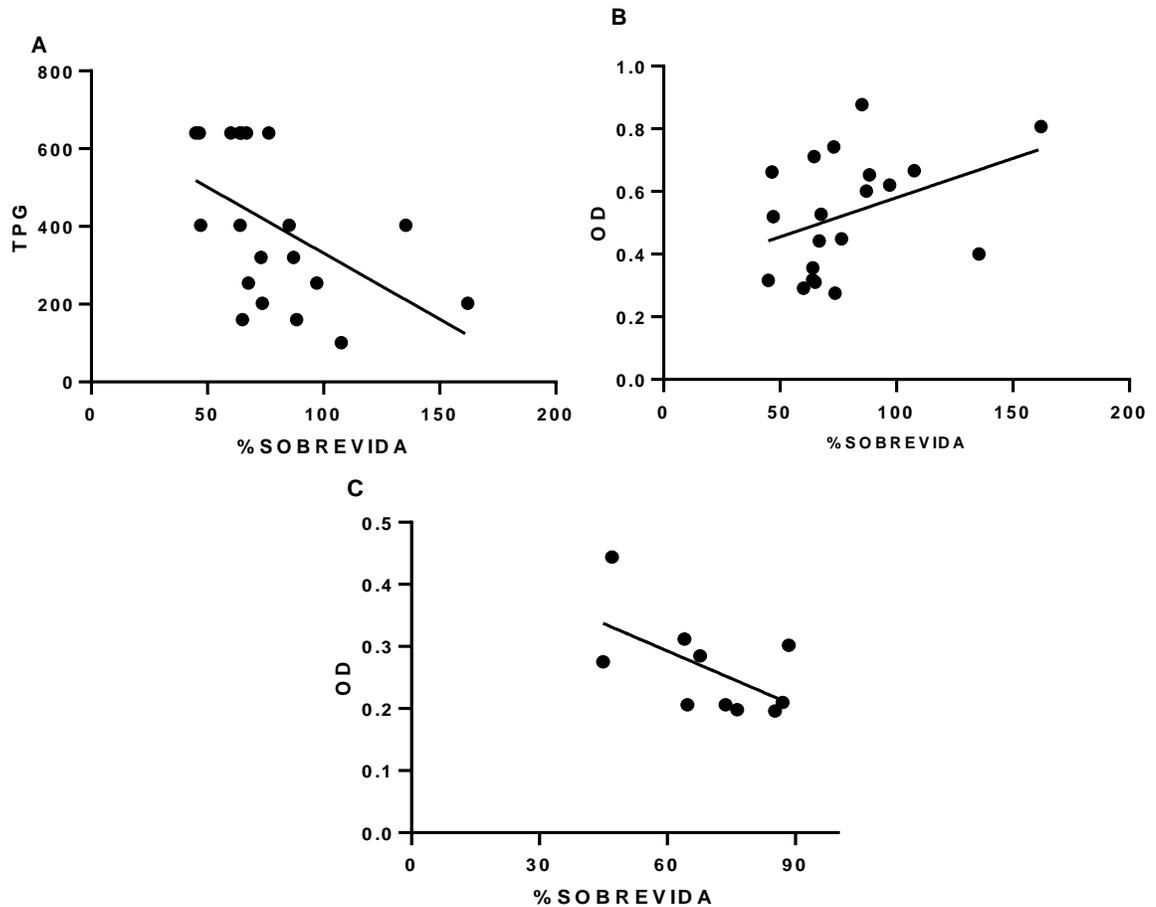


Figura 9.- Correlación de Spearman para producción de anticuerpos con el porcentaje de sobrevivida que define el fenotipo de resistencia o susceptibilidad. (A) Correlación negativa entre TPG de anticuerpos específicos *B. bigemina* y el % de sobrevivida; (B) correlación positiva entre la producción de anticuerpos (OD) específicos a MAP y % de sobrevivida; (C) no hay correlación estadística significativa entre producción de anticuerpos específicos contra *A. marginale* (OD) y % de sobrevivida. $p<0.05$

7.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR

7.2.1 Ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA)

Para medir la producción de IFN- γ primero se estimuló a los linfocitos T con el antígeno respectivo en cultivos de sangre completa. En este estudio se propuso medir la producción de IFN- γ contra *A. marginale*, MAP y *B. bigemina*. Los antígenos utilizados fueron: extracto crudo de cuerpos iniciales de *A. marginale*, extracto crudo de merozoitos de *B. bigemina* y PPDA. Previo a realizar los ensayos se probó la funcionalidad de los antígenos, para lo cual se utilizaron cultivos de sangre de animales infectados con los patógenos antes mencionados. La producción de IFN- γ se midió en el sobrenadante de los cultivos por medio de una ELISA indirecta. En la Figura 10 se observa producción de IFN- γ en cultivos que fueron estimulados con dos volúmenes del antígeno crudo de *A. marginale*, comprobando que tienen el mismo efecto, por lo que se decidió utilizar la concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ para estimular cultivos de sangre de los bovinos incluidos en el estudio (Anexo 5). De igual forma se verificó la funcionalidad del PPDA en un grupo de ovinos de un hato con antecedentes de paratuberculosis, para lo cual los cultivos de sangre completa se estimularon con 5 $\mu\text{g/ml}$ de PPDA de acuerdo a lo recomendado en el inserto y se observó producción de IFN- γ a las 20, 68 y 120 horas (Figura 11) (Anexo 6). Con base en estos resultados se pudieron definir los volúmenes de 15 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno crudo de *A. marginale* por muestra y 5 $\mu\text{g/ml}$ de PPDA para estimular los cultivos de sangre completa por un tiempo de incubación de cinco días. Con respecto al antígeno crudo de *B. bigemina*, no se pudo probar si era capaz de estimular a los linfocitos en cultivos de sangre completa. Ya que se obtuvieron resultados negativos al probar dos concentraciones del antígeno en cuatro muestras de bovinos seropositivos a la infección (Figura 12) (Anexo 7).

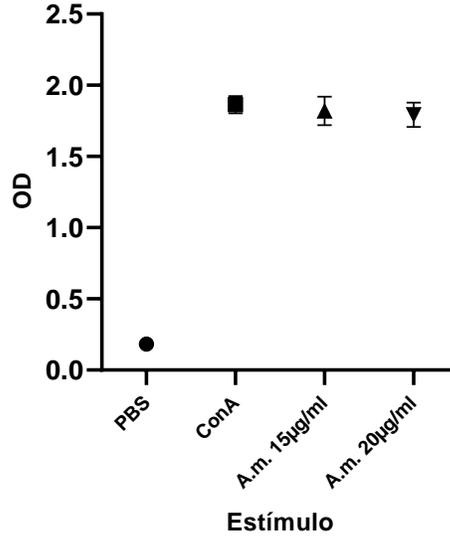


Figura 10.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de *Anaplasma marginale* en cultivo de sangre completa. Cultivos incubados por 5 días con 15µg/ml y 20µg/ml de antígeno crudo de *A. marginale* (A.m.); PBS (control negativo) o ConA (control positivo). Los sobrenadantes se analizaron por ELISA y los resultados se presentan como la media de dos replicas. Se obtiene OD de 1.820 y 1.793 al estimular con 15 µg/ml y 20 µg/ml del extracto respectivamente. (Media \pm SD).

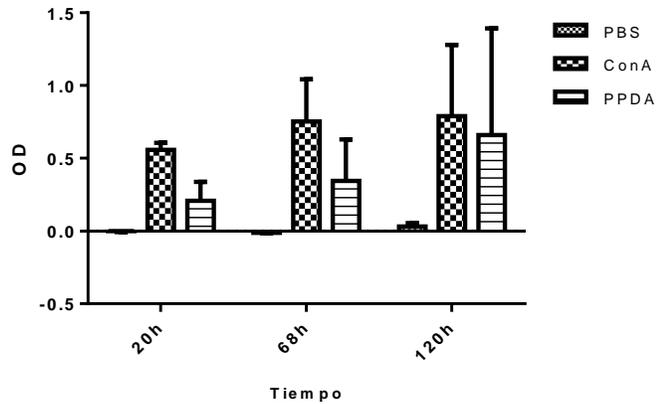


Figura 11.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de MAP en cultivo de sangre completa. Cultivos de sangre de ovinos incubados con 5µg/ml de PPDA; PBS (control negativo) o ConA (control positivo). Los sobrenadantes se colectaron

en tres tiempos diferentes, se analizaron por ELISA y los resultados se presentan en OD. Cada barra representa el promedio de un total de cinco ovinos.

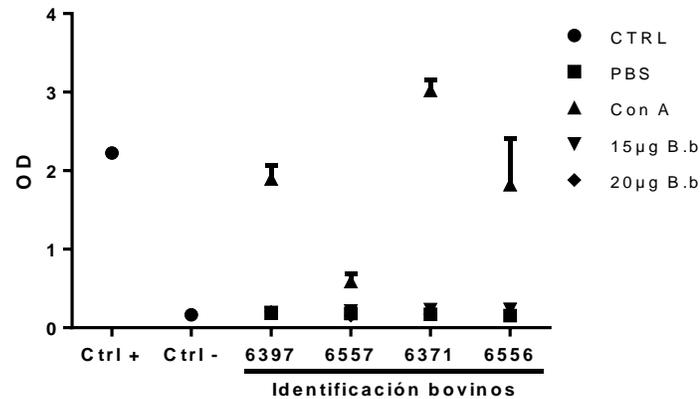


Figura 12.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de *Babesia bigemina* en cultivo de sangre completa. Cultivos incubados por cinco días con 15 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno crudo de *B. bigemina* (B.b). Muestras de cuatro bovinos seropositivos a *B. bigemina* (6397, 6557, 6371, 6556), PBS (control negativo) o ConA (control positivo), CTRL (controles de la técnica). Los sobrenadantes se analizaron por ELISA y los resultados se presentan en OD.

Una vez comprobado que los antígenos eran funcionales, se procedió a realizar los estímulos en los cultivos de sangre completa de los bovinos caracterizados como resistentes o susceptibles, los resultados fueron negativos para los 20 bovinos en los tres muestreos, ya que se registraron OD similares a los controles negativos en todos los sobrenadantes de los cultivos, estimulados tanto con el antígeno de *A. marginale* y *M. avium* spp *paratuberculosis* (Figura 13A, B) (Anexo 8).

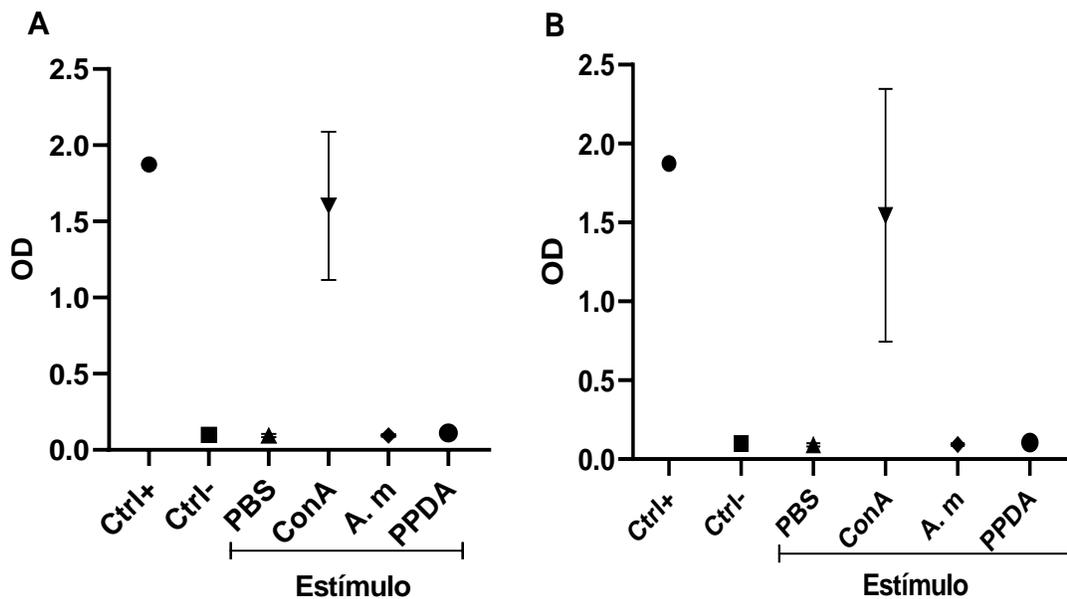


Figura 13.- Producción de IFN- γ frente al antígeno de *Anaplasma marginale* y al PPDA en cultivo de sangre completa de bovinos. Cultivos de sangre incubados por 5 días con 15 μ g de antígeno crudo de *A. marginale* (A.m.), 5 μ g de PPDA; PBS (control negativo) y ConA (control positivo); ctrl+ y ctrl- (controles de la técnica). (A) resistentes, (B) susceptibles. Los resultados se presentan como la media de un total de 10 bovinos (Media \pm SD).

Luego de analizar todos los resultados obtenidos, se puede observar que los 20 bovinos incluidos en el estudio fueron serológicamente positivos, es decir producen anticuerpos contra *A. marginale*, *B. bigemina* y MAP, sin embargo, todos fueron negativos en los ensayos IGRA, no hubo producción de IFN- γ frente a los antígenos utilizados de *A. marginale* y MAP (Anexo 9)

7.3 Aislamiento e identificación de MAP

Al realizar los cultivos de las 20 muestras, se encontraron colonias características de MAP en 17 muestras a la quinta semana de incubación, lo cual representa un 65% de positivos (Figura 14A). Mientras que en los análisis de microscopia se

encontraron bacterias ácido alcohol-resistentes (BAAR) en los frotis de las 11 muestras analizadas a la tercera semana de realizado los cultivos (Figura 14B).

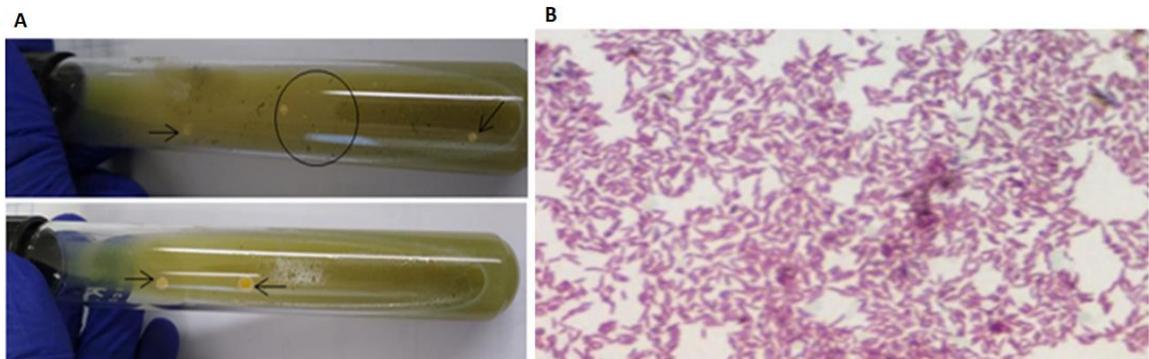


Figura 14.- Aislamiento e identificación de MAP a partir de muestras de materia fecal. (A) Colonias características de MAP obtenidas mediante el cultivo de muestras de materia fecal en medio de cultivo Herrold suplementado con micobactina (flechas negras). (B) Bacilos ácido alcohol-resistentes en frotis a partir de cultivos de muestras de heces, teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen.

8. DISCUSIÓN

Los efectores finales de la respuesta inmune humoral y celular, como anticuerpos e IFN- γ respectivamente, son clave en la respuesta del huésped contra infecciones causadas por *A. marginale*, *B. bigemina* o MAP. Varios estudios revelan que luego de una infección con cualquiera de los patógenos mencionados, el huésped desarrolla una respuesta inmune mediada por células con el objetivo de controlar la diseminación de los patógenos por el organismo. A medida que progresa la enfermedad también se desarrolla una respuesta mediada por anticuerpos que pueden desempeñar funciones como opsoninas y favorecer la eliminación de los microorganismos por parte de las células fagocíticas o llegar a neutralizarlos y así contrarrestar la infección (Martínez *et al.*, 2012; Maroudam *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 1998b; Norimine *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2016).

La resistencia natural podría estar asociada con varios factores, como la respuesta inmune. Por lo que se consideró que bovinos clasificados como resistentes tendrían una mayor producción de anticuerpos específicos e IFN- γ , en comparación con bovinos clasificados como susceptibles, además porque bovinos resistentes poseen macrófagos con mayor capacidad para controlar el crecimiento bacteriano (Qureshi *et al.*, 1996). Por lo tanto, se decidió asociar la respuesta inmune humoral y celular con resistencia o susceptibilidad. Si bien no fue posible asociar la respuesta inmune celular, debido a que no se encontró producción de IFN- γ , lo que se pudo hacer, fue asociar la respuesta inmune humoral, midiendo producción de anticuerpos. Los resultados indican que la asociación con un fenotipo u otro podría depender del antígeno.

Al realizar las pruebas serológicas, se encontró que los bovinos incluidos en el estudio desarrollaron una respuesta inmune humoral específica en contra de *A. marginale*, *B. bigemina* o MAP. Todos los bovinos del estudio (10 resistentes y 10 susceptibles) resultaron seropositivos a *B. bigemina* y MAP, lo cual indica que los bovinos entraron en contacto con estos patógenos. Sin embargo, solo la mitad de los animales fueron seropositivos (5 resistentes y 5 susceptibles) a *A. marginale*.

Esto último podría deberse a que no todos los bovinos entraron en contacto con *A. marginale* durante su vida. Probablemente se deba a que la cantidad de este patógeno en el predio no sea tan significativo. Lo cual también explicaría las OD registradas al realizar la ELISA para *A. marginale*. Ya que los valores obtenidos clasifican a 10 muestras en el grupo de seropositivos, pero estos en promedio no superan una absorbancia de 0.3, que es tres veces menor a la registrada en el control positivo. Lo que indica que la producción de anticuerpos específicos a *A. marginale* es muy baja en la población de bovinos del estudio.

Considerando como limitante el hecho de no poder identificar el momento exacto de la infección, se realizaron tres muestreos con el propósito de reducir el error en los resultados, sobre todo porque el periodo de incubación de cada una de las enfermedades es diferente (López *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009; Valentin-Weigand y Goethe, 1999). También es necesario mencionar que no se determinó si los anticuerpos producidos estaban relacionados con el control de los patógenos, ya que no se identificó el subtipo de anticuerpos IgG, tomando en cuenta que el subtipo IgG2 tiene una mayor capacidad de fijar el complemento y actuar como opsonina (Petrigh, 2010). Por lo tanto, como experimentos adicionales, se podría realizar un ELISA para identificar el isotipo de anticuerpos; o llevar a cabo ensayos de seroneutralización. Además, para el caso de *B. bigemina*, en las IFIs se utilizó un conjugado que reconoce la molécula completa de IgG bovino, pero también podría reconocer las cadenas ligeras de otras inmunoglobulinas. En este punto nos encontramos con la limitante de que los resultados obtenidos de las IFIs no indican exclusivamente producción de IgG-total, pero sí de anticuerpos específicos a *B. bigemina*.

Se comparó la producción media de anticuerpos entre los grupos resistente y susceptible. De tal forma que al medir producción de anticuerpos específicos contra *B. bigemina*, en el grupo resistente se obtuvo un título de anticuerpos promedio de 463, mientras que en los susceptibles fue de 266. Por lo que se encontró una diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que los bovinos

resistentes generan una mayor producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina*. Se conoce previamente que los macrófagos de los bovinos resistentes tienen una mayor capacidad para controlar el crecimiento de *B. abortus*. Así también se ha encontrado mayor producción de anticuerpos en bovinos caracterizados como resistentes a *B. abortus* (Martínez *et al.*, 2010). Con los resultados del presente estudio, se podría decir que dichos macrófagos también tendrían la capacidad para controlar la sobrevivencia de *B. bigemina*. Por lo tanto, realizarían una eficiente fagocitosis y procesamiento de eritrocitos parasitados. Una mejor presentación de los antígenos a los linfocitos T, llevarían a desarrollar una respuesta Th1 o Th2, con la consiguiente producción de citocinas que ayudarían a definir la generación de ciertos tipos de anticuerpos. En este caso no se puede decir que los anticuerpos producidos están relacionados con mejor control y neutralización de los parásitos, ya que no se determinó el isotipo de anticuerpos.

Al realizar el análisis de correlación de Spearman se observó una correlación negativa entre los niveles de producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina* representados como el título promedio geométrico y el % de sobrevivencia ($r=-0.6280$, $p=0.0015$), lo cual una vez más indica que una mayor producción de anticuerpos está asociada con el fenotipo de resistencia. Los resultados indican que hay una relación entre las dos variables. Sin embargo, únicamente el 39% de la variabilidad observada en el título de anticuerpos está explicada por la relación con el % de sobrevivencia, mientras que el 61% restante se debe a otras variables. Siendo importante considerar que en el desarrollo de anticuerpos también intervienen otro tipo de células, como las células dendríticas que pueden movilizarse y presentar eficientemente los antígenos a los Linfocitos T. Los diferentes tipos de citocinas, destacando el papel del IFN- γ en el aumento de la expresión de las MHC I y II, las cuales son moléculas polimórficas, generando diferencias entre individuos de una misma especie (Yewdell y Bennink, 1992). También, es importante considerar la proliferación celular, mientras más número

de clonas, la respuesta será mayor. En la respuesta inmune humoral destaca la activación de los linfocitos B, la cual depende del reconocimiento del antígeno, la intervención de otros estímulos como proteínas del complemento y de los linfocitos T cooperadores. La activación incluye proliferación, diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria. En el proceso de producción de anticuerpos, se activan genes que favorecen al cambio de clase y la maduración de afinidad relacionada con hipermutación somática. El número de mutaciones aumenta durante la respuesta inmune, sobre todo en respuestas posteriores. De tal forma que conforme aumenta la edad, se incrementa el número de mutaciones, lo cual indica que hay un mayor número de células B de memoria que entran en el proceso de hipermutación somática (Abbas *et al.*, 2018). Este proceso se lleva a cabo en los centros germinales, por lo que la presencia del antígeno en estas zonas y la intervención directa de los linfocitos T, favorece la proliferación de clonas con mayor afinidad (García, 2000). Por lo tanto, una variación en el desarrollo de la respuesta inmune podría afectar la magnitud de la respuesta entre individuos.

Al comparar la producción media de anticuerpos contra MAP, expresados en OD, se observa que es mayor en el grupo susceptible (0.609 OD) que en el resistente (0.445 OD). Estos resultados indican que la respuesta inmune humoral no está relacionada con el fenotipo de resistencia, como sucede en el caso de anticuerpos contra *B. bigemina*. Lo cual se comprueba con el análisis de correlación de Spearman. En este caso se encontró una correlación positiva entre los niveles de producción de anticuerpos específicos a MAP representados como OD y % de sobrevivida ($r=0.4301$, $p=0.0292$), lo que quiere decir que animales con el fenotipo de susceptibilidad tienen mayor producción de anticuerpos. Se encontró relación entre las dos variables, pero solo el 18% de la variabilidad observada en las OD está explicado por la relación con el % de sobrevivida, mientras que el 82% restante se debe a otros factores, como los antes mencionados. Si bien el fenotipo de resistencia se maneja como capacidad de macrófagos para controlar el

crecimiento intracelular, por ende, una respuesta más eficiente para controlar una infección. Sin embargo, en una infección ocasionada por MAP, no necesariamente una mayor producción de anticuerpos está relacionada con protección o eficiente control de la micobacteria. Incluso se considera que una respuesta inmune mediada por anticuerpos está relacionada con una mayor eliminación de micobacterias a través de las heces (Magombedze *et al.*, 2016). La diferencia observada en la producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina* o MAP, tanto en el grupo de bovinos resistentes como susceptibles, no se vio influenciada por la edad de los animales, ya que al emplear el estadístico U de Mann Whitney no se encontró diferencia estadística significativa en la media de edad entre los grupos ($p=0.1108$; $p>0.05$). La edad promedio en el grupo de bovinos resistentes fue de 5.4 años, mientras que en el grupo susceptible fue de 7.5 años.

En relación con los anticuerpos contra *A. marginale* no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos resistente y susceptible, por lo tanto, tampoco se determinó una correlación estadística significativa entre producción de anticuerpos y el fenotipo (resistente o susceptible). En este caso es importante tomar en cuenta que la n es muy pequeña, ya que únicamente se tienen cinco animales en cada grupo, por lo que los datos no son suficientes para demostrar comportamientos diferentes de la respuesta inmune. Además, estaría relacionado con la cantidad de antígeno inoculada y la etapa de la enfermedad, tomando en cuenta la baja respuesta de anticuerpos específicos a *A. marginale* registrada en los animales muestreados.

Como se señaló anteriormente, se encontró asociación entre niveles de anticuerpos y la resistencia natural. Con estos resultados, se considera a los anticuerpos como un factor inmune que está relacionado con la resistencia a enfermedades. En conjunto con otros factores, como se ha publicado en estudios previos. Así, por ejemplo, se ha encontrado asociación entre variantes alélicas del gen *CLEC7A* y la resistencia a MAP. El gen *CLEC7A* codifica una molécula de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato y se expresa en APC y

células fagocíticas (Kumar *et al.*, 2019). También se ha encontrado asociación entre los alelos 16 (10%), 18 (2.4%), 20 (8.7%), y 27 (30.7%) del gen *BoLA-DRB3.2*, con la presencia de un menor número de garrapatas en bovinos. A su vez consideran que estos alelos están relacionados con la resistencia a garrapatas (Martínez *et al.*, 2006). En un estudio de resistencia a *B. abortus* en ganado bovino, encuentran asociación entre el fenotipo de resistencia y los marcadores SNP4 y 3'UTR del gen *Slc11a1* (también llamado *Nramp1*: proteína tras membrana que se expresa en macrófagos, asociado con resistencia natural) (Martínez *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que una mayor producción de ON estaría asociado con el fenotipo de resistencia. Así, en un estudio encontraron que, macrófagos que tenían una mejor capacidad para controlar el crecimiento de *M. bovis*, presentaban una mayor producción de ON (Esquivel-Solís *et al.*, 2013).

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede notar que hay un comportamiento particular de la respuesta inmune de los bovinos frente a la infección causada por *A. marginale* o MAP. Como se describió anteriormente los 20 bovinos incluidos en el estudio dieron resultados positivos a la producción de anticuerpos específicos para MAP, pero no hubo producción de IFN- γ en cultivos estimulados con PPDA. Estos resultados coinciden con varios estudios en los cuales se menciona que conforme progresa la enfermedad predomina un tipo de respuesta inmune (Ganusov *et al.*, 2015; Vázquez *et al.*, 2013; Waters, 2003). La paratuberculosis es una enfermedad que adquieren los animales a temprana edad. De tal forma que los animales jóvenes cuando se infectan desarrollan una respuesta celular de tipo Th1 con un incremento en la producción de citocinas como IFN- γ , IL-12, IL-2 e IL-6, lo cual es característico de la fase subclínica de la enfermedad, con la eliminación intermitente de micobacterias a través de las heces. En esta fase es importante el papel de los linfocitos T ya que estimula a los macrófagos a la destrucción de las micobacterias y a destruir macrófagos o células dendríticas infectadas, mecanismo que realizan los linfocitos T citotóxicos (Begg *et al.*, 2011; Maroudam *et al.*, 2015). Luego de un largo periodo de

incubación que puede ser de 2 años o más, la infección puede pasar a la fase clínica donde ocurre un cambio en la respuesta inmune y se observa mayor producción de citocinas Th2 (IL-4, TGF- β) y Treg (IL-10), lo que lleva a un incremento en la producción de anticuerpos y a una disminución de la producción de IFN- γ (Coussens, 2004; Dernivoix *et al.*, 2017). Esto podría explicar el porqué de los resultados obtenidos, ya que todos los bovinos incluidos en el estudio tenían más de tres años de edad, eran hembras y algunas de ellas estaban en periodo de gestación o en lactancia, situaciones que condicionan para que los animales pasen a la fase clínica de la enfermedad, esto por el estrés inmunosupresor (Stabel y Goff, 2004). Además, se considera que una alta respuesta mediada por anticuerpos predice una alta eliminación de las micobacterias, lo cual podría ser explicado por una falla en el control del crecimiento bacteriano (Magombedze *et al.*, 2016). Esto concuerda con los hallazgos de este estudio, ya que adicionalmente se tomaron muestras de heces de los bovinos y se decidió identificar al agente infeccioso por cultivo y frotis (tinción de Ziehl–Neelsen). De los 20 bovinos 17 fueron positivos a cultivo, de estos se realizaron frotis únicamente de 11, en todos se observaron BAAR. Por lo tanto, se podría decir que estaban eliminando a las micobacterias a través de las heces al momento de realizar los muestreos. Sin embargo, no se pudo confirmar que MAP estaba presente en las muestras de heces, mediante un análisis por PCR.

Para el caso de *A. marginale*, ocurre el mismo efecto, de los 20 bovinos incluidos en el estudio, únicamente 10 fueron seropositivos al medir anticuerpos específicos contra *A. marginale*, pero no se observó producción de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo de dichos animales. Lo cual no concuerda con un estudio realizado por Bautista *et al.* (2003), en el cual demostraron que luego de la infección con *A. marginale* se desarrolla una respuesta inmune humoral y celular, y que luego de una reinfección hay un aumento significativo de la producción de IFN- γ . En otro estudio mencionan que la infección en animales jóvenes es menos

severa, esto porque la respuesta inmune celular es mayor por la competencia del timo y por una mayor actividad del sistema hematopoyético, además se considera que está parcialmente relacionada con la inmunidad, mientras que la respuesta de anticuerpos se podría relacionar con la resistencia (Corona *et al.*, 2005). Por otro lado, los resultados obtenidos pudieran deberse a que el extracto crudo de los cuerpos iniciales de *A. marginale*, empleado para estimular a los linfocitos T en cultivos de sangre completa, se elaboró con la cepa Tizimin obtenida en el INIFAP de Jiutepec, Morelos. Mientras que los animales del estudio están ubicados en otra región, donde las cepas de *A. marginale* probablemente tienen alguna variación con la cepa Tizimin. Por lo tanto, los animales no tendrían células de memoria que reaccionen frente a un antígeno con el cual no han tenido previo contacto, ya que se ha encontrado que aislados de *A. marginale* provenientes de distintas zonas geográficas no generan protección cruzada (Kocan *et al.*, 2006; Ocampo *et al.*, 2006). Este supuesto fue probado en parte, ya que se determinó que el antígeno era capaz de estimular a células obtenidas de un bovino infectado con la misma cepa de la cual proviene el antígeno (Figura 10). Adicionalmente sería necesario aislar las o la cepa de *A. marginale* presente en el predio, al cual pertenecen los animales del estudio. Preparar el antígeno crudo a partir de los aislados, y con este repetir los ensayos IGRA.

Otra razón para que no se haya encontrado producción de IFN- γ , es la anergia de los linfocitos T. Tomando en cuenta la edad de los animales, y que se desconoce el momento en el cual entraron en contacto con el patógeno, es posible que los animales hayan sido expuestos varias veces a los patógenos estudiados. Por lo tanto, exista un agotamiento de los linfocitos, como se ha reportado en el caso de linfocitos TCD8+, los cuales al estar agotados presentan menos proliferación, menor producción de IFN- γ y menor actividad citotóxica (Abbas *et al.*, 2018). La anergia es un proceso que puede ser inducido, cuando el TCR se liga por antígeno, pero no hay coestimulación. En este caso podría ser que existe una excesiva presentación de antígenos, pero una deficiente producción de citocinas.

También se ha encontrado que IL-10 puede regular negativamente la expresión de moléculas coestimuladoras en las APC, asociado con el cambio de respuesta Th1 a Th2 (Giménez *et al.*, 2009), e incluso IL-10 puede tener un efecto anergizante directo sobre células T. Los eventos bioquímicos que caracterizan este proceso son: hipofosforilación del TCR- ζ y activación defectuosa de ZAP70 y Ras (Jenkins y Schwartz, 1987; Sloan-Lancaster *et al.*, 1994; Schwartz, 1996). Por lo que resultaría interesante evaluar estos eventos en cultivos de linfocitos T pertenecientes a los bovinos del estudio, y medir su capacidad proliferativa.

Con respecto a la respuesta celular contra *B. bigemina*, no fue posible medir producción de IFN- γ . Luego de la obtención del extracto crudo de merozoitos de *B. bigemina* cepa Nayarit, se probó su funcionalidad en cultivos de sangre completa de bovinos seropositivos a la infección. Pero no se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo tanto, no se pudo utilizar dicho antígeno para estimular a los linfocitos en cultivos de sangre de los bovinos del estudio. Es posible que el protocolo de obtención del antígeno no haya sido eficiente. Lo cual podría haber sido comprobado, determinando la presencia de proteínas inmunogénicas de *B. bigemina* en el extracto, mediante la purificación de proteínas por el método de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, del inglés *fast protein liquid chromatography*). Por el tiempo y la cantidad de extracto disponible, no fue posible realizar esto. Otra razón por la que no funcionó el extracto, se deba a la naturaleza de las cepas. Ya que los animales de los cuales se obtuvieron las muestras para los ensayos preliminares se encontraban en Morelos. Donde posiblemente las cepas de *B. bigemina* que estén infectando a los bovinos, presenten alguna diferencia con respecto a la cepa aislada de Nayarit. Tomando en cuenta que proteínas de membrana externa de *B. bigemina* presentan polimorfismo antigénico (McElwain *et al*, 1991; Fisher *et al*, 2001).

Durante el desarrollo de la investigación se han encontrado varias limitantes, como: 1) El número de animales incluidos en el estudio. Estadísticamente 20 corresponde a una n pequeña, por lo que no se puede asegurar con precisión

suficiente los resultados obtenidos. Un cambio en el tamaño de la muestra podría modificar el número de animales caracterizados como resistentes o susceptibles, lo cual implicaría una variación importante en las mediciones de los efectores finales de la respuesta inmune. 2) En el presente estudio, los resultados sugieren que hay una asociación entre la respuesta inmune humoral y la resistencia natural en bovinos, pero esta relación es baja. Así la fuerza de relación entre una mayor producción de anticuerpos específicos contra *B. bigemina* y el fenotipo de resistencia fue de 63%. Para el caso de MAP, se asocia una mayor producción de anticuerpos con el fenotipo de susceptibilidad, en este caso la fuerza de relación es de 43%. Esto podría deberse, a que los bovinos fueron caracterizados como resistentes o susceptibles a *B. abortus* o *M. bovis* BCG, mientras que la producción de anticuerpos se midió contra otros patógenos. Si bien todos son intracelulares, convendría realizar un estudio en el cual se evalúe la respuesta inmune contra los mismos patógenos a los que son resistentes o susceptibles, y de esa forma asociar la resistencia natural con la respuesta inmune. 3) No se conocía el número de veces que los bovinos estuvieron en contacto con los patógenos estudiados. 4) Tampoco se conocía el momento de la infección. Por lo tanto, en un estudio posterior, sería conveniente utilizar un mayor número de animales, controlando todas las variables, como: la edad, el tiempo de infección, la dosis del antígeno a inocular, y la naturaleza de los antígenos a utilizar en los ensayos IGRA. Partiendo de este estudio, donde se observa que la respuesta inmune humoral contra *B. bigemina* y MAP tiene asociación con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad en el ganado *Bos taurus indicus*.

9. CONCLUSIONES

Dentro del grupo de bovinos (n=20), se encontró 50% de bovinos resistentes y 50% de susceptibles a patógenos de vida intracelular (*B. abortus* o *M. bovis* BCG).

No se pudo aceptar o rechazar en su totalidad la hipótesis planteada. Debido a que, se logró medir la producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina*, *A. marginale* y MAP, pero no la producción de IFN- γ en respuesta a los patógenos mencionados. De tal forma que únicamente se pudo establecer asociación entre respuesta inmune humoral específica a *B. bigemina* y MAP con el fenotipo de resistencia o susceptibilidad, respectivamente.

Dicha asociación parece ser dependiente del antígeno, ya que se encontró que bovinos caracterizados como resistentes a patógenos de vida intracelular (*B. abortus* o *M. bovis* BCG), tienen mayor producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina* en comparación con bovinos susceptibles. Mientras que al medir la producción de anticuerpos específicos a MAP, esta fue mayor en el grupo susceptible que en el resistente. Y no se encontró diferencia entre la cantidad de anticuerpos específicos a *A. marginale* entre los grupos de bovinos resistentes y susceptibles.

10. REFERENCIAS

1. Thornton PK. Livestock production: recent trends, future prospects. *Phil Trans R Soc B*. 2010;365:2853–67.
2. Borboa MGC, Aguirre AJ. Análisis socioeconómico de la ganadería doble propósito en el sur del Estado de México, para identificar oportunidades de desarrollo. [Tesis: Licenciado en Contaduría]. Estado de México (Mx.): Universidad Autónoma del Estado de México; 2018.
3. Alexandratos N, Bruinsma J. *World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 Revision*. ESA Working Paper No. 12-03. Rome, FAO. 2012.
4. Nájera AG. Evolución social y económica de unidades de producción de ganado bovino doble propósito en Tlatlaya, Estado de México. [Tesis: Licenciada en Contaduría]. Estado de México (Mx.): Universidad Autónoma del Estado de México; 2016.
5. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial (DIEES). *Panorama Agroalimentario*. México. [Internet]. 2017 [Citado el 17 de septiembre de 2020]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017_1_.pdf
6. Rodríguez MS, Flores S, León MA, Pérez HL, Aguilar ÁJ. Diagnóstico de sistemas de producción de bovinos para carne en Tejupilco, Estado de México. *Rev Mex Cienc Agric*. 2018;9(2):465-71.
7. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *Ganadería en México*. [Internet]. 2018 [Citado el 17 de septiembre de 2020]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017_1_.pdf
8. OIE. Organización Mundial de la Salud Animal. Código sanitario para los animales terrestres. *Babesiosis bovina*. 2008. Capítulo 2.4.2. Paris-Francia.: 1-13pp.

9. Bock RE, Kingston TG, Vos AJ. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1999;77(7):461-64.
10. Martínez A, Santillán M, Guzmán C, Favila L, Córdova D, Díaz E, et al. Desarrollo de un inmuno-ensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos. Rev Mex Cienc Pecu. 2012;3(1):1-18.
11. Templeton JW, Smith R, Adams G. Natural disease resistance in domestic animals. JAVMA. 1988;192(9):1306-15.
12. Bertoni, G., Minuti, A., & Trevisi, E. (2015). Immune system, inflammation and nutrition in dairy cattle. Ani Prod Sci. 2015;55(7):943-8.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. Novena edición. Barcelona (España): ELSIEVER; 2018.
14. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;392(6673):245–52.
15. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. Annu Rev Immunol. 2015;33:643–75.
16. Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 2010;10(8):543-53.
17. Cadavid LS. Sistemas inmunes alternativos. Acta biol Colomb. 2011;16(3):189-96.
18. Van den Elsen PJ, Gobin SJ, van Eggermond M, Peijnenburg A. Regulation of MHC class I and II gene transcription: differences and similarities. Immunogenet. 1998;48:208–21.
19. Szabo S, Sullivan B, Peng S, Glimcher L. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol. 2003;21:713–58.
20. Gutiérrez PJ. Inmunología veterinaria. Ciudad de México (México): Editorial El Manual Moderno; 2010.
21. Kidd P. Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev. 2003;8(3):223-46.

22. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001;22(10):556-60.
23. Mata-Espinosa DA, Hernández-Pando R. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Rev Invest Clin.* 2008;60(5):421-31.
24. Mitchison N. T-cell–B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:308-12.
25. Papa I, Vinuesa CG. Synaptic interactions in Germinal Centers. *Front Immunol.* 2018;9(1858):1-10.
26. Stanfield RL, Wilson IA. Antibody Structure. *Microbiol Spectr.* 2014;2(2):10.
27. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem.* 2016;60:275-301.
28. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la Microbiología. Novena edición. Buenos Aires (Argentina): Editorial Panamericana; 2007.
29. Golub ES. Base celular de la respuesta inmunológica. Un enfoque de la inmunobiología. Barcelona (España): Editorial Reverté S.A; 1986.
30. Surco LV. Inmunidad humoral. *Rev Med Act Clin.* 2011;13:654-7.
31. Hutt Comstock. Genetic resistance to disease in domestic animals. Publishing Co., associated with Cornell University Press, Ithaca, N. Y. 1958.
32. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996;50:55-65.
33. Gutiérrez-Pabello J, Adams G. Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares. *Vet Méx.* 2003;34(3):277-81.
34. Esquivel-Solís H, Vallecillo AJ, Benítez-Guzmán A, Adams LG, López-Vidal Y, et al. (2013) Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *PLoS ONE.* 2013;8(5): e63464. doi:10.1371/journal.pone.0063464

35. Castillo VU. Efecto de la resistencia natural a *Mycobacterium bovis* en la activación de los macrófagos bovinos por la vía alterna. [Tesis de Maestría]. Ciudad de México (Mx): UNAM; 2009.
36. Adams GL. Natural disease resistance in domestic animals with emphasis on intracellular bacterial disease: functional and genetic basis. *J Am Vet Med Assoc.* 1988;192(9):1306-15.
37. Sánchez LA, Flores VS, Gutiérrez PJ. Naturally *Mycobacterium bovis* infected cattle evoked heterogeneous cellular immune responses. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2018;9(1):171-83.
38. González RS, Cantó AG, Rodríguez-Hernández E, Flores VS, Román PS, Milián SF. Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2018;9(2):328-45.
39. Villar VC. Los cruzamientos genéticos una alternativa para el control de la garrapata común del ganado *Boophilus microplus* en Suramérica. 2006. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/los-cruzamientos-geneticos-alternativa-t26656>.
40. Parker RJ, Shepherd RK, Trueman K F, Jones GW, Kent AS, Polkinghorne IG. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. *Vet Parasitol* 1985;17(3):205-13.
41. Goff WL, Jhonson WC, Paris SM, Barrington GM, Tuo W, Valdez RA. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 2001;23(3):463-71.
42. Suarez CE, Alzan HF, Silva MG, Rathinasamy V, Poole WA, Cooke BM. Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit?. *Int J Parasitol.* 2018:1-39.
43. Madruga CR, Marques AP, Araújo FR, Migueta M, Carvalho CM, Araújo FS, Umaki AC, Crocci AJ, Queiróz RA. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2001;21(2):72-6.

44. Goncalves RP, Passos LM, Machado RZ, Lima JD, Ribeiro MF. Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(2):237-40.
45. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust Vet J. 1972;48:292-98.
46. López M, Figueroa JV, Ramos JA, Mosqueda JJ, Rojas E, Vega CA et al. Infection and Seroconversion of Susceptible animals introduced into a Babesiosis endemic area. Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann NY Acad Sci. 2008;1149:31-5.
47. Santamaria EM, Rojas MC, Martínez GG, Figueroa MJ, Álvarez MJ, Lira AJ, Polanco MD. El impacto del cambio climático en la incidencia de la babesiosis bovina en México. CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP, Jiutepec, Morelos. 2018. Consultado 01 de abril de 2020. Disponible en: <https://www.ganaderia.com/destacado/El-impacto-del-cambio-climatico-en-la-incidencia-de-la-babesiosis-bovina-en-Mexico>.
48. Petrigh RS. Identificación y caracterización de antígenos de *Babesia bigemina*. [Tesis: PhD]. Buenos Aires (Arg.); Universidad de Buenos Aires; 2010.
49. Shoda LK, Palmer G, Florin-Christensen J, Florin-Christensen M, Godson D, Brown W. *Babesia bovis*-Stimulated macrophages express interleukin-1b, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. Infect Immun. 2000;68(9):5139-45.
50. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. Immunol. 1979;38:249-56.
51. Rodríguez SD, Palmer GH, McElwain TF, McGuire TC, Ruef BJ, Chitko-McKown CG, Brown WC. CD4+ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein I. Infect Immun. 1996;64(6):2079-87.

52. OIE. Organización Mundial de la Salud Animal. Manual terrestre de la OIE. Anaplasmosis bovina. 2015. Capítulo 2.4.1. Paris-Francia.: 1-16pp.
53. Rodríguez CS, García O, Ocampo R, Vega y Murguía C. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. *Infect Genet Evol.* 2009;9:1092-1101.
54. Becerro CA. Evaluación inmunogénica de péptidos y proteínas de superficie de *Anaplasma marginale*. [Tesis: Maestro en Biotecnología]. Cuernavaca (Mx.): Universidad Autónoma de Morelos; 2019.
55. Rodríguez CS, García OM, Aboytes TG, Cantó AR. Inmunología e inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria.* 2003; 9(4): 123-163.
56. Brown WC, Shkap V, Zhu D, McGuire TC, Tuo W, McElwain TF, Palmer GH. CD41 T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Responses in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge. *Infect Immun.* 1998a;66(11):5406-13.
57. Córdoba HM. Anaplasmosis bovina: abordaje clínico y patológico de la enfermedad. [Monografía: Médico Veterinario]. Antioquía (Col.): Corporación Universitaria Lasallista; 2016.
58. Bautista C, Pedraza G, Rosenstein Y, Ontiveros J. Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *Anaplasma marginale*. *Vet Méx.* 2003;34(3):247-59.
59. Zapata RM, Rodas GJ, Maldonado EJ. Bovine paratuberculosis: ¿Do we know the real situation of this disease in Colombian cattle?. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008;21:420-35.
60. Valentin-Weigand P, Goethe R. Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes Infect.* 1999;1:1121-27.
61. Maroudam V, Subramanian BM, Praveen Kumar P, Dhinakar Raj G. Paratuberculosis: Diagnostic methods and their constraints. *J Veterinar Sci Technol.* 2015;6(5):1-9.

62. Magombedze G, Eda S, Koels A. Can immune response mechanisms explain the fecal shedding patterns of cattle infected with *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis*?. PLoS ONE. 2016;11(1):1-21.
63. FAO. Opportunities for incorporating genetic elements into the management of farm animal diseases: policy issues, por S. Bishop, M. de Jong y D. Gray. Background Study Paper Number 18. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma. 1999.
64. Zapata SR, Lara RN, Baena ZA, Reyes VJ, Ríos OL. Seroprevalence of bovine babesiosis at the Vegas de la Clara Farm, Gómez Plata (Antioquia), 2008. Rev Med Vet. 2011;21:63-71.
65. Parsons SD, Warrena RM, Ottenhoff TH, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in dogs in a high-risk setting. Res Vet Sci. 2012;92:414-9.
66. Dernivoix K, Roupie V, Welby S, Roelandt S, Viart S, Letesson J, et al. Field performance of six *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens in a 20 h interferon gamma release assay in Belgium. Vet Immunol Immunopathol. 2017;189:17-27.
67. Spearman C. The Proof and Measurement of Association between Two Things. Am J Psychol. 1904;15(1):72-101.
68. Carter GR. Staining Procedures. In: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Carter GR and Cole JR, Jr. (eds.). 5th ed. San Diego, USA. Academic Press, Inc. 1990: 521-2.
69. Weber MF, van Schaik JV, van Maanen C. Evaluation of Ziehl–Neelsen stained faecal smear and ELISA as tools for surveillance of clinical paratuberculosis in cattle in the Netherlands. Prev Vet Med. 2009;92:256-66.
70. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Ann Appl Stat. 1947;18(1):50-60.

71. Brown WC, McElwain TF, Hötzel I, Ruef BJ, Rice-Ficht AC, Stich RW, et al. Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1998b;92(4):473-82.
72. Norimine J, Mosqueda J, Suarez C, Palmer G, McElwain T, Mbassa G, et al. Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* Rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect Immun*. 2003;71(9):5021-31.
73. Zhao L, Mahony D, Cavallaro AS, Zhang B, Zhang J, Deringer JR, et al. Immunogenicity of outer membrane proteins VirB9-1 and VirB9-2, a novel nanovaccine against *Anaplasma marginale*. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0154295.
74. Martínez R, Dunner S, Toro R, Tobón J, Gallego J, Cañón J. Effect of polymorphisms in the Slc11a1 coding region on resistance to brucellosis by macrophages in vitro and after challenge in two Bos breeds (Blanco Orejinegro and Zebu). *Genet Biol Mol*. 2010;33(3):463-70.
75. Yewdell JW, Bennink JR. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol*. 1992;52:1-123.
76. García JA. Las implicaciones de la hipermutación somática, en la generación de la diversidad en la respuesta inmunológica. *Rev Centro Inv*. 2000;4(15):89-93.
77. Kumar S, Kumar S, Singh RV, Chauhan A, Kumar A, Bharati J, Singh SV. Association of Bovine *CLECTA* gene polymorphism with host susceptibility to paratuberculosis disease in Indian cattle. *Res Vet Sci*. 2019;123:216-22.
78. Martinez ML, Machado MA, Nascimento CS, Silva MV, Teodoro RL, Furlong J, et al. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet Mol Res*. 2006;5(3):513-24.

79. Ganusov V, Klinkenberg D, Bakker D, Koets AP. Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in cattle. *Vet Res.* 2015;46(62):1-13.
80. Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. Specific antibody and Interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLoS ONE.* 2013;8(5):e64568.
81. Waters WR, Miller JM, Palmer MV, Stabel JR, Jones DE, Koistinen KA, et al. Early Induction of Humoral and Cellular Immune Responses during Experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infection of Calves. *Infect Immun.* 2003;71(9):5130-8.
82. Begg DJ, de Silva K, Carter N, Plain KM, Purdie A, Whittington RJ. Does a Th1 over Th2 dominance really exist in the early stages of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections?. *Immunobiology.* 2011;216:840-6.
83. Coussens PM. Model for Immune Responses to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Cattle. *Infect Immun.* 2004;72(6):3089-96.
84. Stabel JR, Goff JP. Efficacy of immunologic assays for the detection of Johne's disease in dairy cows fed additional energy during the periparturient period. *J Vet Diagn Invest.* 2004;16:412-20.
85. Corona B, Rodríguez M, Martínez S. Anaplasmosis bovina. *REDVET.* 2005;6(4):1-27.
86. Kocan KM, Blouin E, Barbet AF. Anaplasmosis Control: Past, Present, and Future. *Ann NY Acad Sci.* 2006:501-9.
87. Ocampo EV, Salazar VE, Durán AM, García OM, Cantó AG, Rodríguez SD. *Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Vet Microbiol.* 2006;114:34-40.
88. Giménez JF, Rivera PS, Deward J. Caracterización de la respuesta inmunitaria de bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* en condiciones

de campo en el Municipio Colón, Estado Zulia, Venezuela. Rev Cient. 2009;19(5):475-85.

89. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. J Exp Med. 1987;165(2):302-19.
90. Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. Cell. 1994;79:913-22.
91. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism?. J Exp Med. 1996;184:1-8.
92. McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, McGuire TC. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. Mol. Biochem. Parasitol. 1991;47:213-22.
93. Fisher TG, McElwain TF, Palmer GH. Molecular Basis for Variable Expression of Merozoite Surface Antigen gp45 among American Isolates of *Babesia bigemina*. Infect Immun. 2001;69(6):3782-90.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de registro de bovinos incluidos en el estudio

REGISTRO BOVINOS "LA SOLEDAD"					
ID	SINIIGA	AÑO-nacimiento	GENOTIPO	MICROBICIDAS	
				% SOBREVIDA	FENOTIPO
348-6	3067123586	2016	BR	65,00	Resistente
349-6	3067123614	2016	BR	66,79	Resistente
358-6	3067123562	2016	BR	60,00	Resistente
367-6	3067123595	2016	BR	44,89	Resistente
379-7	3068277531	2017	BR	64,00	Resistente
796-1	3061932628	2011	BR	46,55	Resistente
799-1	3070991556	2011	BR	63,93	Resistente
880-2	3068277533	2012	BR	64,66	Resistente
954-4	3064511971	2014	BR	67,66	Resistente
964-4	3064511978	2014	BR	47,01	Resistente
48-6	3061932655	2006	BR	97,10	Susceptible
171-8	3067123631	2009	BR	107,66	Susceptible
380-7	3068277523	2017	BR	73,00	Susceptible
792-1	6750	2011	BR	76,36	Susceptible
824-3	3067123623	2003	BR	135,38	Susceptible
864-2	3061932612	2012	BR	73,63	Susceptible
947-4	3064511972	2014	BR	87,00	Susceptible
952-4	3064511976	2014	BR	85,19	Susceptible
975-4	3064511989	2014	BR	88,41	Susceptible
980-4	3064511970	2014	BR	162,08	Susceptible

ID: identificación de los bovinos

BR: Brahman

ANEXO 2. Resultados de las IFIs para medir producción de anticuerpos específicos a *B. bigemina*.

Título de anticuerpos específicos contra <i>B. bigemina</i>				
ID Bovino	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	TPG/animal
Resistentes				
348	1:80	1:320	1:160	1:160
349	1:640	1:640	1:640	1:640
358	1:640	1:640	1:640	1:640
367	1:640	1:640	1:640	1:640
379	1:320	1:640	1:320	1:403
796	1:640	1:640	1:640	1:640
799	1:640	1:640	1:640	1:640
880	1:640	1:640	1:640	1:640
954	1:320	1:160	1:320	1:254
964	1:320	1:640	1:320	1:403
			TPG/grupo	1:463
Susceptibles				
48	1:320	1:160	1:320	1:254
171	1:80	1:80	1:160	1:101
380	1:320	1:160	1:640	1:320
792	1:640	1:640	1:640	1:640
824	1:160	1:640	1:640	1:403
864	1:320	1:160	1:160	1:202
947	1:320	1:640	1:160	1:320
952	1:320	1:640	1:320	1:403
975	1:160	1:160	1:160	1:160
980	1:640	1:160	1:80	1:202
			TPG/grupo	1:266

*Los resultados se presenta como títulos de anticuerpos.

TPG: Título Promedio Geométrico por animal (promedio de tres muestreos).

ANEXO 3. Resultados de ELISA para medir anticuerpos específicos a *A. marginale* (registrados en OD)

PRODUCCION DE ANTICUERPOS CONTRA <i>A. marginale</i>					
POSITIVO	1.109				
NEGATIVO	0.051			PC	0.192
	OD				
ID Bovino	M1	M2	M3	PROMEDIO/animal	DX
RESISTENTES					
367	0,133	0.414	0.278	0.275	+
379	0,041	0.643	0.253	0.312	+
880	0,133	0.235	0.252	0.206	+
954	0,318	0.257	0.281	0.285	+
964	0,587	0.445	0.300	0.444	+
			Promedio/grupo	0.305	
SUSCEPTIBLES					
792	0.224	0.139	0.229	0.198	+
864	0.042	0.237	0.337	0.206	+
947	0.193	0.180	0.258	0.210	+
952	0.153	0.222	0.212	0.196	+
975	0.163	0.623	0.119	0.302	+
			Promedio/grupo	0.222	

*(-): seronegativo, (+): seropositivo; M: muestra

ANEXO 4. Resultados ELISA para medir anticuerpos específicos contra MAP (registrados en OD).

Producción de anticuerpos contra MAP					
POSITIVO	1.164				
NEGATIVO	0.197			PC	0.22
	OD				
ID Bovino	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3	PROMEDIO/animal	DX
RESISTENTES					
348	0.136	0.555	0.239	0.310	+
349	0.306	0.501	0.519	0.442	+
358	0.170	0.396	0.308	0.291	+
367	0.173	0.382	0.391	0.316	+
379	0.233	0.554	0.280	0.356	+
796	0.421	0.793	0.772	0.662	+
799	0.204	0.405	0.346	0.318	+
880	0.485	0.712	0.934	0.711	+
954	0.352	0.643	0.587	0.527	+
964	0.354	0.643	0.564	0.520	+
			Promedio/grupo	0.445	
SUSCEPTIBLES					
48	0.424	0.743	0.694	0.620	+
171	0.518	0.679	0.800	0.666	+
380	0.631	1.016	0.580	0.742	+
792	0.394	0.692	0.261	0.449	+
824	0.190	0.429	0.581	0.400	+
864	0.131	0.308	0.386	0.275	+
947	0.598	0.554	0.650	0.601	+
952	0.820	0.830	0.981	0.877	+
975	0.668	0.671	0.619	0.653	+
980	0.798	0.689	0.933	0.807	+
			Promedio/grupo	0.609	

ANEXO 5. Resultados del ensayo IGRA, probando dos concentraciones del antígeno de crudo de *A. marginale*.

PRODUCCION DE IFN-γ contra <i>A. marginale</i>			
Control Positivo	1.840		
Control Negativo	0.271		
	OD		
ID: 135	R1	R2	PROMEDIO
PBS	0.184	0.179	0.182
ConA	1.906	1.820	1.863
A.M. 15 μ g	1.749	1.890	1.820
A.M. 20 μ g	1.853	1.733	1.793

*R: réplica

ANEXO 6. Resultados del ensayo IGRA, estandarizando el tiempo de incubación.

Producción de IFN-γ			
	OD		
			Antígeno
Tiempo	PBS	ConA	5μg PPDA
20h	-0.001	0.558	0.207
68h	-0.012	0.753	0.344
120h	0.030	0.789	0.659

*h: horas

ANEXO 7. Resultados del ensayo IGRA, probando el antígeno crudo de *B. bigemina*

PRODUCCION DE IFN-γ contra <i>B. bigemina</i>				
Control Positivo	2.226			
Control Negativo	0.164			
	OD			
ID	PBS	Con A	15μg B.b	20μg B.b
6397	0.021	1.732	0.031	0.038
6557	0.017	0.423	0.050	-0.009
6371	0.006	2.857	0.069	0.011
6556	-0.009	1.657	0.073	

ANEXO 8. Resultados de los ensayos IGRA (registrados como OD)

PRODUCCIÓN DE IFN-γ				
Positivo	1.874			
Negativo	0.099			
	OD			
ANTÍGENO				
ID	PBS	ConA	A. m	PPDA
RESISTENTES				
348	0.087	1.468	0.086	0.095
349	0.095	2.145	0.086	0.102
358	0.082	1.315	0.092	0.107
367	0.101	0.518	0.100	0.109
379	0.106	1.647	0.110	0.177
796	0.091	1.695	0.097	0.094
799	0.094	1.337	0.086	0.106
880	0.091	2.174	0.084	0.130
954	0.113	1.948	0.100	0.105
964	0.085	1.776	0.105	0.090
SUSCEPTIBLES				
48	0.079	2.287	0.087	0.094
171	0.100	1.742	0.108	0.117
380	0.090	2.461	0.090	0.108
792	0.112	1.172	0.103	0.100
824	0.094	0.637	0.094	0.093
864	0.083	2.069	0.091	0.111
947	0.089	0.303	0.089	0.091
952	0.089	1.133	0.098	0.125
975	0.084	2.617	0.086	0.114
980	0.081	1.037	0.082	0.103

*Cada resultado es el promedio de tres muestreos.

ANEXO 9. Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos para medir anticuerpos e IFN- γ .

ID	Producción de Anticuerpos			Producción de IFN- γ	
	MAP	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	MAP	<i>A. marginale</i>
RESISTENTES					
348	+	-	+	-	-
349	+	-	+	-	-
358	+	-	+	-	-
367	+	+	+	-	-
379	+	+	+	-	-
796	+	-	+	-	-
799	+	-	+	-	-
880	+	+	+	-	-
954	+	+	+	-	-
964	+	+	+	-	-
SUSCEPTIBLES					
48	+	-	+	-	-
171	+	-	+	-	-
380	+	-	+	-	-
792	+	+	+	-	-
824	+	-	+	-	-
864	+	+	+	-	-
947	+	+	+	-	-
952	+	+	+	-	-
975	+	+	+	-	-
980	+	-	+	-	-

(+) positivo; (-) negativo