



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

EMPLEO DE LA VACUNA DEL BACILO
CALMETTE-GUÉRIN (BCG) SUBCEPA PHIPPS EN
EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Jesús Enrique Díaz Cruz

ASESORES:

Dr. Fernando Díaz Otero

M en C. Laura Jaramillo Meza

MVZ. Rafael Pérez González



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALEDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

“Empleo de la vacuna del bacilo Calmette – Guérin (BCG) subcepa Phipps en el control de la tuberculosis bovina”.

Que presenta el pasante: Jesús Enrique Díaz Cruz
Con número de cuenta: 311275360 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Abril de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-----------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | M. en E. Susana Elvira García Vázquez | |
| VOCAL | M.V.Z. Rafael Pérez González | |
| SECRETARIO | M. en C. Salvador Carlos Flores Peinado | |
| 1er. SUPLENTE | M.V.Z. Norma Micaela Villamil González | |
| 2do. SUPLENTE | M. en M.V.Z. Héctor Reyes Soto | |

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

MCVB/ntm*



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



El estudio se realizó en el Laboratorio de Inmunología del CENID-Salud Animal e Inocuidad del INIFAP, con recursos fiscales otorgados por esta Institución para la ejecución del Proyecto de Investigación **“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNES ASOCIADOS A LA EFICACIA VACUNAL CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA ”**, con número de registro 142 945 340 13 en el Sistema Institucional de la Gestión Integral (SIGI).

Dedicatoria

A mis padres Cesar y María que me han apoyado incondicionalmente y siempre que lo he necesitado, a mi hermana Brenda que me ayudó y me animó muchísimo durante el desarrollo con esta tesis, a mi prima Karen que me motivo a acabarla en tiempo y forma, así como a toda mi familia.

A todos mis amigos: Eudílilíplodínium Magú, Kat, Rebecca, Karina, Sarai, Fernanda, los Kevins (Eve, Lina, Dianita, Samuel, Verito y Vanessa) Franco, Nacho, Atzín y Fannys, gracias por todas las aventuras que he tenido con ustedes y por brindarme su amistad durante esta bella etapa que fue la universidad.

A los MVZ Ivan Sanchez Montes de Oca y MVZ Berenice Villegas por todas sus enseñanzas.

Agradecimientos

- *A mis Asesores el Dr. Fernando Díaz, a la M en C. Laura Jaramillo Meza y al MVZ Rafael Pérez por su paciencia y asesoría durante el desarrollo de esta tesis y por todo el conocimiento que me brindaron, a la Dra. Anabel Manzo Sandoval, así como al MVZ Fernando Diosdado Vargas por su apoyo y ayuda.*
- *A los MVZ Heber Martínez Estrella y al MVZ Ricardo de la Cruz Navarro por su apoyo durante el muestreo de los animales.*
- *A la FES Cuautitlán por haberme brindado la posibilidad de mejorar académicamente y como persona.*

Índice

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA | 3 |
| 1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA | 6 |
| 1.3 IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN LA SALUD PÚBLICA | 7 |
| 1.4 PATOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA | 9 |
| 1.5 RESPUESTA INMUNE CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA | 11 |
| 1.6 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO | 16 |
| 1.6.1 ELISA Indirecto | 16 |
| 1.6.2 Prueba de liberación de interferón γ o Ensayo IGRA | 17 |
| 1.6.3 Prueba de la tuberculina | 19 |
| 1.6.4 Fundamento de la hipersensibilidad dérmica tardía | 20 |
| 1.7 VACUNAS PARA LA PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA | 23 |
| 1.7.1 Vacunas inactivadas | 24 |
| 1.7.2 Vacunas ADN recombinante | 24 |
| 1.7.3 Vacunas de atenuación génica | 26 |
| 1.7.4 Vacunas recombinantes | 26 |
| 1.7.5 Historia de la vacuna BCG | 27 |
| 1.8 DEFINICIÓN DE BIOSEGURIDAD | 35 |
| 1.8.1 Bioseguridad en la tuberculosis bovina | 36 |
| 2. HIPÓTESIS | 43 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 43 |
| 4. OBJETIVOS PARTICULARES | 43 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 44 |
| 5.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO | 44 |
| 5.2 ANIMALES DE ESTUDIO Y DISEÑO EXPERIMENTAL | 45 |
| 5.2 PRUEBA DE LA TUBERCULINA CERVICAL COMPARATIVA | 48 |
| 5.3 OBTENCIÓN DE LOS REACTIVOS BIOLÓGICOS. | 50 |
| 5.3.1 Obtención de la vacuna BCG subcepa Phipps | 50 |
| 5.3.2 Obtención de los extractos proteicos del Filtrado de Cultivo de <i>M. bovis</i> AN5 y <i>M. avium</i> D4 | 52 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4 MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD CONSIDERADAS TANTO EN ESTABLO EN PRODUCCIÓN COMO EN LA ZONA DE RECRÍA | 53 |
| 5.5 VACUNACIÓN DE BECERRAS CON BCG <i>M. BOVIS</i> PHIPPS 1×10^5 UFC | 54 |
| 5.6 SEGUIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR EN GRUPO EXPERIMENTAL (BECERRAS). (2° PARTE EXPERIMENTAL EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE) | 55 |
| 5.7 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETERMINAR ANTICUERPOS HACIA <i>M. BOVIS</i> , Y <i>M. AVIUM</i> | 56 |
| 5.8 ESTIMULACIÓN IN VITRO DE CULTIVOS DE SANGRE COMPLETA | 57 |
| 5.9 ENSAYO DE LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA | 57 |
| 5.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 58 |
| 6. RESULTADOS | 59 |
| 6.1 VACUNACIÓN DE BECERRAS CON BCG 1×10^5 UFC | 59 |
| 6.2 RESPUESTA INMUNE CELULAR Y HUMORAL | 65 |
| 7. DISCUSIÓN | 68 |
| 8. CONCLUSIONES | 79 |
| 9. REFERENCIAS | 81 |
| 10. ÍNDICE DE FIGURAS | 105 |

Abreviaturas.

| | |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| Ac | Anticuerpo |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Ag | Antígeno |
| APC | Célula presentadora de antígeno |
| BCG | Bacilo Calmette Guérin |
| CANETB | Campaña nacional para la erradicación de la tuberculosis bovina |
| CDs | Célula dendrítica |
| CFP-10 | Proteína de filtrado de cultivo |
| CFP | Filtrado de proteico de cultivo |
| CMH | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| DIVA | Marcador diferencial entre animales vacunados e infectados |
| ELISA | Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas |
| ESAT-6 | Proteína antigénica de secreción temprana |
| ERK | Vía de la Cinasa regulada por señales extracelulares |
| HDT | Hipersensibilidad dérmica tardía |
| HIMB | Vacuna <i>Mycobacterium bovis</i> inactivada por calor |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IGRA | Ensayo de liberación de interferón gamma |
| IL | Interleucina |
| IMC | Inmunidad mediada por células |
| LAM | Lípidoarabinomananos |

| | |
|------------------|----------------------------------------------------|
| M1 | Macrófago activado M1 |
| MA | Macrófagos alveolares |
| MTBC | Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NK | Célula asesina natural |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PPD | Derivado proteico purificado |
| PRRs | Receptor de reconocimiento de patrones moleculares |
| PTCC | Prueba de la tuberculina cervical comparativa |
| RD | Región de diferenciación |
| rRNA | Ácido Ribonucleico ribosomal |
| SIAP | Servicio de información agroalimentaria y pesquera |
| SNP | Polimorfismo de nucleótido simple |
| TB | Tuberculosis |
| TBb | Tuberculosis bovina |
| TBh | Tuberculosis humana |
| TCR | Receptor de linfocito T |
| T _H 1 | Linfocito cooperador tipo 1 |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TLR | Receptor tipo Toll |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| ULBP1 | Proteína de unión a UL16 |
| UPP | Unidad de producción pecuaria |
| WC1 | Grupo de diferenciación linfocitaria 1 |

Resumen

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad crónica del ganado, ocasionada por *M. bovis* perteneciente al complejo *M. tuberculosis* (MTBC), tiene importancia por sus grandes pérdidas económicas en la producción lechera: desecho temprano de animales y afectaciones a la fertilidad, además de que representa una amenaza a la salud pública, debido a su carácter zoonótico y a que se está suscitando un incremento de esta enfermedad. Una de las tendencias a nivel mundial, ha sido el empleo de la vacuna BCG para el control de la tuberculosis bovina. La BCG fue desarrollada a partir de una cepa de *M. bovis*, la cual mundialmente se ha empleado en la prevención de la tuberculosis humana (TBh), pero relegada en la salud animal debido a la interferencia con las pruebas de campo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la vacuna BCG, subcepa Phipps en un hato con alta prevalencia de TBb, con la intención de controlar, reducir la enfermedad, y paralelamente, determinar si esta cepa produce interferencia vacunal con la prueba diagnóstica. El estudio se dividió en dos fases; en la primera se le aplicó la PTCC a 475 vacas del establo de producción (A) y a 423 becerras de la recría (establos B y C), posteriormente se vacunó tanto a la población en producción como la población de recría con BCG Phipps 1×10^5 UFC/ 1.5 ml, conjuntamente se establecieron ciertas medidas de bioseguridad y se le dio seguimiento durante dos años, manteniendo la vacunación en toda la recría menor a 4 meses continuamente. En la segunda fase experimental se seleccionaron 20 becerras menores a 4 meses de edad, negativas a la PTCC, IGRA y ELISA. De éstas, 10 fueron vacunadas con BCG Phipps 1×10^5 UFC (1.5 ml) y las 10 becerras restantes, como grupo control vacunadas con 1.5 ml de buffer de fosfatos estéril (PBS) a manera de placebo. A ambos grupos se les tomó muestras de sangre a los 15, 30, 60, 120, 360 y 480 días del experimento, se determinaron niveles de IgG mediante ELISA e IFN- γ mediante el kit BOVIGAM® del mismo modo se les aplicó la PTCC a los 6, 12 y 18 meses para evaluar su reactividad. Tras dos años, la prevalencia de TBb se redujo en los establos B y C de 17.7 % a 10.4 % y en el establo A, de 47.1 % a 20.9 % denotando una eficacia vacunal calculada de 55.62 %. En los grupos experimentales, se observaron incrementos significativos en el índice de estimulación antigénica (I.E.) de IFN- γ a los 30 días ($p < 0.05$) y a los 180 días ($p < 0.05$) con

respecto al grupo control y diferencias significativas ($p < 0.05$) para los días 30, 60, 180, 360 con respecto al primer y último muestreo. En la PTCC, solo un animal del grupo experimental resultó reactor, pero al siguiente muestreo fue negativo, mientras que, en el grupo experimental, 2 animales resultaron reactores a los 12 meses, además, positivos a la prueba IGRA y permanecieron así consecuentemente. Por lo anterior, la BCG subcepa Phipps mostró una eficacia vacunal aceptable y una producción de IFN- γ indicativa de una respuesta inmune celular protectora. Uno de los aspectos más importantes que se observó es que no interfiere con las pruebas diagnósticas establecidas por la normativa mexicana, ya que, en los pocos animales reactores, esta se pierde con el tiempo. La BCG subcepa Phipps a dosis de 1×10^5 UFC es una alternativa viable para controlar la TBb en hatos lecheros con altas prevalencias, con la condición previa y determinante de implementar un buen programa de bioseguridad dentro de la UPP lechera.

Palabras Clave: *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis bovina, Bacilo Calmette Guérin, BCG, IGRA.

1. Introducción

La tuberculosis bovina (TBb), se define como una enfermedad bacteriana crónica de los animales causada por especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), principalmente por *M. bovis* ⁽¹⁾.

La enfermedad guarda importancia por el elevado impacto socioeconómico que produce, principalmente en los sistemas de producción bovinos-leche ⁽¹⁾.

La TBb se ha detectado prácticamente en todos los países del mundo, con importantes variaciones en su control, según su nivel de progreso económico, social y cultural. Es así que, en países en vías de desarrollo, la TBb tiene un patrón endémico, cuyas prevalencias varían según las áreas geográficas y sistemas de producción. En países desarrollados, los programas de control han tenido éxitos relativos; dado que, se ha registrado que pese al programa de control que se lleva, las incidencias se pueden incrementar por la presencia de mamíferos domésticos y de vida silvestre en los sistemas de producción bovina; así como, por la introducción de ganado infectado no detectado oportunamente ^(2,3,4).

La ganadería es un sistema productivo de suma importancia para México, ya que su producción representa una fuente de proteína para la nutrición de la población del país, que crece en forma acelerada, y además provee de empleo a un sector importante de la planta productiva del país ⁽⁵⁾.

La TBb es una de las enfermedades más problemáticas que enfrenta la ganadería nacional; ya que, además de representar un riesgo para la salud animal, se traduce en grandes pérdidas económicas directas e indirectas



derivadas del pobre desarrollo de los animales, retención de canales en rastros, disminución de la producción láctea, calculada ésta en 17 % ⁽⁶⁾, menor producción de terneras, animales desechados prematuramente y pérdida de genética al desechar el pie de cría infectado ^(1,5).

Mientras el programa de control de la enfermedad basado en la detección de animales mediante la prueba de tuberculina y posterior remoción del animal reactor del hato infectado, es la columna vertebral en los programas de control de la tuberculosis en países desarrollados, esta política tiene numerosos inconvenientes en países en vías de desarrollo ⁽⁷⁾.

Para lograr reducir los índices de la enfermedad en zonas de alta prevalencia se ha considerado implementar programas de vacunación; debido a ello, en la actualidad y a nivel mundial existe un auge considerable en la investigación en esta área. Si bien, existe un gran interés por parte de los productores por esta medida de control, se han encontrado algunos obstáculos para su aplicación a nivel de campo, relacionados con la posible interferencia en las pruebas inmunodiagnósticas, en particular con la prueba de tuberculina⁽⁸⁾; lo que ha conducido, por un lado a buscar antígenos que al emplearse en los métodos diagnósticos permitan diferenciar los animales vacunados de infectados, mientras que, por otro lado la investigación se ha enfocado en determinar dosis de vacuna, cepa vacunal, eficiencia protectora y edad óptima a la cual debe aplicarse la vacuna, entre otras variables ⁽⁹⁾.

Es así que en la última década se han probado una gran variedad de vacunas, las cuales van desde las vacunas de ADN, vacunas subunitarias (proteínas), vectores vivos (virus atenuados recombinados) y cepas atenuadas de *M. bovis*



y micobacterias no relacionadas ⁽¹⁰⁾. Las consecuencias negativas productivas, sanitarias y comerciales que derivan de esta enfermedad son incentivos suficientes, para favorecer la búsqueda de un programa preventivo, efectivo y seguro contra la TBb ⁽¹¹⁾.

1.1 Generalidades de la tuberculosis bovina

El agente causal de la TBb es *M. bovis*, es un miembro del complejo *M. tuberculosis* (MTBC), el cual incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* ⁽¹²⁾.

Las micobacterias son microorganismos intracelulares facultativos de morfología bacilar, aerobios, no móviles y no esporulados. Se caracterizan por poseer una pared celular rica en lípidos, confiriéndoles la propiedad física de ácido alcohol resistencia a la decoloración con fucsina básica (rojo) la cual penetra en la célula por acción del fenol, el calor y adicionalmente, influyen en su tinción, virulencia y resistencia a condiciones ambientales ⁽¹³⁾ (Figura 1). Las especies individuales difieren en tamaño, los bastones de *M. bovis* son delgados y de alrededor de 4 µm de largo. Las micobacterias patógenas crecen lentamente a una temperatura optima de 37°C, bajo condiciones aeróbicas, las colonias no son perceptibles hasta que los cultivos han sido incubados por al menos 3 semanas ⁽¹⁴⁾.

Por las condiciones citoquímicas de estas bacterias son consideradas como Gram⁺, pero frecuentemente resisten la tinción Gram, sin embargo, pueden



ser teñidas con carbolfucsina (tinción Ziehl-Neelsen) o tinciones fluorescentes (Auramina-Rodamina) ⁽¹³⁾.

Su tiempo de duplicación es de 12 horas o más por lo que su crecimiento en medios de cultivo es muy lento. Es sensible al calor y a los rayos ultravioleta; además de, presentar resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación, lo cual se relaciona por las propiedades fisicoquímicas de su pared celular, pues posee un alto contenido de lípidos (40%), proteínas y polisacáridos; es rica en ácidos micólicos, los cuales se encuentra unidos covalentemente a glicolípidos, tales como: el α , α' [-tetrahalosa dimicolato (TDM, factor cuerda) y α , α' trihalosa monomicolato (TMM)]. Estas características de su pared contribuyen a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia a muchos antibióticos a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria. Inicia las reacciones inflamatorias del huésped y actúa en la patogénesis de la enfermedad.

Todos los miembros del MTBC exhiben un 99.9 % de similitud en sus secuencias genéticas y en su ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16S a excepción de *M. canetti* ⁽¹⁶⁾.

Las diversas especies que conforman el Complejo *M. tuberculosis* son capaces de producir enfermedad con patología similar ⁽¹⁷⁾.

Entre las moléculas involucradas en la virulencia de las micobacterias destacan ⁽¹⁸⁾:



- Lípidos Micobacterianos.
 - Lipidoarabinomananos (LAM).
 - Lipomananos (LM).
 - Fosfatidilinositol manósidos (PIMs).
 - Trehalosa-6-6'-dimicolato (TDM) (Factor cuerda).
 - Fenotiocerol dimicocerosato (PDIM) y glicolípidos fenólicos (PGL).

- Sistemas de secreción de la micobacteria.
 - Transportador TAT
 - Transportador ESX (ESX-1 al ESX-5)

- Proteínas PE: PE-PPE y PE-PGRS.

- Lipoproteínas.
 - LpqH.
 - LppX.
 - MpT83
 - LprG
 - RpfB
 - LpqS
 - LprN
 - LprI
 - PstS



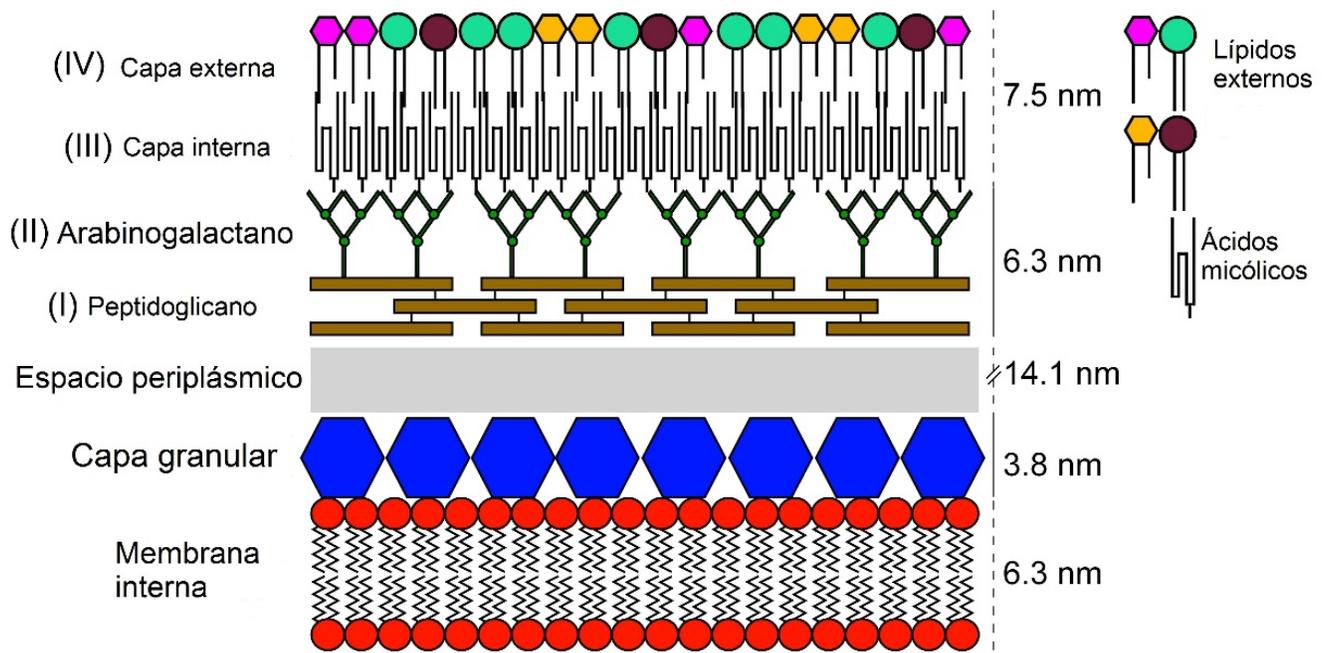


Figura 1. Pared Celular de las Micobacterias de interior a exterior: Membrana interna, Capa granular, Espacio periplásmico, (I) Peptidoglicanos, (II) Arabinogalactanos, (III) capa lipídica interna, (IV) Capa lipídica externa (modificado de ¹⁵).

1.2 Importancia económica de la tuberculosis bovina

Se ha estimado que a nivel mundial existen más de 50 millones de cabezas de ganado infectado con *M. bovis* ⁽¹⁹⁾. En nuestro País y de acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) existen entre 2.5 a 3.0 millones de bovinos con función zootécnica de producción de leche, en los cuales se estima una prevalencia del 16 % de TBb ^(20,21). La presencia de la enfermedad en los establos, ocasiona serias pérdidas económicas, al reducir la eficiencia productiva y reproductiva de los animales ^(22,19). Al respecto, se ha informado pérdidas que van del 4 al 12 % en la producción láctea, así como una disminución en la fertilidad y la tasa de preñez por inseminación artificial ^(23, 24). Por otra parte, se menciona que la producción se reduce notablemente



de 120 kg a 574 kg por lactación en vacas rectoras, y con una pérdida gradual de peso corporal de hasta 15 %, aunado a esto se añaden las pérdidas al sacrificio por decomiso parcial o total de las canales ⁽²⁵⁾. De modo que las pérdidas se resumen de la siguiente manera ⁽²²⁾:

- Pérdidas por decomiso parcial o total de las canales afectadas.
- Pérdidas en peso corporal de los animales afectados detectados.
- Pérdidas en peso en los animales no detectados.
- Pérdidas en la producción de terneros.
- Pérdidas en la producción de leche.
- Costo de las pruebas de tuberculina.
- Tratamiento e incapacidad laboral en el personal infectado.

1.3 Importancia de la tuberculosis bovina en la salud pública

La tuberculosis humana (TBh), es actualmente un problema de salud pública, que ha mostrado un incremento significativo a nivel mundial como consecuencia del desarrollo de casos de TB multidrogorresistente (TB-MDR), así como de TB extremadamente resistente a drogas (TB-XDR), aunado con las complicaciones que representan las comorbilidades como el VIH/SIDA y la diabetes mellitus, entre otras ⁽²⁶⁾.

En general, se consideran como agentes etiológicos de la enfermedad en los seres humanos: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* (subtipos I y II), el bacilo de Calmette Guérin (BCG), y *Mycobacterium canetti*, especies que como se comentó anteriormente, se integran dentro del complejo de *M.*



tuberculosis, siendo no obstante la especie *M. tuberculosis* el principal microorganismo involucrado.

De acuerdo a la OMS en el 2016 ocurrieron casi 1.7 millones de muertes por TBh y 10.4 millones de nuevas infecciones en todo el mundo ⁽²⁷⁾. De las cuales, se estima el 3 % se deben a tuberculosis de origen zoonótico ⁽²⁸⁾. *M. bovis* es el principal agente causal de la TB zoonótica humana, no obstante, otras especies del Complejo MTBC puede estar involucradas.

La tuberculosis zoonótica ocurre por transmisión directa mediante la exposición con animales infectados y de forma indirecta al consumir lácteos no pasteurizados o por la manipulación de carne contaminada ^(19,29). Esta zoonosis es poco frecuente en países donde se produce leche pasteurizada y se implementan programas de erradicación de la enfermedad en los bovinos. Sin embargo, continúa informándose en zonas donde el control de la enfermedad es ineficiente. Esta incidencia es mayor entre los agricultores, los empleados de frigoríficos y demás personas que trabajan con ganado bovino.

Al respecto, en México se ha estimado una tasa general de letalidad de tuberculosis humana del 17 % debida a *M. tuberculosis* ⁽³⁰⁾. Sin embargo, en un estudio retrospectivo de TBh en Jalisco, un estado con una gran población de ganado lechero, se registró una alta incidencia de tuberculosis extra pulmonar (56 %), de la cual el 19.2 % se presentó en trabajadores que realizaban actividades ganaderas y agrícolas, sugiriendo un origen zoonótico para estos casos ⁽³¹⁾. Mientras que, en otro análisis epidemiológico realizado en Querétaro, se reportó una incidencia de 5.09 % de una población diagnosticada con TBh con infección por *M. bovis*, dicho diagnostico se realizó



a través de aislamiento bacteriológico y con ayuda de metodologías de biología molecular de PCR ⁽³²⁾. En otro estudio, se reportan incidencias del 30.2 % de *M. bovis* en la a población humana evaluada ⁽³³⁾.

Mayormente, la TB zoonótica producida por *M. bovis* también plantea un desafío para el tratamiento del paciente, debido a su resistencia natural a la pirazinamida (PZA), uno de los cuatro medicamentos de primera línea utilizados en el tratamiento de la TB ^(34,35). Aunado a lo anterior, la enfermedad producida por *M. bovis* en el humano es virtualmente indistinguible de la provocada por *M. tuberculosis* ⁽²⁶⁾. Por tanto, la TBb zoonótica representa un foco importante de infección para los humanos que no debe subestimarse ⁽³¹⁾.

1.4 Patología de la tuberculosis bovina

La ruta más común de infección es mediante la inhalación de microgotas en aerosol conteniendo los bacilos tuberculosos expelidos por los animales enfermos. Las micobacterias, a nivel pulmonar originan una pequeña lesión granulomatosa, que se produce tras la interacción de los bacilos con los macrófagos activados y el endotelio alveolar. denominándose afección primaria. Dependiendo de su número, capacidad de virulencia y estatus inmune del animal los bacilos podrían ser destruidos por las células fagocíticas produciendo un foco de alveolitis exudativa. Sin embargo, sí los macrófagos no logran su eliminación, se convierten en células hospederas y acarreadoras de los bacilos a los linfonodos regionales, donde la infección puede restringirse, o bien producir mayores lesiones, resultado de la serie de respuestas tisulares e



inmunológicas que se desencadenan. Es así que, el complejo puede evolucionar hacia la curación, la latencia o, en algunos casos a su diseminación vía linfática y sanguínea, dando lugar a una tuberculosis generalizada o miliar, caracterizada por lesiones granulomatosas en pulmón, hígado, bazo, glándula mamaria y linfonodos asociados ⁽³⁶⁾.

A la necropsia, es común observar una neumonía granulomatosa, así como linfadenomegalia ⁽³⁷⁾ y ocasionalmente timpanismo gaseoso ⁽³⁸⁾. Las lesiones más comunes, conforman nódulos o tubérculos de consistencia firme, de coloración grisácea a amarillenta y consistencia caseosa o caseo-calcárea ⁽³⁹⁾, que se localizan en los linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mediastínicos, y con menor frecuencia, en las tonsilas palatinas y los linfonodos mandibulares, parotídeos y mesentéricos ⁽⁴⁰⁾, estas lesiones también son comúnmente descritas en áreas dorsocaudales y subpleurales del pulmón así como en los lóbulos caudales ^(40,41). Las lesiones pulmonares se encuentran con una frecuencia del 10 - 30 % de los casos, y las lesiones generalizadas se reportan en cerca del 1 - 3 % de los animales con lesiones visibles de tuberculosis ⁽⁴¹⁾. Si la diseminación es súbita y masiva, las micobacterias se distribuirá ampliamente por todos los tejidos y órganos, con pequeños focos de infección y el proceso se clasificará como una tuberculosis miliar. La lesión insignia de esta enfermedad es el granuloma. Los granulomas tempranos, se componen histológicamente por células epiteliodes y células gigantes de Langhans al centro de la lesión, rodeado de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Posteriormente se desarrolla necrosis caseosa al centro del granuloma, encapsulada por fibrosis en la periferia para dar lugar al granuloma avanzado ⁽⁴⁰⁾.



Si el patógeno entra por la ingestión de pastura contaminada, agua, leche, calostro, o alimento contaminado, se establecerá la forma de infección gastrointestinal de la enfermedad ^(3,42). Aunque estas son las rutas más comunes de contagio, también pueden ocurrir la transmisión cutánea, genital y congénita ⁽⁴³⁾.

1.5 Respuesta inmune contra la tuberculosis bovina

Una vez que se inicia la infección por el bacilo tuberculoso en las vías aéreas y el parénquima pulmonar, éste puede ser fagocitado por los macrófagos alveolares (MA), neutrófilos y células dendríticas, para formar una estructura denominada granuloma temprano ⁽⁴⁴⁾. Estas células, usan sus receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) que son responsables de identificar la presencia de estructuras comunes entre microorganismos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) ⁽⁴⁵⁾. Los MA adicionalmente reclutan otros leucocitos efectores, e inician la inflamación produciendo moléculas efectoras inmunes como la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1, CCL2), y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α , CCL3) conocida por reclutar neutrófilos y otros leucocitos ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, esta bacteria es capaz de inhibir la actividad bactericida de los fagocitos bloqueando la fusión del fagolisosoma ^(47, 48). La supervivencia exitosa de *M. bovis*, dentro de los macrófagos bovinos también se atribuye a la diversa sucesión de mecanismos inmunomoduladores, incluyendo el bloqueo de la producción de óxido nítrico (NO) bactericida y la

apoptosis, conllevando a la fuerte generación de necrosis ⁽⁴⁹⁾. Se ha descubierto que *M. tuberculosis* logra esto al inducir la producción de IL-10 por la vía TLR2- ERK ⁽⁵⁰⁾, dicha citocina desregula la respuesta inflamatoria disminuyendo la producción de IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12 ⁽⁵¹⁾, afectando la capacidad de los macrófagos de restringir su crecimiento ⁽⁵²⁾. Las citocinas son críticas para la inmunidad contra agentes invasores, su efecto biológico es diverso y varía ampliamente entre anti-inflamatorio y pro-inflamatorio ⁽⁵⁰⁾. Durante la infección los macrófagos secretan IL-22 e IL-18, que activan a las células NK y linfocitos T CD4⁺ para producir IFN- γ , y este a su vez activa a los macrófagos e induce su polarización hacia macrófagos M1 ⁽⁵³⁾. Actualmente, se sabe que la vitamina D es esencial para el control de *M. bovis*. Los monocitos bovinos requieren de Calcitrol para producir NO, el cual juega un papel importante en la restricción del crecimiento bacteriano intracelular ⁽⁵⁴⁾. Las células NK, pueden reconocer varios componentes de la pared celular de la micobacteria a través de sus PRRs con la resultante producción de citocinas proinflamatorias así como de proteínas citotóxicas ⁽⁵⁵⁾. Estas células producen IL-17, modulando la función de las células dendríticas (CDs) ⁽⁵⁶⁾ y disminuyen considerablemente la replicación de *M. bovis* dentro de los macrófagos autólogos por mecanismos contacto dependientes ⁽⁵⁷⁾. adicionalmente han mostrado jugar un papel crucial en eliminar las micobacterias a través de la producción de IFN- γ . Los macrófagos infectados son directamente reconocidos y lisados por las células NK a través de sus receptores NKG2D y NKp46 que reconocen ULBP1 y Vimentina ⁽⁴⁴⁾.

El TNF- α incrementa la fagocitosis, la destrucción de las micobacterias por los macrófagos, la apoptosis, llevando a cabo el establecimiento de la respuesta



inmune adaptativa ⁽⁴⁹⁾. Esta citocina es secretada por macrófagos y células dendríticas (CDs) ⁽⁵²⁾. El TNF- α también se requiere para la inducción de la apoptosis en respuesta a una infección por micobacterias.

Se han identificado polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs), en los genes que codifican TNF- α , que participan en la susceptibilidad a la infección en ganado Holstein ⁽⁵⁸⁾. Dicha citocina puede unirse a dos receptores, tanto a TNFRp55 (TNFR1, CD120a) como a TNFRp75 (TNFR2, CD120b), iniciando diferentes señalizaciones celulares, tanto proinflamatorias como de apoptosis y necroptosis ⁽⁴⁶⁾.

Los interferones (IFN), son un grupo de proteínas regulatorias que funcionan activando células del sistema inmune en respuesta a una infección. Estas proteínas se clasifican en base a sus genes cromosomales y con base a su actividad biológica, con el IFN- γ dentro de la clase II, este interferón activa a los macrófagos para contrarrestar infecciones por bacterias intracelulares ⁽⁵⁹⁾.

Una vez iniciada la respuesta inmune adaptativa, de esta se diferencian dos ramas de dicha respuesta implicadas en contener el avance del patógeno, siendo la primera y la más estudiada la respuesta celular (mediada por linfocitos T), y la segunda de base humoral (mediada por Ac) ⁽⁵²⁾. Tanto, en humanos como en bovinos, la inmunidad predominante contra la TBb en fases tempranas de la infección es del tipo inmunidad mediada por células (IMC), que es remplazada eventualmente por una respuesta humoral con la progresión de la enfermedad ⁽⁶⁰⁾. La activación de las células T, depende del reconocimiento mediante el TCR de péptidos antigénicos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de macrófagos, así como de moléculas

coestimuladoras como CD28 ⁽⁶⁰⁾. Los linfocitos T, se diferencian en dos subpoblaciones Th (CD4⁺) y Tc (CD8⁺) ⁽⁵¹⁾. Los linfocitos Th CD4⁺ son la célula predominante responsable de la producción de IFN- γ y otras citocinas ⁽⁵¹⁾. Estos linfocitos, ayudan a amplificar la respuesta inmune activando células efectoras y reclutando células adicionales, mientras que los linfocitos CD8⁺ son directamente citotóxicas a las células infectadas, delimitan el granuloma e impiden la diseminación bacteriana (Figura 2) ⁽⁶¹⁾. Los componentes micobacterianos, especialmente los lipidoarabinomananos (LAM) son quimiotácticos para estas células ⁽⁶²⁾. Si la infección se vuelve crónica, las células T CD4 y CD8 se desarrollarán hacia linfocitos T de memoria, los cuales pueden ser agrupados como linfocitos T efectores de memoria (T_{EM}), linfocitos T de memoria central (T_{CM}) y linfocitos de memoria residentes en tejidos (T_{RM}) ⁽⁶³⁾.

Los linfocitos T_{CM} son potentes productores de IFN- γ e IL-2 pero con baja capacidad de replicación, una respuesta IFN- γ /TNF- α /IL-2 por parte de estas células es indicativo de una respuesta protectora contra la TBb ⁽⁶⁴⁾. Por otra parte, la infección por *M. bovis* induce a los linfocitos T de memoria CD45RO⁺ CCR7⁻ CD62L^{hi} ⁽⁶⁴⁾. Aunque se asocia un rol protector a estas células, en bovinos las células T polifuncionales que expresan IFN- γ , TNF- α e IL-2, y que mostraron un fenotipo efector (CD44^{hi} CD62L^{lo} CD45RO⁺) también fueron asociadas con patología en lugar de protección ⁽⁴⁵⁾.

Otros de los defensores celulares en la TBb, son los linfocitos T $\gamma\delta$, se caracterizan por la expresión de un receptor de célula T (TCR) heterodimérico, formado por las cadenas “ γ ” y “ δ ”, estas células son capaces de producir

citocinas y quimiocinas ⁽⁶⁵⁾. Las células $\gamma\delta$ bovinas representan del 10 % al 20 %, de los linfocitos circulantes en bovinos adultos, pero arriba del 55 % en becerros recién nacidos, dichas células poseen funciones de reconocimiento y presentación de antígeno, así como reguladoras ⁽⁵²⁾. Se ha demostrado que los linfocitos T $\gamma\delta$ bovinos, producen diversas citocinas (IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 e IFN- γ) pero no quimiocinas. Estas células también poseen un rol como células “asesinas”, al expresar granulolisina y perforina, principalmente en animales jóvenes, participando en la defensa contra las micobacterias ⁽⁶⁶⁾ y, pueden ser clasificadas de acuerdo a la expresión del receptor WC1, con WC1⁺ CD2⁻ CD4⁻ CD8⁻ como el principal subtipo en circulación ⁽⁵²⁾. Se ha propuesto que la eficacia de la vacunación temprana en becerros, con la vacuna BCG este influida por estas células ⁽⁶⁶⁾.

Se ha puesto poca atención en la respuesta de linfocitos B en la TBb, sin embargo, evidencia reciente sugiere que estas células no solamente producen anticuerpos sino modulan la inmunidad mediada por células T. En la TBh se ha descrito que las células B innatas producen IL-12, IFN- γ y TNF- α , apoyando la respuesta TH1 y contribuyendo a la presentación de antígeno a las células CD4⁺ y CD8⁺ ⁽⁶⁷⁾.

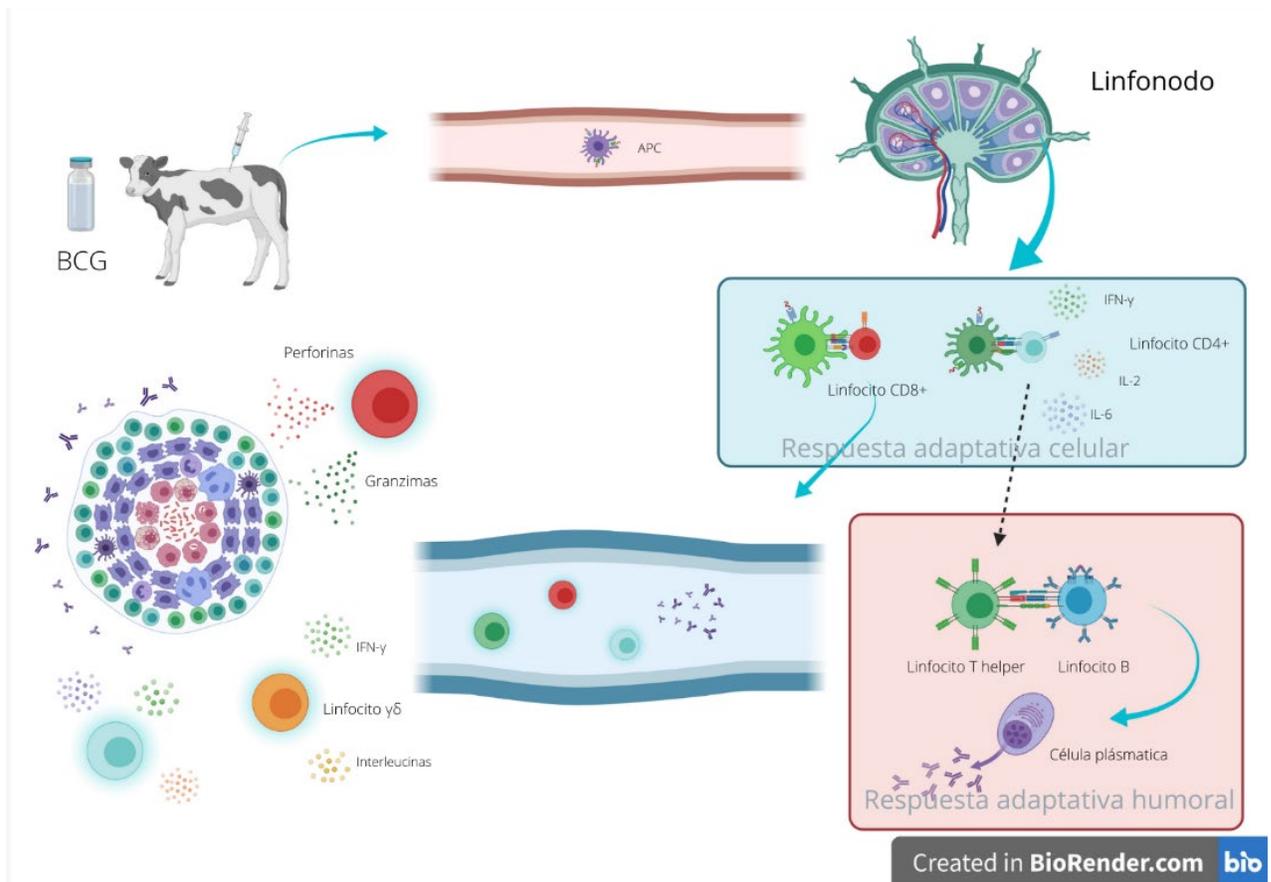


Figura 2. Respuesta inmune inducida por el BCG. Figura creada en [BioRender.com](https://www.biorender.com)

1.6 Pruebas de diagnóstico

1.6.1 ELISA Indirecto

Esta prueba se ha constituido en uno de los sistemas más empleados en el diagnóstico serológico, debido a su capacidad para detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de anticuerpos específicos al microorganismo en cuestión, en esta prueba el Ag se adhiere a los pocillos de las microplacas, a los que se agregan diluciones de los sueros problema; la reacción Ag-Ac se hace evidente agregando un segundo Ac, unido previamente a una enzima

(peroxidasa o fosfatasa), que reacciona con el suero a evaluar ⁽⁶⁸⁾. En el caso de la TBb, se ha intentado varias veces, aunque sin éxito desarrollar pruebas clínicamente útiles para su detección, esta prueba parece ser más un complemento diagnóstico, que una alternativa a las pruebas basadas en la inmunidad celular, posee la ventaja de su simplicidad, pero la sensibilidad es baja debido principalmente a que la respuesta inmune humoral es tardía e irregular, puede producirse una mejora utilizando una combinación de distintos antígenos, como la MPB70 y la MPB83 , resultando en una mayor especificidad ⁽⁶⁹⁾.

1.6.2 Prueba de liberación de interferón γ o Ensayo IGRA

El IFN- γ es una de las moléculas efectoras más crítica, para el control de la infección, debido a ello, su evaluación como uno de los principales mediadores de la respuesta inmune celular se considera para realizar el diagnóstico de la enfermedad, bajo condiciones *in vitro*. Una prueba IGRA es una prueba en la que la sangre completa del animal se cultiva y estimula asépticamente con los antígenos micobacterianos para determinar si ha estado o está infectado por *M. bovis*, lo cual se consigue cuantificando el IFN- γ liberado por los linfocitos T_H1 sensibilizados ante el estímulo antigénico y compara con los cultivos sin estimular, habitualmente se utilizan el PPD aviar y el PPD bovino ^(69,70) (figura 3). La detección del IFN- γ se lleva a cabo con un ELISA tipo sándwich, que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el IFN- γ bovino. Esta prueba tiene la capacidad de detectar infecciones tempranas, permitiendo encontrar un mayor número de animales infectados antes de que se conviertan en una

fuente de infección. El uso de antígenos micobacterianos como ESAT 6 y CFP-10 mejora la especificidad de la prueba, y éstos se han considerado como antígenos DIVA para diferenciar animales vacunados con BCG de los no vacunados; puesto que durante el proceso de atenuación de la cepa vacunal se perdieron regiones genómicas de la cepa original, entre ellas la región de diferencia (RD1), que codifica para los antígenos en cuestión, permitiendo así la diferenciación ⁽⁶⁹⁾.

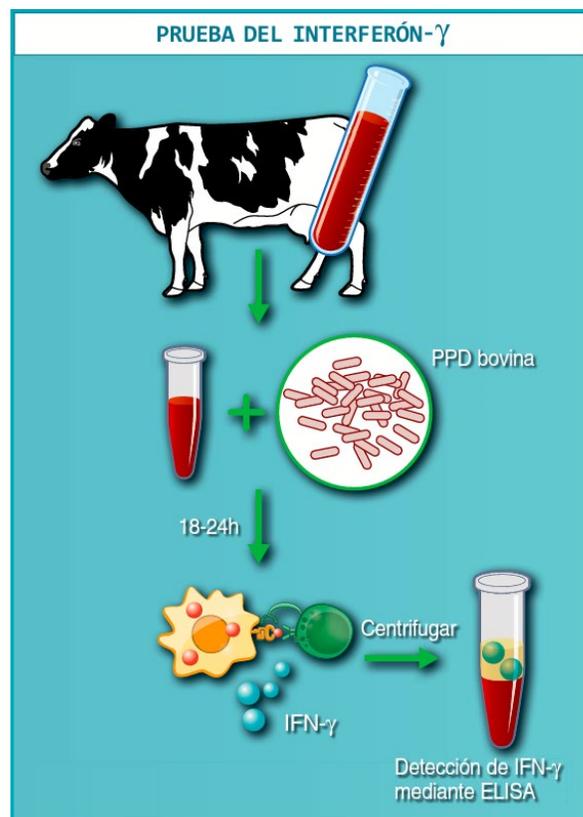


Figura 3. Representación esquemática de la prueba del interferón gamma (modificado de ⁷⁰).

1.6.3 Prueba de la tuberculina

Para el diagnóstico de la tuberculosis bovina y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina NOM 031-ZOO-1995 *Mycobacterium bovis* en México se reconocen tres pruebas: A) La prueba del pliegue caudal, B) Cervical comparativa y C) la prueba Cervical simple. Para estas pruebas se ha establecido el uso generalizado del derivado proteico purificado bovino (PPDb): elaborado con *M. bovis* cepa AN5 y el PPD aviar elaborado con *M. avium* cepa D4 para la prueba cervical comparativa, con el objetivo de descartar o confirmar animales reactivos a la prueba del pliegue caudal ⁽⁵⁾.

Para la prueba cervical comparativa (PTCC), se rasuran dos áreas cuadrangulares de 5 cm en el tercio medio del cuello, previo a la inoculación, se mide el grosor utilizando un cutímetro, registrándose en milímetros los valores obtenidos. El área superior será de 10 cm debajo de la cresta; el sitio inferior será aproximadamente 10 cm debajo de la anterior, se inyecta 0.1 ml de PPD aviar en el área rasurada superior y 0.1 ml de PPD bovino en la inferior. La lectura de esta prueba se realiza 72 horas (± 6 horas), midiendo con el cutímetro el grosor de la piel en el sitio de aplicación, estas se anotan en el formato oficial, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda; una vez terminado se grafica los valores obtenidos tanto de PPD aviar y PPD bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba.

Las reacciones se clasifican como:

- Negativa: cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.
- Reactor: cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación.

Los casos falsos positivos y las reacciones cruzadas, ocurren por el hecho de que el PPD de la tuberculina comparte muchos antígenos con otras micobacterias no tuberculosas como *M. avium*, *M. intracellulerae*, *M. scrofulaceum*, *M. paratuberculosis*, *M. kansasii* y *M. fortuitum* ⁽⁷¹⁾.

Recientemente, se ha propuesto el uso alternativo de un cocktail de proteínas recombinantes que contienen las proteínas ESAT-6, CFP-10 y RV3615c, que induce una respuesta en animales infectados con *M. bovis*, pero no en animales sensibilizados con otras micobacterias ambientales, además de no reaccionar en animales vacunados ^(72,73,74).

1.6.4 Fundamento de la hipersensibilidad dérmica tardía

En 1890, Robert Koch observó que en individuos infectados por *M. tuberculosis*, se presentó una respuesta inflamatoria localizada luego de la administración vía intradérmica de un derivado crudo de filtrado de cultivo de la micobacteria, a esta reacción cutánea localizada la denominó reacción de la tuberculina ⁽⁷⁵⁾.



Cuando ciertos antígenos, son inyectados en un animal previamente sensibilizado, éstos provocan una reacción inflamatoria que se desarrolla lentamente en el sitio de inoculación y que puede tardar de dos a tres días reacción conocida como hipersensibilidad dérmica tardía (HDT) o hipersensibilidad tipo IV. Se considera una forma especializada de inflamación contra microorganismos, que son resistentes a la eliminación por procesos inflamatorios convencionales ⁽⁷⁶⁾.

Con frecuencia la lesión de HDT, es el resultado de una interacción exagerada entre el Ag y los mecanismos inmunitarios normales mediados por células. Tras la sensibilización inicial (Figura 4), las células T de memoria reconocen al Ag presentado por una célula APC y son estimuladas, liberan varias citocinas, de atracción y activación de macrófagos si es una respuesta T_H1 , o de eosinófilos si es una respuesta T_H2 ⁽⁷⁷⁾. Posterior a un periodo de una a dos semanas durante el cual, las células T específicas se activarán y expandirán clonalmente. Las principales células que participan en la fase de sensibilización son $CD4^+$, pertenecientes a los subtipos T_H1 , aunque también las células T_H2 , T_H17 y $CD8^+$ están implicadas ⁽⁷⁵⁾.

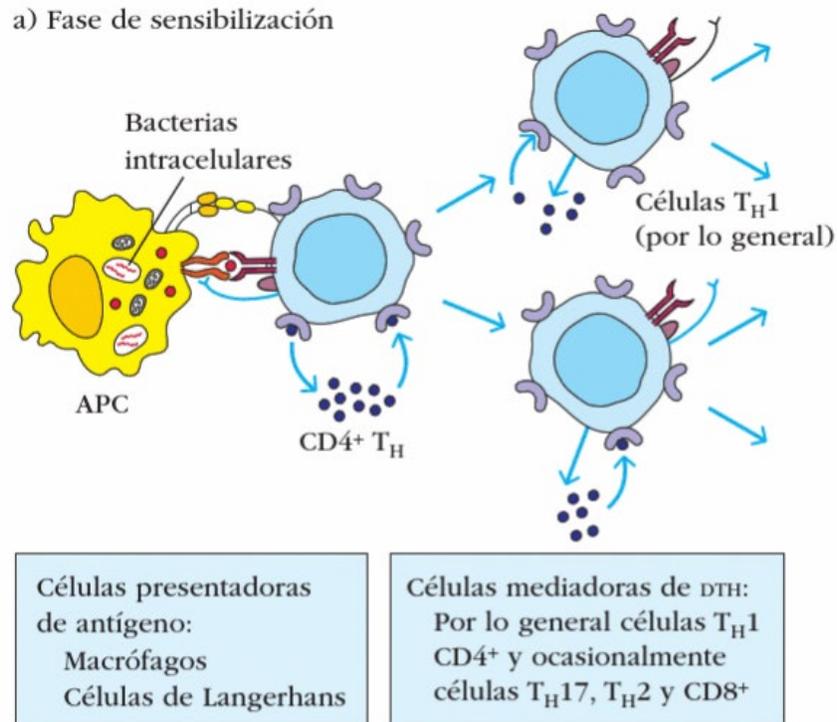


Figura 4. Fase de sensibilización de la HDT (modificado de ⁷⁵).

Una segunda exposición al antígeno sensibilizante (Figura 5), se activan las células T específicas para que secreten diversas citocinas entre ellas IFN- γ y TNF- β , que reclutan macrófagos y otras células inflamatorias, y las activan. Esta respuesta no es visible sino hasta un promedio de 24 horas post contacto y alcanza un máximo entre 48 a 72 horas. Si bien las células T_H1 son las iniciadoras principales de la HDT, las células efectoras principales son los macrófagos activados. Estos a su vez producen TNF- α e IL-1 β que reclutan más monocitos y neutrófilos amplificando la respuesta ⁽⁷⁵⁾.

Alrededor de las 4 horas del contacto con el antígeno en un individuo sensibilizado, se acumulan neutrófilos alrededor de las vénulas postcapilares en el lugar, a las 12 horas se infiltran linfocitos T y monocitos, las células endoteliales que recubren estas vénulas aumentan de tamaño, muestran un

aumento de organelos biosintéticos y se hacen permeables a las macromoléculas plasmáticas, liberando fibrinógeno hacia el tejido circundante convirtiéndose en fibrina. Este depósito de fibrina, el edema y la acumulación de linfocitos T y monocitos provocan la induración del tejido característica de la HDT ⁽⁴⁷⁾.

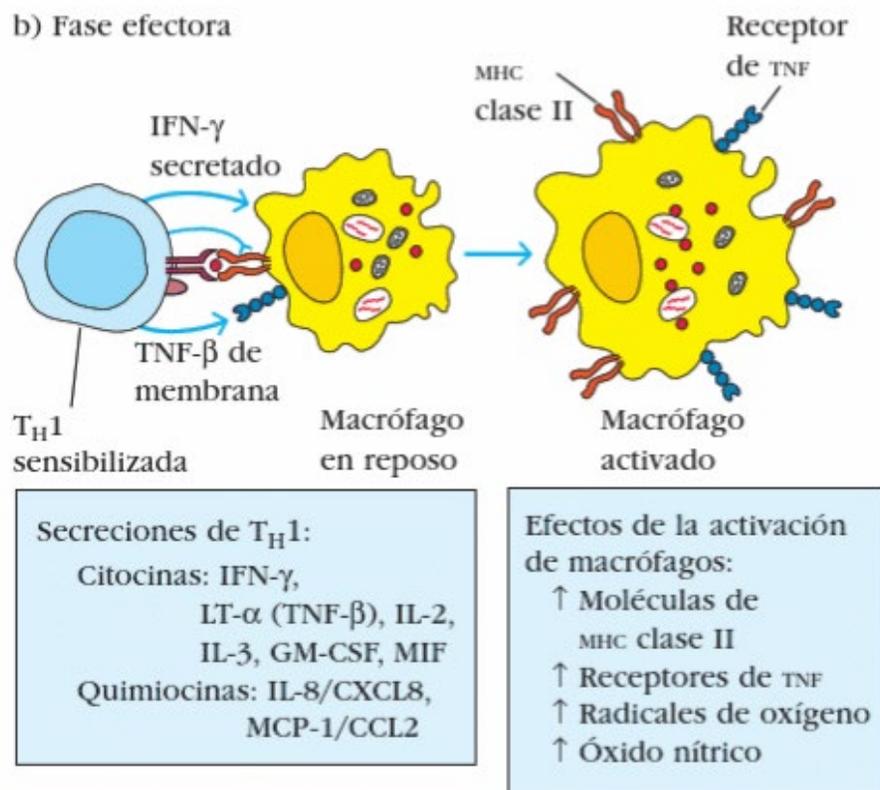


Figura 5. Fase efectora de la HDT (modificado de ⁷⁵).

1.7 Vacunas para la prevención de la tuberculosis bovina

Una vacuna ideal debe ser eficaz, estable y segura, de excreción y sobrevivencia limitada, debe carecer de interferencia con las pruebas diagnósticas, fácil de administrar, así como de buen costo-beneficio ⁽⁷⁸⁾.

Entre las vacunas que se están evaluando actualmente para la prevención de la TBb. se encuentran las vacunas vivas, vacunas inactivadas, vacunas de atenuación génica, vacunas vectoriales, vacunas diferenciales entre animales infectados y vacunados (DIVA), vacunas de subunidades, vacunas ADN, nanovacunas y vacunas recombinantes ⁽⁷⁹⁾.

1.7.1 Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas con calor o formalina se han probado en varios modelos animales para contrarrestar la TB. En relación a ello, se tienen informes de la evaluación de una vacuna de *M. bovis* inactivada con calor (HIMB) que fue evaluada en animales silvestres como: jabalíes, ciervo rojo, tejón y caprinos, arrojo resultados prometedores ⁽¹⁰⁾.

Mientras que, Van der Heijden et al., en 2017, evaluaron y compararon la respuesta inmune de becerros inmunizados unos con una vacuna de *M. bovis* inactivada con formalina y otros con una vacuna inactivada con calor, desafiando ambos grupos con BCG viva, los resultados indicaron que la vacuna inactivada con calor indujo una fuerte respuesta inmune celular y humoral ^(80,81).

1.7.2 Vacunas ADN recombinante

El conocimiento actual de la inmunidad a los microorganismos del Complejo *M. tuberculosis* indica que el uso de vacunas de ADN recombinante que



codifican antígenos inmunogénicos específicos podría conducir a estrategias de vacunación eficientes. Además, la caracterización de los antígenos micobacterianos protectores se ha visto facilitada en gran medida por el análisis de las respuestas inmunitarias inducidas después de la vacunación con ADN recombinante (ADNr). Así, las nuevas estrategias en la generación de vacunas, como las del tipo de ADNr son herramientas actuales que se han venido evaluado para la posible prevención de la tuberculosis bovina. Este tipo de vacunas parten del principio de aplicar el inserto del ADN de interés de la micobacteria en vectores como los plásmidos, posteriormente este ADNr es inoculado en la masa muscular, donde las células sintetizarán las proteínas micobacterianas que inducirán la respuesta inmune. Diversos estudios se han realizado para evaluar su eficacia y grado de protección conferida, al respecto se ha informado de una variante de ADNr, que codifica para los antígenos 85B, MPT64 y MPT83, mejoraron la respuesta inmune, y disminuyeron la carga bacteriana ⁽⁸²⁾. Por lo anterior, Barba, et al. (2013), evaluaron la efectividad de vacunas de ADNr utilizando otro tipo de antígenos de *M. bovis*; para ello clonaron los genes que codifican para las proteínas PE11 y PPE68, en el vector de expresión eucariótico pVAX1, y construyeron la vacuna de ADN, basada en un vector de expresión eucariota, la vacuna no indujo un nivel significativo de IFN- γ , pero si una respuesta importante de anticuerpos ⁽⁸³⁾.

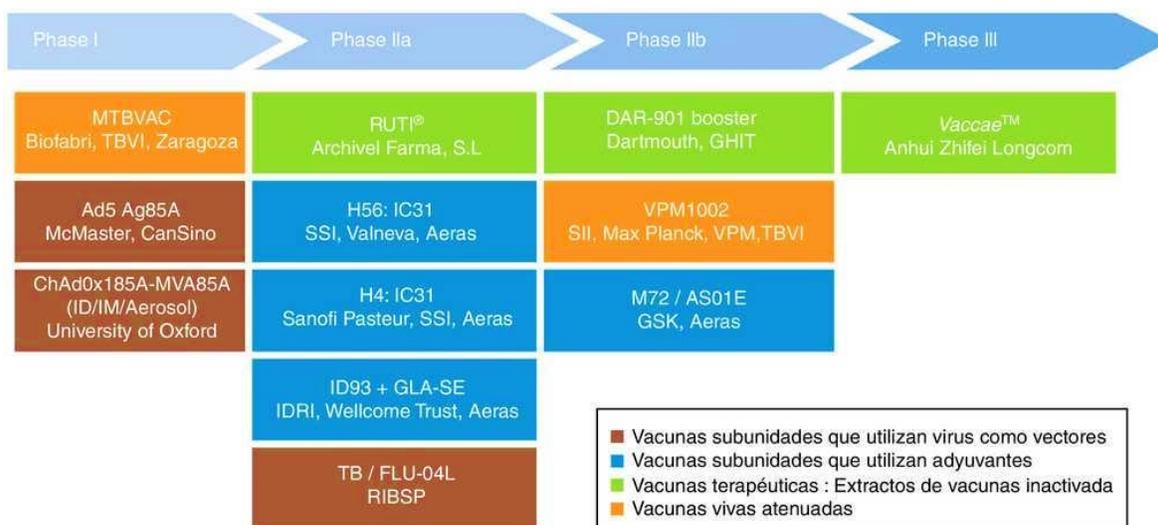
1.7.3 Vacunas de atenuación génica

Recientemente, se han propuesto nuevos candidatos a vacunas entre ellas las vacunas de atenuación génica, como la vacuna mutante *mce* de *M. tuberculosis*, estas disminuyen en virulencia e incrementan la inmunogenicidad, estas vacunas vivas inducen una baja pero progresiva producción de interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) favoreciendo su habilidad de protección contra la tuberculosis ⁽⁸⁴⁾.

1.7.4 Vacunas recombinantes

Una vacuna recombinante, se obtiene de un proceso de ingeniería genética en el cual se introduce un gen de un microorganismo infeccioso en una bacteria transformada por un plásmido introducido por electroporación ⁽⁸⁵⁾. La vacuna VPM1002 es una vacuna BGC recombinante (rBCG) para la TBh, esta vacuna expresa listeriolisina de *Listeria monocytogenes*, lo que le permite dañar la membrana fagolisosomal e inducir una fuerte respuesta de linfocitos T, pero a la vez esta desprovista de ureasa C, enzima responsable de la producción de amonio, que participa en la neutralización del fagosoma. El desarrollo de esta vacuna comenzó en 1990 y actualmente cursa el ensayo clínico fase III (Figura 6) ⁽⁶³⁾.

VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS EN ENSAYOS CLINICOS



Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018;36:648-56

Figura 6. Vacunas contra la tuberculosis en ensayos clínicos. En café, se muestran las vacunas de subunidades que utilizan virus como vectores. En azul, las vacunas de subunidades que utilizan adyuvantes para su administración. En verde, vacunas terapéuticas compuestas de extractos de vacunas inactivada. En naranja, las vacunas vivas atenuadas. Modificado de ⁽⁸⁶⁾.

1.7.5 Historia de la vacuna BCG

En 1921, los trabajos de investigación realizados en el Instituto Pasteur por el microbiólogo León Charles Albert Calmette y el médico veterinario Camile Guérin, dieron como resultado la primera vacuna atenuada del siglo XX, denominada vacuna BCG de *M. bovis*, nombrándola así por las iniciales de los apellidos de los científicos anteriormente mencionados, quienes mediante 230 cultivos secuenciales en un medio enriquecido con papa, bilis y glicerol, proceso que duró 13 años, atenuaron una cepa de *M. bovis* originalmente aislada de una mastitis bovina. Inicialmente la vacuna se administró oralmente



a niños nacidos de madres que presentaban tuberculosis activa, por lo que sus hijos tenían un alto riesgo de desarrollar la enfermedad, la aplicación por vía oral se hizo con la finalidad de emular la transmisión tuberculosa a través de la leche con un resultado de protección aparente del 90 % ⁽⁸⁷⁾.

En 1924 la cepa BCG se envió a otros países para su uso en la prevención de la enfermedad; sin embargo, y debido a que su mantenimiento, conservación y propagación seguía realizándose por subcultivos dio como resultado la diversificación fenotípica y genotípica de la cepa. La cual tiene variaciones tanto en su morfología como en la protección que confieren contra la tuberculosis en diferentes modelos animales y en humanos ⁽⁸⁸⁾.

Así, se ha constatado que la BCG comercial no es un producto único, existen diferentes formulaciones en términos de cepa, de composición (la concentración de bacterias vivas en los viales de la vacuna puede oscilar entre 50 000 y tres millones por dosis) y/o dosificación. Actualmente, en los programas de inmunización a nivel mundial vienen utilizando seis cepas de BCG: BCG Pasteur 1173 P2, BCG Danish1331, BCG Glaxo 107, BCG Tokyo 172-1, BCG Rusia-I y BCG Brasil ⁽⁸⁹⁾. Debido a la diversidad de cepas de BCG su eficacia protectora contra la enfermedad ha sido controversial. Por otra parte, también ha aumentado la necesidad de demostrar su potencia, pureza, efectividad, inocuidad y estabilidad por medio de pruebas analíticas de control y aseguramiento de la calidad. La estimación de la eficacia de la vacuna BCG contra la tuberculosis pulmonar muestra un rango de 0 a 80% para varias vacunas BCG en diversas condiciones. Por otra parte, las pruebas prospectivas y los estudios de caso/control en niños recién nacidos y menores de un año muestran una reducción significativa en el riesgo de meningitis tuberculosa y

diseminada (miliar) con el uso de la vacuna BCG, el cual provee de una protección de 70-80%. Los diferentes grados de efectividad del BCG en distintos grupos de edad se han tomado como evidencia de que la vacuna protege mejor contra la diseminación de la bacteria en la enfermedad primaria progresiva, que contra el desarrollo de focos localizados en la reinfección o en la reactivación de la enfermedad ⁽⁹⁰⁾.

Con respecto al uso y evaluación del BCG en el control de la tuberculosis bovina, se tienen registros desde 1911 que corresponden a los estudios iniciales llevados a cabo por los mismos Calmette y Guérin, mucho antes de que la vacuna se probará en los humanos, quienes de acuerdo a sus informes obtuvieron resultados satisfactorios ante el desafío experimental con una cepa patógena de *M. bovis*. A partir de entonces se realizaron varios ensayos en diferentes países a principios y mediados del siglo XX para definir mejor su eficacia; mientras que, otros estudios estaban encaminados a demostrar la seguridad de las diferentes variantes ancestrales de la BCG, así como evaluar el grado de protección inducida ante el desafío natural y experimental *con M. bovis*. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios que se han efectuado han mostrado discordancias entre ellos, lo cual se relaciona entre otras causas con los diversos diseños experimentales empleados, tipo de cepa, dosis empleada, vías de administración de la BCG, exposición previa a micobacterias ambientales, falta de protección a largo plazo, alta carga bacteriana en el desafío natural, y exposición previa a *M. bovis* vía calostro antes de la vacunación, y finalmente la ruta de desafío utilizada con las cepas de *M. bovis* virulentas, todo ello complica las comparaciones entre los diversos estudios, ^(10, 72, 74).



Por otro lado, aunque algunos estudios indican que la BCG puede no inducir una inmunidad completamente protectora, si muestran que tanto las lesiones como la carga bacilar se reduce considerablemente [\(10\)](#). Algunas conclusiones de estos primeros estudios siguen siendo aplicables hoy en día, entre ellas: una sola dosis de BCG proporciona inmunidad no estéril, posterior al desafío experimental con *M. bovis* virulento.

Actualmente, los estudios de investigación se centran principalmente en mejorar la eficacia de la vacuna y, al mismo tiempo, garantizar su fácil administración, seguridad y estabilidad en el medio ambiente. Siguen existiendo grandes desafíos, particularmente en términos de candidatos a vacunas y también en la aceptación de la vacunación. La vacunación debe incluirse en un plan estratégico para el control integrado de la tuberculosis bajo una perspectiva de “una sola salud”, que también incluye otras medidas como la mejora de la bioseguridad en las granjas para evitar o disminuir el contacto entre animales domésticos y silvestres, así como la investigación de campo en fauna silvestre para determinar su papel en la infección

1.7.5.1 Cepas de BCG

Como se comentó anteriormente, luego de la autorización y distribución de la vacuna BCG en seres humanos a nivel mundial, y antes del establecimiento del sistema lote-semilla, la vacuna fue preservada por mucho tiempo por subcultivo, produciendo la derivación y diversificación de subcepas hijas de la vacuna original BCG. Estas cepas hijas se ha mostrado, han perdido regiones



genéticas que han afectado sus características morfológicas, bioquímicas e inmunológicas y con ello su eficacia protectora^(91,92). Por otro lado, estudios comparativos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG realizados a nivel genético, identificaron marcadores de región de diferencia (RD) y duplicación en tándem (DU) en las cepas analizadas. Las regiones de diferencia son regiones de ADN que están deletadas en los genomas de la BCG de *M. bovis* y de *M. bovis* comparados con el de *M. tuberculosis*. Por matrices de hibridación diferencial se identificaron 14 regiones de diferencia (RD1-14), con un tamaño de 2 a 12,7 kpb; las cuales, se demostró estaban ausentes del bacilo Calmette-Guérin cepa Pasteur en relación con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv⁽⁹³⁾. En relación con estas regiones de diferencia, se ha mostrado en particular que los genes codificados por el segmento RD1 regulan otros loci asociados a la virulencia de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*; con ello, se determinó que la región RD1 está involucrada en la atenuación de la BCG, y que su delección en *M. tuberculosis* H37Rv conducía también a la atenuación de la cepa, hecho que se confirmó al reintroducir la región mencionada en la BCG, resultando en la represión de al menos 10 proteínas, y en la inducción de tres proteínas adicionales. Esto condujo a la generación de un patrón de expresión proteica en BCG, muy similar al exhibido por cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*.

La razón más obvia para la atenuación de BCG fue la pérdida del sistema de secreción de proteínas ESX-1 debido a la delección de RD1, que es uno de los cinco sistemas de secreción tipo VII que se encuentran en el genoma de *M. tuberculosis*. El locus RD1 de *M. tuberculosis* comprende nueve genes (Rv3871-Rv3879c). Los genes Rv3874 y Rv3875 codifican dos proteínas



pequeñas de secreción que son inmunodominantes: la proteína de filtrado de cultivo 10 (CFP-10) y la proteína antigénica temprana de 6 kDa (ESAT-6), respectivamente. La exportación de estas dos proteínas está mediada por un aparato secretor codificado por genes adyacentes en el locus RD1, incluyendo al menos una proteína transmembrana (Rv3877) y dos ATPasas de la familia AAA (Rv3870 y Rv3871). Varios estudios indican que la secreción de ESAT-6 y CFP-10 es necesaria para la virulencia mediada por RD1 ^(94,95).

Es así que los análisis comparativos del genoma de las cepas hijas de la BCG han descubierto una amplia diversidad genotípica, que incluyen deleciones, polimorfismos de un solo nucleótido y duplicaciones de regiones genómicas ^(91,96). Para comprender la evolución, atenuación y eficacia protectora variable de las diversas vacunas de BCG, se realizó un análisis comparativo del genoma y transcriptoma de la cepa de *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2, determinando que el genoma de 4 374 522 pb contiene 3954 genes que codifican proteínas, 58 de los cuales están presentes en dos copias como resultado de dos duplicaciones en tándem independientes, DU1 y DU2 ⁽⁹⁷⁾.

DU1 está restringido a la BCG Pasteur, aunque existen cuatro formas de DU2; DU2-I se limita a las primeras vacunas de BCG (BCG Rusia, BCG-Japón y BCG-Moreau), DU2-II (BCG-Suecia y BCG-Birkhaug), III (BCG-Danesa, BCG-Praga, BCG-Glaxo y BCG-China) y IV (BCG-Phipps, BCG-Tice, BCG-Frappier y BCG-Pasteur) (Figura 7) ^(97,98,99,100). La cepa Phipps y la cepa Pasteur comparten una considerable homología, sin embargo, pueden ser diferenciadas por la duplicación de DU1 en la cepa Pasteur ⁽¹⁰¹⁾. Y en lo que respecta a la BCG-Phipps las principales regiones de diferenciación (RD) pérdidas son RD1, RD2 y nRD18 ⁽¹⁰²⁾.



Como se comentó anteriormente, RD1 es un segmento de ADN que comprende 9,5 kb, que fue eliminado en todas las demás cepas de BCG, y que codifica proteínas altamente inmunogénicas reconocidas por los linfocitos T, como son: ESAT-6, CFP-10, Rv3873 y la proteína PPE, entre otros ⁽¹⁰³⁾. RD2 es un segmento de ADN de 10,7 kb que codifica muchas proteínas, incluyendo Mpt64 y CFP-21 ⁽¹⁰⁴⁾ y nRD18 es un segmento de 1,5 kb que contiene genes que codifican SigI, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa que sólo se perdió en las cepas BCG Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught y Tice ⁽¹⁰⁵⁾.

Actualmente es desconocido cual cepa BCG ofrece la mejor protección contra la TBh y la TBb, sin embargo, es necesario más estudios para resolver estas cuestiones. En relación a ello, en un estudio realizado por Zhang et al. (2016) al evaluar la virulencia y la eficacia de 13 cepas de BCG en SCID y BALB/c mostraron que las cepas de BCG del grupo IV DU2, al que pertenece la BCG-Phipps, mostraron niveles de virulencia mayor entre las cepas estudiadas, los investigadores señalan que estos distintos niveles de virulencia podrían explicarse por las duplicaciones y deleciones del ADN genómico específicas de cada cepa. Parece haber una tendencia general a que las cepas de BCG más virulentas sean también más eficaces en la protección contra el desafío ⁽⁹⁸⁾.



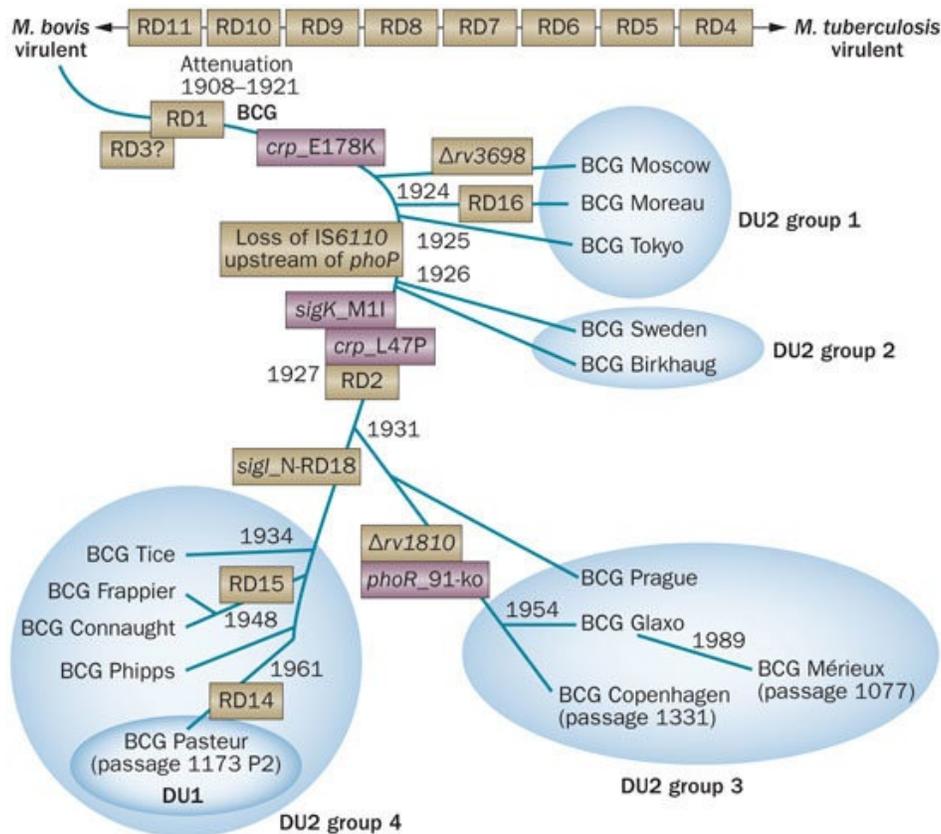


Figura 7. Genealogía de las subcepas de BCG. Las fechas que aparecen en las ramificaciones indican el año estimado de la difusión geográfica de la cepa, tras la atenuación original en el laboratorio de Calmette entre 1901 y 1922. Los recuadros de la línea temporal indican las deleciones, inserciones o mutaciones genéticas progresivas asociadas a las distintas cepas, las subcepas se han agrupado sobre la base de duplicaciones genéticas específicas, que también corresponden a grupos de subcepas "tempranas" y "tardías". También se muestran las deleciones genéticas naturales que distinguen a *M. bovis* tipo salvaje de *M. tuberculosis*. Abreviatura: DU, duplicación. Modificado de ⁽⁹⁷⁾.

Es así que en un estudio realizado en México por Castillo y cols en el 2006, con el propósito de evaluar el grado de protección ofrecido por diferentes subcepas de la vacuna BCG en modelo ratón, mostró que al desafío empleando una cepa patógena de *M. tuberculosis*, los ratones inmunizados con las subcepas Birkhaug, Tice, Danesa y Moreau, presentaron zonas amplias de neumonía y una fuerte respuesta a la prueba de tuberculina

intradérmica (ID); mientras que, las subcepas Suecia, México y Frappier aunque mostraron reducción de las áreas de neumonía, una menor cantidad de UFC recuperadas de tejidos y una moderada respuesta a la prueba ID, su eficacia fue menor a la que se registró con la subcepa Phipps ⁽¹⁰⁶⁾. La eficacia protectora de las cepas de BCG parece correlacionar con su agrupación genética basada en duplicaciones en tándem, ya que las cepas del grupo IV (BCG-Phipps, BCG-Frappier, BCG-Pasteur y BCG-Tice) y el grupo III (BCG-China, BCG-Danasa, BCG-Prague y BCG-Glaxo) ofrecen una protección significativamente mejor que las cepas del grupo II (BCG-Suecia y BCG-Birkhaug) en ratones vacunados. El grupo de BCG más protector, el grupo IV de DU2, también tenía el mayor nivel de virulencia en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), al respecto se determinó existe correlación entre la virulencia y la eficacia ⁽¹⁰⁷⁾. Por otro lado, la asociación entre el contenido y la capacidad de inducir respuesta inmune no son sinónimos ya que las cepas Phipps y Tice pertenecientes al mismo grupo, son diferentes en la capacidad de inducir inmunidad en modelo animal lo que podría sugerir que la regulación de la expresión de los componentes bacterianos en el hospedero participa de forma importante en la capacidad de inferir protección ⁽¹⁰⁸⁾.

1.8 Definición de bioseguridad

Se define a la bioseguridad como el conjunto de medidas y normas preventivas puestas en práctica para reducir o eliminar los factores de riesgo asociados a



las enfermedades transmisibles en los sistemas de producción bovina, dentro de las cuales se contemplan medidas de bioexclusión o bioseguridad externa y de biocontención o bioseguridad interna, con la finalidad de ⁽¹⁰⁹⁾:

- Evitar o reducir el riesgo de entrada (y salida) de enfermedades y sus vectores.
- Evitar o disminuir la difusión de enfermedades en la granja.
- Incrementar la resistencia de los animales a las enfermedades.

Aunque no existe un protocolo de bioseguridad universal, existen métodos específicos que pueden aplicarse en cada establo lechero para enfermedades determinadas. Entre las variables que deben considerarse al elegir el protocolo a usar son, entre otras la raza, número de animales en el hato y distribución por grupos productivos. Sus beneficios son el incremento en la producción de leche, reducción gastos por menor uso de antibióticos, el incremento en el valor agregado a los animales, con un hato libre de enfermedades y mejor mercado para la leche.

1.8.1 Bioseguridad en la tuberculosis bovina

Previo a la implementación de cualquier medida para el control de la enfermedad, se debe realizar un estudio para evaluar su prevalencia e incidencia, así como determinar los factores de riesgo existentes, con el



propósito de establecer medidas concretas de bioseguridad en el hato en cuestión, definiendo entonces los objetivos y metas a corto, mediano y largo plazo, en el cual se proyecta controlar y erradicar la enfermedad. Un plan integral de Bioseguridad debe considerar ^(19, 110):

- La capacitación de todo el personal.
- El diseño de la infraestructura.
- La selección de los sistemas de diagnóstico de la TBb.
- La detección y eliminación de animales infectados.
- La prevención de la diseminación de la enfermedad.

Como se sabe, la tuberculosis bovina continúa siendo una de las enfermedades más importantes del ganado vacuno, la cual ha estado presente desde los tiempos más remotos de su domesticación, y guarda estrecha relación con el desarrollo intensivo de la zootecnia industrial. Entre los factores de riesgo para el ganado, se encuentra el hacinamiento de los animales, la raza, la edad y el contacto con fauna silvestre. Aunque, el bovino es la especie más susceptible a la infección por *M. bovis*, la micobacteria no presenta especificidad de hospedadores, razón por la que la fauna silvestre constituye un importante reservorio ⁽¹¹¹⁾.

Para prevenir el contacto con fauna silvestre, la granja deberá incluir entre sus medidas, actividades de mantenimiento, como la revisión periódica de los cercos, el retiro de nidos de aves y la reparación de hoyos en los edificios ⁽¹¹²⁾.



El movimiento animal desde hatos infectados o de áreas en donde la enfermedad es endémica es, uno de los determinantes críticos en la epidemiología de la enfermedad; la entrada a través de la compra, constituye uno de los principales factores de riesgo ⁽¹¹³⁾.

El personal debe ser capacitados regularmente en buenas prácticas de manejo para prevenir la entrada de enfermedades, mediante información técnica relevante que les ayude a entender el porqué de estas medidas ^(19, 112).

Todo el equipo utilizado en la unidad de producción pecuaria (UPP) puede contaminarse con secreciones infecciosas, por lo que debe ser limpiado y desinfectado periódicamente, sobre todo si será usado en corrales de animales sanos. Se recomienda tener un equipamiento separado para los animales enfermos.

Los vehículos son considerados fómites principalmente para patógenos que pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el ambiente. Los vehículos externos que colectan la leche, becerros y cadáveres o que entregan alimentos, productos farmacéuticos y semen pueden estar involucrados en la transmisión de este agente infeccioso, por su rutinaria trayectoria de granja en granja. Se aconseja no permitir su acceso cercano a los alojamientos de los animales, si llegase a ser necesario, asegurar su correcta limpieza y desinfección.

El diseño de las instalaciones puede ayudar a prevenir la dispersión de patógenos, las UPP lechera deben evitar el acceso a fauna nociva y/o silvestre mediante el correcto cercado del perímetro.



Los hatos lecheros suelen tener una tasa de reposición elevada, por lo que la reposición propia puede no ser suficiente, por lo que se recomienda disponer de alguna instalación de aislamiento o cuarentena ⁽¹¹⁴⁾. Entre dicha instalación y los alojamientos de los animales se aconseja una distancia mínima de 300 metros ⁽¹¹⁵⁾. Para enfermedades de largo periodo de incubación como lo es la TBb, se sugiere que los animales cuarentenados se les practique una prueba diagnóstica (tuberculina) para descartar la enfermedad ⁽¹¹²⁾.

Las micobacterias patógenas pueden sobrevivir por periodos prolongados de tiempo fuera del hospedador, y puede ser transportado entre granjas en la ropa, vehículos y otros vectores ⁽¹¹⁶⁾. La resistencia de las micobacterias a los desinfectantes químicos se atribuye al alto contenido de lípidos en su pared celular, que la hace altamente hidrofóbica. Como consecuencia los agentes hidrofílicos son incapaces de penetrar la pared celular. la solución de glutaraldehído al 2 % por 5 minutos a 18°C inactiva a *M. tuberculosis*. Los desinfectantes que contienen ácido acético, ácido peracético y peróxido de hidrógeno son efectivos contra *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* ⁽¹¹⁷⁾. El estiércol utilizado como fertilizante puede contaminar el suelo, las pasturas, el agua usada para el riego y los mantos friáticos ⁽¹¹²⁾. Se ha demostrado que *M. bovis* suspendido en estiércol, fue inactivado por acetona al 22 % en menos de 24 horas, por hidróxido de amonio al 1 % a las 36 horas, y por alcohol etílico al 17.5 % a las 48 horas ⁽¹¹⁸⁾.

Los desinfectantes eficaces incluyen soluciones de fenol al 5% así como soluciones de elevadas concentraciones de yodo, glutaraldehído y formaldehido (4%) ⁽¹¹⁹⁾.



La fauna nociva se denomina como las especies animales, silvestres o domesticas que pueden ser reservorios o bien transmisores de agentes causales de enfermedades ⁽¹²⁰⁾, para evitar la contaminación de los alimentos de los animales, la bodega debe ser diseñada para evitar su acceso.

En algunas zonas del país, a los bovinos se les suministra agua de jagüeyes, lagos, presas, estanques y ríos, dicha agua puede verse fácilmente contaminada con secreciones del mismo ganado, así como de fauna silvestre, por lo que se aconseja la potabilización de dicha agua, así como el muestreo periódico de esta misma ⁽¹¹²⁾.

Se ha comprobado que las micobacterias del complejo MTBC sobreviven mejor en ambientes húmedos como en el barro y el sedimento de represas ^(119,121), pueden llegar a sobrevivir entre 60 y 180 días en materia fecal ⁽¹²²⁾ para potabilizar el agua es posible usar cloro (0.5 a 1.5 ppm), así como el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno ⁽¹¹⁹⁾.

Por otra parte, para reducir el riesgo de contaminación ambiental con el patógeno, los animales muertos deben ser eliminados en el menor tiempo posible, esto puede hacerse mediante un recolector autorizado, entierro o composteo ⁽¹¹²⁾.

Si bien la transmisión por la vía respiratoria es la vía principal, la transmisión de una madre a su cría postnatalmente, es posible a través de la ingestión de calostro o leche contaminada conllevando un factor de riesgo más importante de lo pensado en los países en vías de desarrollo ⁽¹¹³⁾.

Una vaca con infección subclínica puede excretar 10^3 UFC/ml de *M. bovis* en la leche ^(122,123) y se ha determinado que el 3 - 10 % de los hatos con bovinos



reactores excretan *M. bovis* en leche ^(122,124,125). La crianza artificial con sustitutos lácteos o leche en polvo es una opción disponible. Por otra parte, es recomendable que los centros de parición (recría) reciban la menor densidad animal sobre hectárea posible ⁽¹²⁶⁾ Los recipientes para agua y alimento de la recría deberán mantenerse siempre limpios y secos ⁽¹¹²⁾.

Un correcto calostrado de la recría conlleva su correcta administración, estimada entre 150 a 200 gr de IgG, poco después del parto, es importante proveer de un calostro de buena calidad lo cual se logra mediante la medición con calostrómetro y refractómetro de Brix ⁽¹²⁷⁾.

Como alternativas para el almacenamiento del calostro existen la congelación, la acidificación aeróbica, el uso de aditivos orgánicos y la fermentación aeróbica. A pesar de que la pasteurización a altas temperaturas puede dañar las inmunoglobulinas, el calostro puede ser tratado de manera segura a una temperatura de 60° C durante 60 minutos ⁽¹²⁷⁾.

La incidencia de tuberculosis bovina se ha reducido principalmente en zonas de baja prevalencia mediante el establecimiento de programas de control basado en la estrategia de “prueba y sacrificio”, o “prueba y segregación”. Bajo ese control, se recomienda que los hatos afectados se sometan a pruebas periódicas para eliminar a los que pudieran propagar el organismo; sin embargo, dependiendo de la prevalencia primeramente se sigue el programa de prueba y segregación durante la primera fase de la erradicación, y se pasa a métodos de prueba y sacrificio en la fase final. De acuerdo a los factores de riesgo la probabilidad de infección es mayor en las explotaciones ganaderas donde no existe un buen programa de bioseguridad para controlar no solo la

tuberculosis, sino también otras enfermedades de origen infectocontagioso, favorecido por el sistema intensivo de producción ^(5,119). Este problema se agrava cuando existe supervisión veterinaria insuficiente y un mal manejo de los hatos, observando frecuentemente animales sanos alojados con animales adultos enfermos, situación favorecida por el hacinamiento. Así pues, previo a cualquier medida, se deberá realizar un estudio donde se evalué la situación y prevalencia de la enfermedad para aplicar las medidas pertinentes de control en los establos lecheros definiendo los objetivos y metas a corto, mediano y largo plazo. Las normas de bioseguridad son proactivas y contribuyen a mejorar la cantidad y calidad de la producción. Estas normas deben ser estrictamente seguidas por todos, pero a la vez deben ser flexibles en su naturaleza, prácticas, de fácil aplicación y versátiles, abiertas a nuevas tecnologías o procedimientos que surjan para poder mejorarla continuamente ⁽¹²⁸⁾.



2. Hipótesis

- La vacunación con BGC Phipps en becerras jóvenes, aunado a medidas básicas de bioseguridad reducirá la prevalencia de TBb, sin interferir con la prueba de la tuberculina cervical comparativa.

3. Objetivo General

- Evaluar la eficacia de la vacuna BCG subcepa Phipps, en becerras de un hato de alta prevalencia de tuberculosis, conjuntamente con el establecimiento de medidas de bioseguridad.

4. Objetivos Particulares

- Determinar la prevalencia inicial de tuberculosis bovina en vacas adultas, vaquillas y becerras mediante la prueba de tuberculina cervical comparativa (PTCC) en el hato de estudio.
- Aplicar la vacuna BCG-Phipps a toda la población de la Unidad Productiva.
- Establecer las medidas de bioseguridad en el hato de estudio.
- Determinar la prevalencia de la enfermedad anualmente en el establo en producción, y a los 9 y 18 meses post-vacunación en los establos de



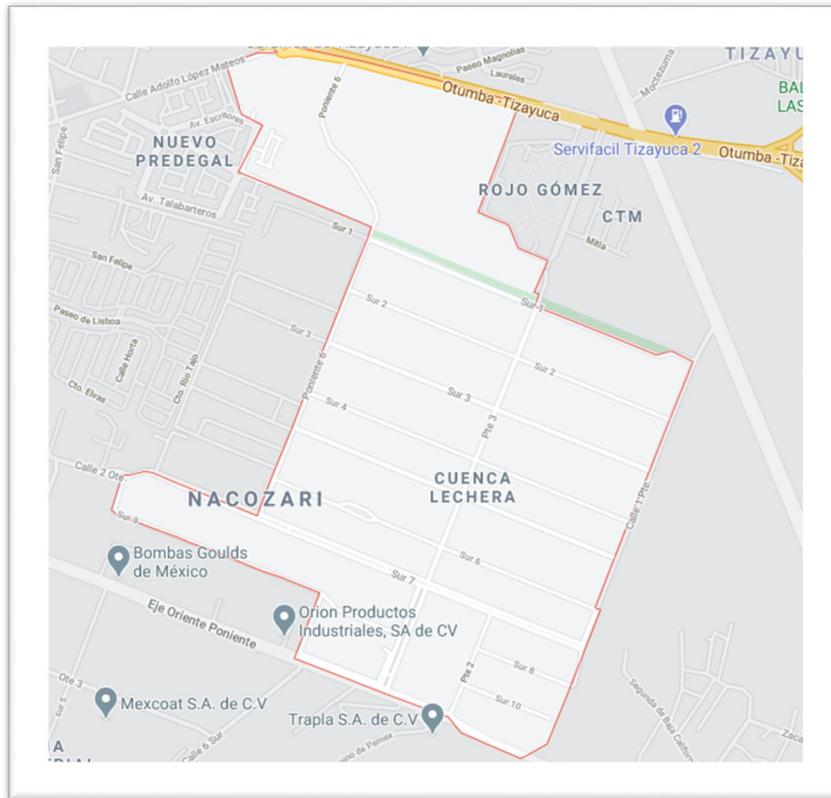
recrea y en becerras por medio de la prueba de tuberculina cervical comparativa (PTCC).

- Dar seguimiento de la respuesta inmune celular y humoral en un grupo representativo vacunado y control
- Determinar si la vacuna por sí mismo es inductora de la hipersensibilidad tardía.

5. Material y Métodos

5.1 Localización del estudio

Los ensayos del presente trabajo se realizaron en el laboratorio de inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias (CENID) en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con sede en Cuajimalpa de Morelos de la Cd. De México. En tanto que, el trabajo de campo se realizó en el Complejo Agro-Industrial Tizayuca S.A. (CAITSA) ubicado en el kilómetro 57 de la carretera federal México-Pachuca. Poniente 2, entre sur 7 y sur 8 Cd. Industrial, Tizayuca Hidalgo, con coordenadas geográficas 19° 50' latitud norte y 98° 59' de longitud oeste, a una altura de 2260 metros sobre el nivel del mar, con un clima BS1k, según la clasificación de Köppen, que corresponde predominante a un clima semi-seco templado con lluvias de junio a septiembre (Figura 8).



Datos del mapa ©2021 Google, INEGI

Figura 8. Cuenca lechera de Tizayuca, estado de Hidalgo.

5.2 Animales de estudio y diseño experimental

La evaluación de la eficacia vacunal se realizó en tres establos designados A, B y C del CAITSA. El primero (A) conformado inicialmente por 475 vacas Holstein en producción de leche, entre un rango de edad de uno a cinco años; mientras que, los establos B y C con un total de 423 becerros, incluían la población de recría, como de terneras, considerando en este rango a hembras desde pocos días de nacidas hasta 6 meses, y a la recría de 6 meses a 20 meses.

Previo a la aplicación de la vacuna, y luego del consentimiento del propietario, se aplicó la prueba de la tuberculina cervical comparativa (PTCC) a los animales

de los diferentes establos, con la finalidad de determinar tanto la prevalencia inicial de los establos como para poder segregar a los reactores. El criterio de clasificación de vacas infectadas y no infectadas se estableció primordialmente con base a su reactividad a la prueba de tuberculina cervical comparativa y ELISA, y en algunos animales bajo el criterio de positividad establecidos para el ensayo de liberación de IFN- γ (BOVIGAM®) para confirmar su status de animal tuberculoso.

Las actividades del estudio iniciaron con la aplicación de la PTCC en la población de vacas en producción, práctica que se realizó en el mes de octubre de 2017. Mientras que, en los establos de recría tal actividad se llevó a cabo en enero de 2018 (Figura 9). Las tareas de vacunación con la BCG-Phipps en los diferentes establos se iniciaron en el mes de septiembre del 2018, luego de tener los datos de reactividad y ELISA, y de haber cultivado y estandarizado la BCG. Ulteriormente, la vacuna se aplicó en todos los nacimientos ocurridos durante dos años continuos después de haberse establecido el programa de vacunación, a intervalos entre 3 a 6 meses entre uno y otro.

Una vez determinada la prevalencia del hato y de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995 se clasifico al establo como una zona de producción controlada con una prevalencia mayor a 2 % y como un hato de alta prevalencia de TBb.





Figura 9. Establos B y C, zona de recría donde se aplicaron determinadas medidas de bioseguridad, dar calostro estéril y segregación de animales reactivos. Lugar donde se inicia el programa de vacunación.

En el establo (A), de vacas en producción, se consideró el hato de estudio para evaluar la estrategia de control de la enfermedad mediante vacunación con BCG y establecimiento de medidas de bioseguridad con la finalidad de lograr reducir los índices de prevalencia e incidencia de la TBb a mediano plazo; por lo demás, el programa incluía la repoblación del hato con becerras vacunadas desde su nacimiento provenientes de los establos de recría (establos B y C) (figura 10).

Diseño experimental para el análisis de la eficacia vacunal de la BCG-Phipps

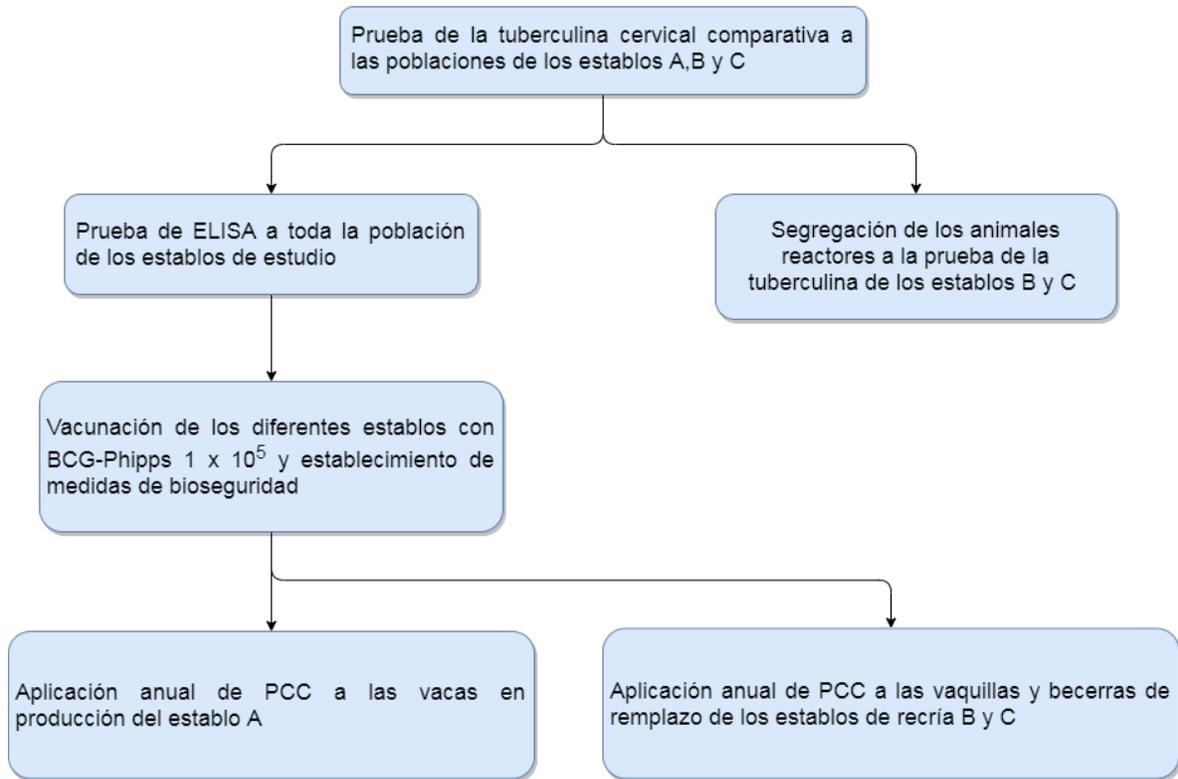


Figura 10. Diseño experimental para el análisis de la eficacia vacunal de la BCG-Phipps

5.2 Prueba de la tuberculina cervical comparativa

De acuerdo con la NOM-031-ZOO-1995, la prevalencia de TBb fue evaluada mediante la prueba intradérmica de la tuberculina cervical comparativa (PTCC), en la que se emplean los derivados proteicos purificados de *M. bovis* cepa AN5 (PPDb) y el de *M. avium* cepa D4 (PPDa). Antes de inocular las tuberculinas correspondientes, se rasuran dos sitios en el tercio medio del cuello a una distancia aproximada de 12 cm uno de otro, se mide el grosor de

la piel de cada sitio con un vernier y se anotan las lecturas, posteriormente en el espacio superior se inyecta el PPDa y en el inferior el PPDb (Figura 11).

La lectura se realizó 72 horas después de la inoculación, midiendo el grosor de las reacciones. Finalmente se anotaron las lecturas en el formato oficial de la prueba cervical comparativa, se sustrajo el valor de la primera lectura al de la segunda, se graficaron los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección arrojó el resultado de la prueba, De acuerdo a la gráfica oficial se interpretaron los resultados (Figura 12).



Figura 11. Prueba de la tuberculina cervical comparativa (PTCC).

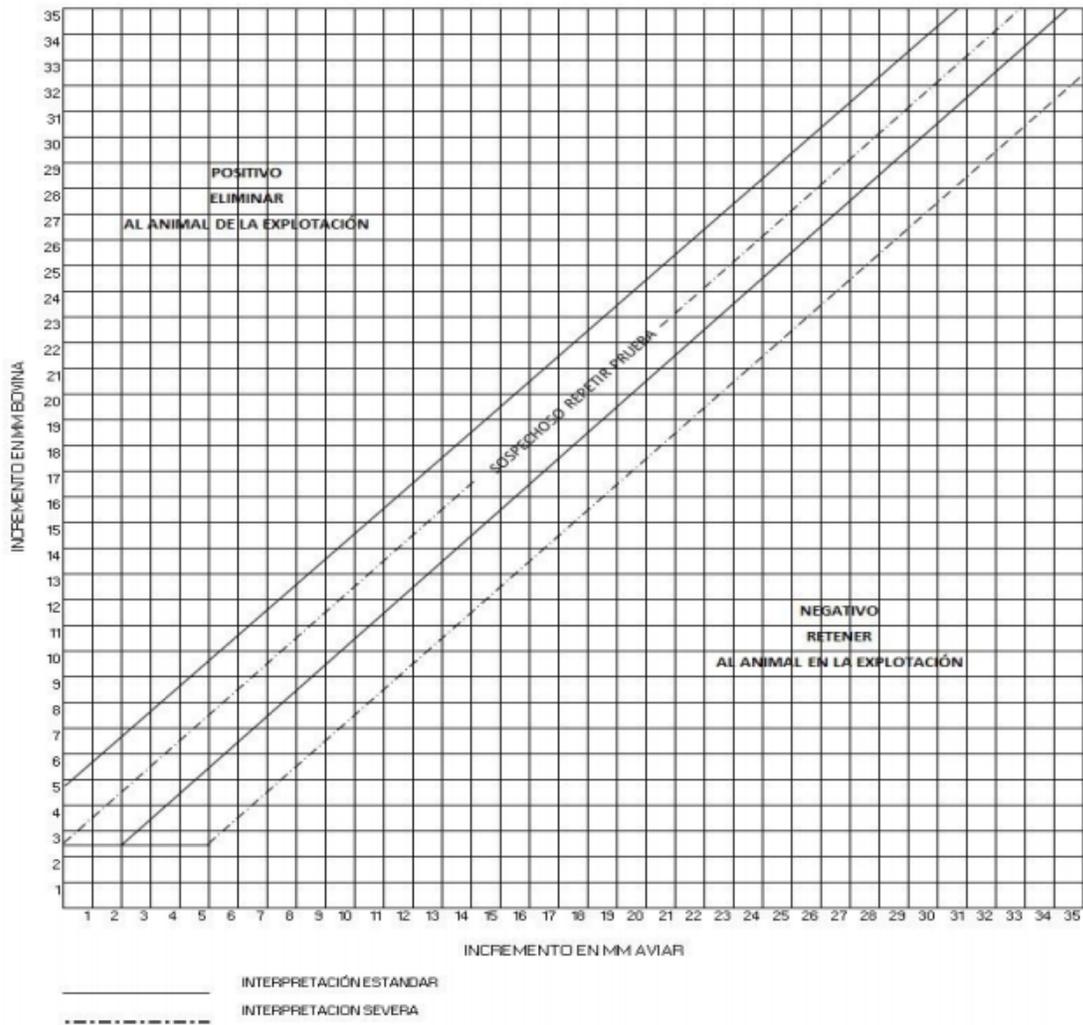


Figura 12. Gráfica para la interpretación de la prueba cervical comparativa.

5.3 Obtención de los reactivos biológicos.

5.3.1 Obtención de la vacuna BCG subcepa Phipps

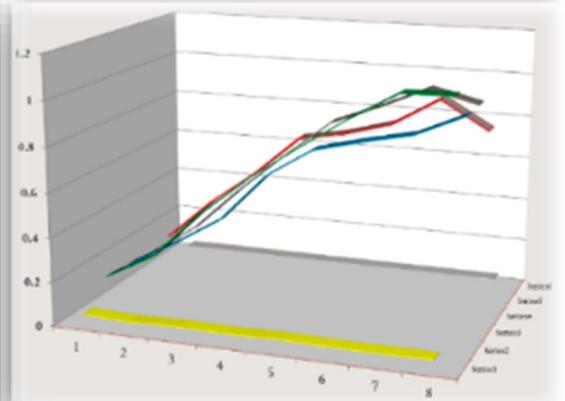
A partir de un lote semilla (lote madre) de la vacuna BCG cepa Phipps almacenada a -70°C , de acuerdo los criterios Internacionales recomendados por la OMS ⁽¹²⁹⁾, se descongeló un vial del lote para su cultivo en medio solido



Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC (ácido oleico albumina glucosa y catalasa), e incubó a 37°C hasta su crecimiento por tres a cuatro semanas para comprobar su pureza. Posteriormente, se tomó una asada de una colonia que se transfirió a medio liquido Middlebrook 7H9 para la propagación de la semilla e incubó nuevamente a 37 °C, en agitación a 200 rpm. A partir del nuevo lote semilla, se sembraron nuevamente las bacterias en medio solido Middlebrook 7H10 con OADC, a 37° C para comprobar la pureza del cultivo, y continuar con su propagación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, finalmente se ajustó a la concentración requerida para la aplicación en los animales (Figura 13).



A



B

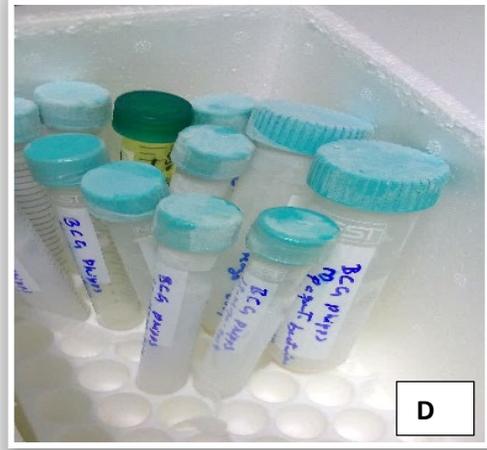
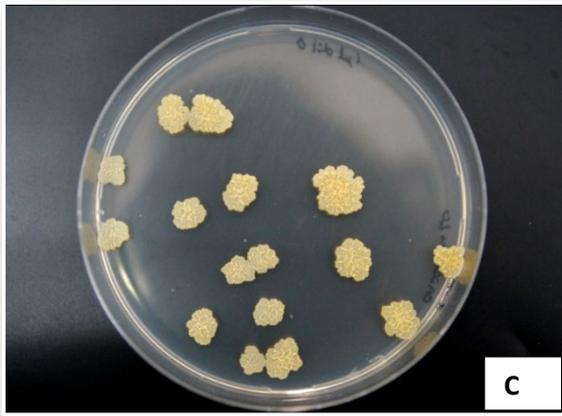


Figura 13. Obtención de la vacuna BCG-Phipps. (A) Luego del desarrollo de las colonias, se tomó nuevamente otra asada para inocular matraces con medio líquido Middlebrook 7H9, incubando a 37° C con agitación, hasta su fase logarítmica media, (B) según datos de la curva de crecimiento obtenida previamente. (C) Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) y (D) ajustaron a las dosis que se emplearían para vacunar 10^5 UFC.

5.3.2 Obtención de los extractos proteicos del Filtrado de Cultivo de *M. bovis* AN5 y *M. avium* D4

Las cepas AN5 de *M. bovis* y D4 de *M. avium* se cultivaron independientemente en medio sintético de Stonebrink, durante 3 a 4 semanas a 37°C para adaptar su desarrollo en medio líquido sobre la superficie; posteriormente se realizó un segundo pase en el mismo medio, y de ahí se tomó una asada para inocular en medio líquido de Dorset-Henley, por seis a ocho semanas hasta la formación de una gruesa masa bacteriana sobre la superficie. Al término, la masa se separó por filtración a través de una malla de alambre. El líquido residual se pasó a través de papel filtro Whatman y por último se emplearon filtros de nitrocelulosa con tamaño de poro de 1.2, 0.8, 0.45 y 0.22 μm para la obtención

de un filtrado libre de bacterias. Posteriormente, las proteínas presentes en el filtrado se precipitaron con sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ a una saturación final del 80%, con agitación constante a 4°C por 24 horas, el precipitado resultante se centrifugó a 15 000 g por 1 hora, posteriormente se re-suspendió en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 y dializo exhaustivamente contra H_2O y PBS. El material así obtenido se denominó, extracto proteico de filtrado de cultivo (CFPE), la concentración de proteína del CFPE se determinó por el método de Bradford.

5.4 Medidas de bioseguridad consideradas tanto en establo en producción como en la zona de recría

Para los animales que fueron identificados como reactores por la prueba cervical comparativa (PTCC) y ELISA, se le indicó a el responsable de los establos (B y C), que efectuase el aislamiento (segregación), y en la medida posible la remoción de vacas positivas, para proteger a la población joven no infectada de la exposición a animales viejos y/o reactores. En animales en producción del establo A, se indicó ordeñar primero vacas negativas y después las positivas con posterior lavado de los comederos de la sala de ordeña. Para la recría se aconsejó no calostar, ni dar leche de vacas rectoras o de vacas viejas negativas a terneros, salvo que estuviera pasteurizada, además de que se les recomendó el uso de sustituto lácteo, o en su caso la implementación de sistemas de pasteurización a nivel de UPP. Por último, se les encomendó realizar un diagnóstico frecuente, por medio de la PTCC y ELISA, cada 12 meses, en el establo de producción y en becerras cada 6 meses. Lo cual sería un



indicador de la efectividad de las medidas de bioseguridad junto con la aplicación de la vacuna BCG.

5.5 Vacunación de becerras con BCG M. bovis Phipps 1 x 10⁵ UFC

Una vez calculadas las prevalencias de cada establo, se aplicó la vacuna BCG 1 x 10⁵ UFC a todas las vacas del establo A, así como a las novillas, becerras y terneras del área de recría de los establos B y C, actividad que se realizó en enero del 2018. A partir de esa fecha todo animal menor a cuatro meses de edad fue vacunado durante los dos años que duró el estudio, tiempo al cual se determinó la eficacia vacunal de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$EV = \left(\frac{TANV - TAV}{TANV} \right) \times 100$$

EV= Eficacia vacunal TANV= Tasa de ataque en no vacunados.

TAV= Tasa de ataque en vacunados

La tasa de ataque fue considerada como la frecuencia de animales reactivos determinada por la prueba cervical comparativa de tuberculina, tanto en animales vacunados como en los animales no vacunados.



5.6 Seguimiento de la respuesta inmune humoral y celular en grupo experimental (becerras). (2° parte experimental evaluación de la respuesta inmune)

Se seleccionaron 20 becerras, las cuales fueron confirmadas negativas a la enfermedad previo a la vacunación, por medio de la PTCC, IGRA (BOVIGAM®) y ELISA. La selección se hizo de un grupo de 101 becerras de entre 1 – 4 meses de edad, provenientes de los establos B y C. Del cual el 95 % resultaron negativas a la PTCC. Del grupo de 20 becerras, 10 se inmunizaron subcutáneamente con 1×10^5 UFC de la vacuna BCG-Phipps en 1 ml de buffer de fosfatos estéril (PBS) en la tabla del cuello; mientras que, las otras 10 fungieron como grupo control y fueron inoculadas con 1 ml de buffer de fosfatos estéril (PBS).

A las becerras de ambos grupos se les tomaron muestras sanguíneas periódicamente por espacio de año y medio para evaluar la respuesta inmune inducida a los 15, 30, 60, 120, 180, 360 y 480 días post-vacunación, para lo cual se empleó un ELISA comparativo con el propósito de determinar niveles de anticuerpos IgG específicos a los antígenos micobacterianos, y los ensayos IGRA para cuantificar el interferón γ liberado en cultivos de sangre completa de los animales ante el estímulo antigénico para evaluar la respuesta inmune celular, las cuales se describen a continuación.

La prueba de la tuberculina se aplicó a los 6, 12 y 18 meses para determinar el efecto de la vacuna en la reactividad de los animales de seguimiento.



5.7 Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para determinar anticuerpos hacia *M. bovis*, y *M. avium*.

Se obtuvo suero sanguíneo de todos los bovinos en estudio. Como antígeno para las pruebas de ELISA se utilizó el extracto proteico del filtrado de cultivo de *M. bovis* y *M. avium*. Las concentraciones y diluciones óptimas de antígeno, suero, conjugado y sustrato se estimaron previamente. Se adsorbieron placas de 96 pozos con 1.0 µg de antígeno diluido en 100 µl de solución de carbonatos pH 9.6 toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar, se bloquearon los sitios reactivos de la placa con una solución de leche descremada al 3 % en PBS-0.1 % Tween 20 durante 2 h a 37° C. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron a 37° C durante 1 h con 100 µl de los sueros diluidos 1:100 por triplicado. Después de lavar, se añadieron 100 µl de proteína G marcada con peroxidasa diluida 1:10 000 para revelar los anticuerpos IgG. La peroxidasa se reveló con 100 µl de una solución de ortofenilendiamina en solución amortiguadora de citratos pH 4.5 y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con 50 µl/pozo de ácido sulfúrico 2 M y las densidades ópticas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. Para fines diagnósticos el punto de corte empleado fue de 0.35 DO₄₉₂, el cual fue determinado previamente ⁽¹³⁰⁾.



5.8 Estimulación in vitro de cultivos de sangre completa

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada por punción de la vena yugular de las diferentes becerras en estudio. Las muestras se trasladaron al laboratorio a temperatura ambiente (24-30°C) identificadas correctamente. Después de limpiar los tubos conteniendo la sangre con alcohol y distribuidos en una gradilla, se introduce ésta en la campana de flujo laminar previamente desinfectada. Las sangres se distribuyen en condiciones asépticas en placas de 24 pozos (Nunclon, Roskilde, Denmark) a razón de 1.5 ml por pozo, considerando tres pozos por animal. Uno de los se estimuló con 100µl del PPD bovino (20µg/ml), otro con 100µl del PPD aviar (20µg/ml) y dejó el tercer pozo sin estimular como testigo. Las placas de cultivo se incubaron por 24 horas, en una atmósfera de 95% aire, 5% CO₂ con humedad saturada a 37°C, cumplido el tiempo de incubación se colectaron los plasmas de los diferentes pozos en tubos eppendorf previamente identificados, los cuales se congelaron a -70°C hasta la realización de la prueba de ELISA sándwich para detectar los niveles de IFN- γ .

5.9 Ensayo de liberación de Interferón gamma

La evaluación del IFN- γ en los plasmas colectados se realizó de acuerdo a las indicaciones señaladas en el instructivo del kit comercial utilizado (BOVIGAM[®], Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland). Al término del procedimiento, las absorbancias de las muestras de plasma se leyeron



mediante un lector de ELISA (Benchmark-Plus Microplate Spectrophotometer Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) a una densidad óptica de 450 nm ($DO_{450\text{ nm}}$). Una muestra se consideró positiva cuando el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ en presencia de PPD bovino menos el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ en presencia de PPD aviar > 0.1 y cuando el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ en presencia de PPD bovino menos el valor de $DO_{450\text{ nm}}$ sin estímulo > 0.1 ⁽¹³¹⁾. Este criterio fue utilizado para el diagnóstico de la enfermedad; en tanto que para el seguimiento de la respuesta inmune los resultados se expresaron como Índices de estimulación antigénica (I.E.) con respecto al control, que se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$I.E. = \frac{\text{Concentración de IFN } \gamma \text{ en plasma en presencia del estímulo antigénico}}{\text{Concentración de IFN } \gamma \text{ en plasma en ausencia del estímulo antigénico}}$$

5.10 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la prueba t-Student utilizando el software Statistical Analysis System (SigmaStat Ver. 4) para determinar diferencias significativas entre los resultados obtenidos de niveles de producción de IFN- γ y niveles de anticuerpos IgG en los grupos evaluados a un nivel de significancia ($p \leq 0.05$). Mientras que, para determinar diferencias en función del tiempo intra-grupos se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una significancia considerada de ($p \leq 0.05$).

6. Resultados

6.1 Vacunación de becerras con BCG 1×10^5 UFC

Antes de iniciar con la vacunación, en el mes de enero de 2018 se realizó la PTCC y el ELISA a las becerras de los establos de recría (B y C), siendo la recría de estos establos la destinada para repoblar el establo en producción (A). La prevalencia inicial determinada en estas becerras fue del 17.7% (75/423), (figura 14).

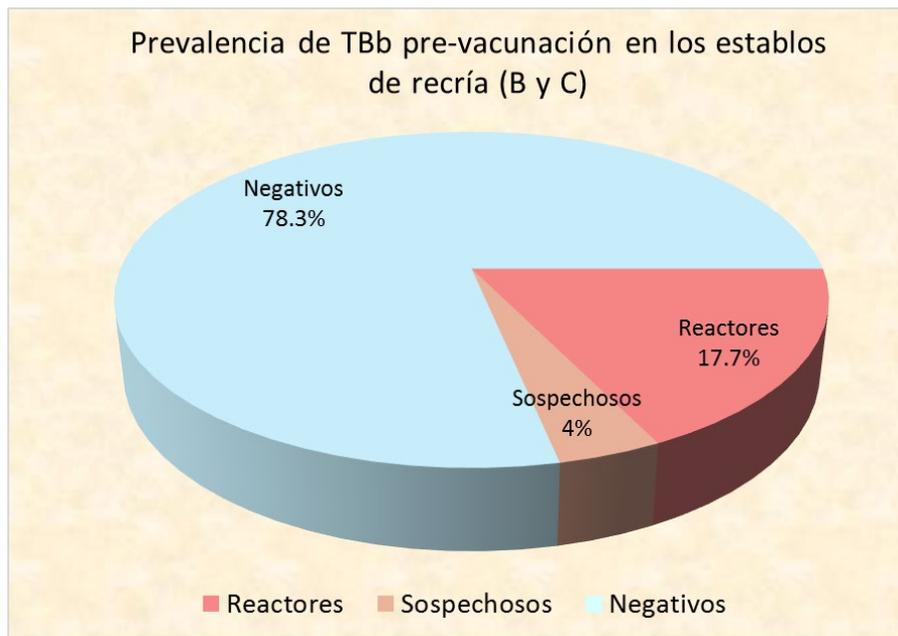


Figura 14. Prevalencia de TBb por prueba cervical comparativa en los establos de recría.

En el ELISA comparativo, el 11.11 % (47/423) de las becerras fueron positivas a *M. bovis* (figura 15); mientras que el 1.9 % (8/423) resultaron positivas a *M. avium* (figura 16) antes de la vacunación.

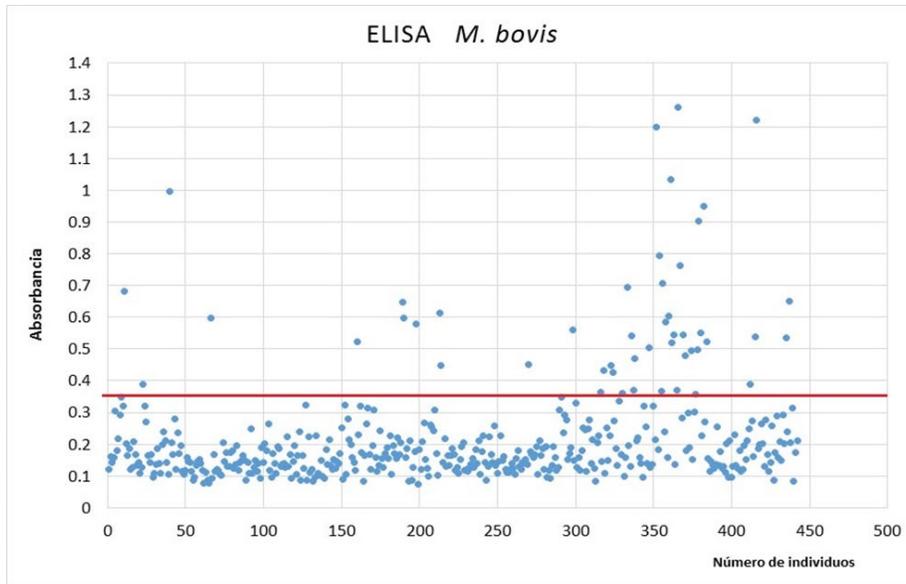


Figura 15. Determinación de niveles individuales de anticuerpos en las becerras de los establos de recría por ELISA, empleando el CFPE de *M. bovis*, previo a la vacunación. La línea indica el punto de corte de 0.35 DO_{492}

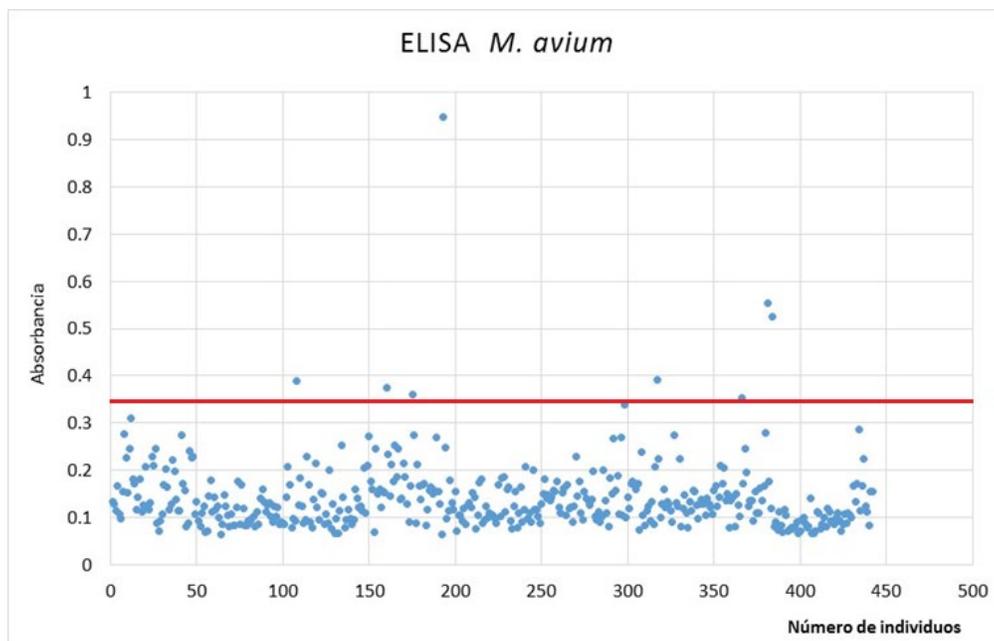


Figura 16. Determinación de niveles individuales de anticuerpos en las becerras de los establos de recría por ELISA, empleando el CFPE de *M. avium*, previo a la vacunación. La línea indica el punto de corte de 0.35 DO_{492}



En el mes de septiembre de 2018, se aplicó la vacuna BCG a las terneras recién nacidas empleando una dosis de 1×10^5 UFC, y posteriormente cada 3 a 6 meses durante dos años se inmunizaba a todos los animales nacidos después de la fecha anteriormente señalada. Estableciendo a la par las medidas de bioseguridad mencionadas previamente.

En la figura 17 se muestran los resultados de reactividad registrados en estos grupos a los nueve meses y a los dos años post-vacunación. A los nueve meses el porcentaje de reactores disminuyó de 17.7% registrado inicialmente a 5.6% (20/355); en tanto que, a los dos años la reactividad registrada fue de 10.3% (35/339), mostrando un aumento con respecto a la que se registró a los nueve meses post-vacunación, siendo no obstante menor a la que se obtuvo al inicio del estudio. Si bien, existe diferencia en el número de animales probados con el transcurso del tiempo entre una evaluación y la otra, a razón de la dinámica poblacional del hato de cría debida al movimiento de éstos al hato productivo, o a su eliminación por ser tuberculoso, o por otras enfermedades, el 80% de la población vacunada inicialmente permanecía en los establos.

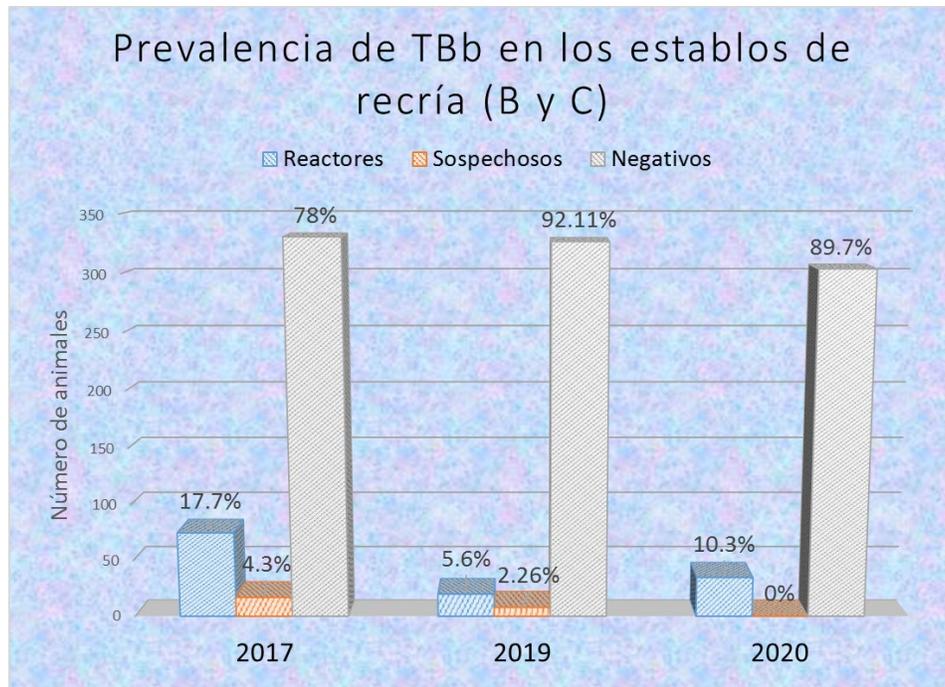


Figura 17. Establos de recría, becerras rectoras y negativas al PPD bovino después de la vacunación durante un periodo de 2 años.

La prevalencia inicial determinada en el establo de producción (A) en un total de 475 vacas en producción y secas por La PTCC fue del 47.1% (224/475), con 13.47% (64/475) de animales sospechosos, (figura 18).

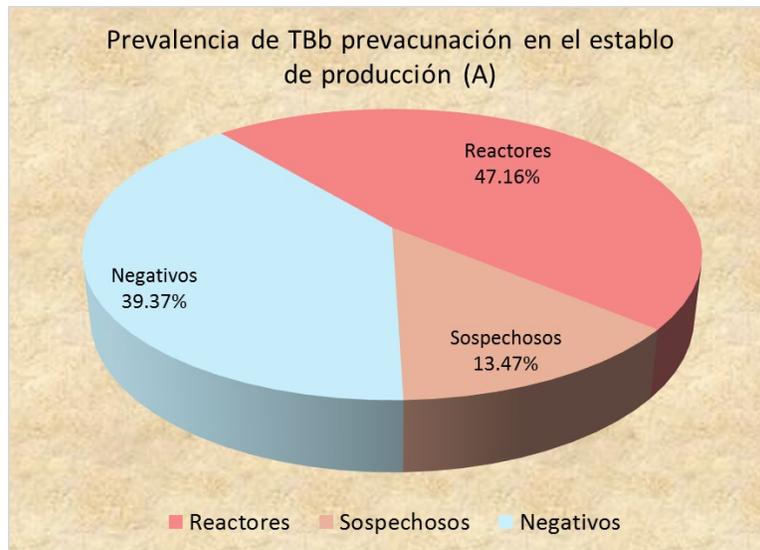


Figura 18. Prevalencia inicial de TBb en el establo de producción (A), determinada por la PTCC

En la prueba serológica de ELISA, el 7.1 % (34/475) de las vacas resultó positivas a *M. bovis* (figura 19); mientras que, el 1.9% (9/475) fue positiva a *M. avium* (figura 20). De las 34 positivas a ELISA, 13 fueron rectoras a la PTCC, 13 negativas, 6 sospechosas (2 animales no se les pudo dar seguimiento).

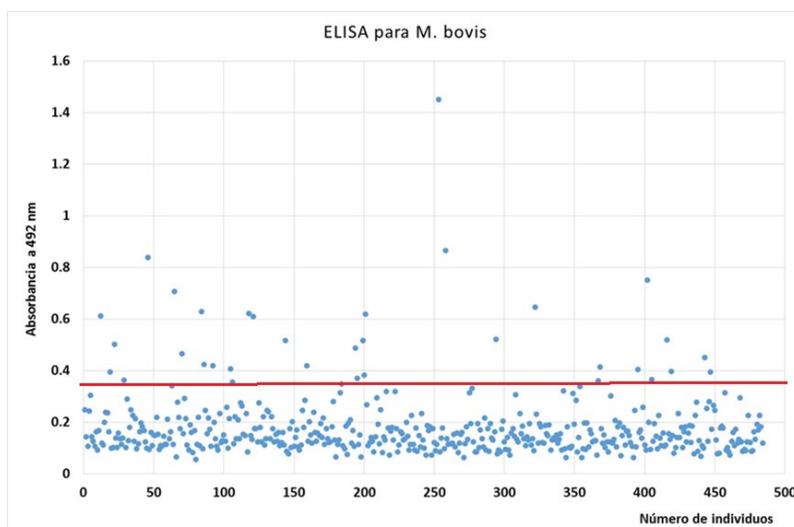


Figura 19. Determinación de niveles individuales de anticuerpos en vacas en producción por ELISA empleando el CFPE de *M. bovis*, previo a la vacunación. La línea indica el punto de corte de 0.35 DO₄₉₂

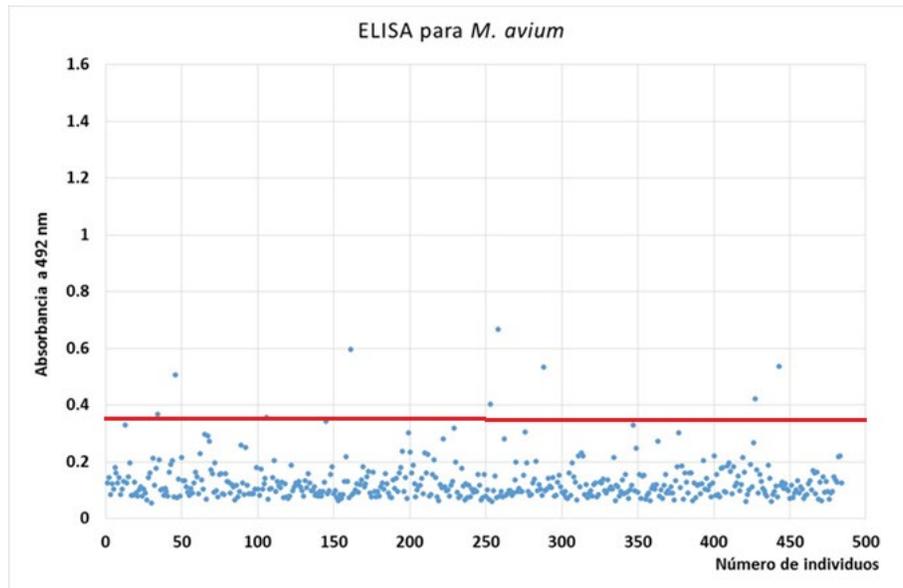


Figura 20. Determinación de niveles individuales de anticuerpos en vacas en producción por ELISA, empleando el CFPE de *M. avium*, previo a la vacunación. La línea indica el punto de corte de 0.35 DO_{492}

Con el antecedente de la prevalencia de tuberculosis registrada por la prueba PTCC a finales del 2017 para este establo en producción (A) y con la finalidad de comparar y determinar, si la prevalencia de la enfermedad disminuyó por efecto de la vacunación, en septiembre de 2019 se aplicó la segunda PTCC a 338 vacas, de las cuales 127 fueron rectoras, por tanto, la prevalencia registrada en ese entonces fue del 37.6% (figura 21b). Es importante mencionar que 100 de estos animales rectoras, ya habitaban en el establo desde hacía varios años y fueron vacunadas cuando tenían más de 2 años de edad, mientras que las otras 27 vacas fueron movilizadas de los establos de recría (B y C) al establo de producción (A) y recibieron la vacuna cuando tenían menos de 2 años de edad. En el mes de junio del año 2020, 344 vacas fueron tuberculinizadas y la prevalencia calculada fue del 20.9 % (72 vacas rectoras)

(Figura 21c). Evidenciando una reducción de vacas rectoras del 44.3 % al cabo de 3 años.

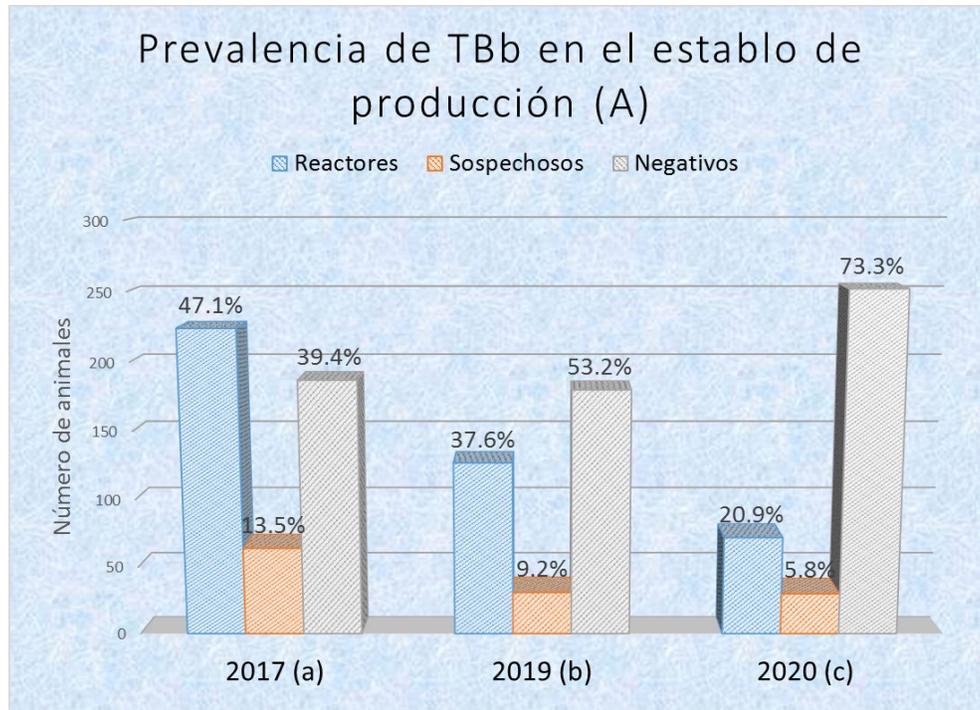
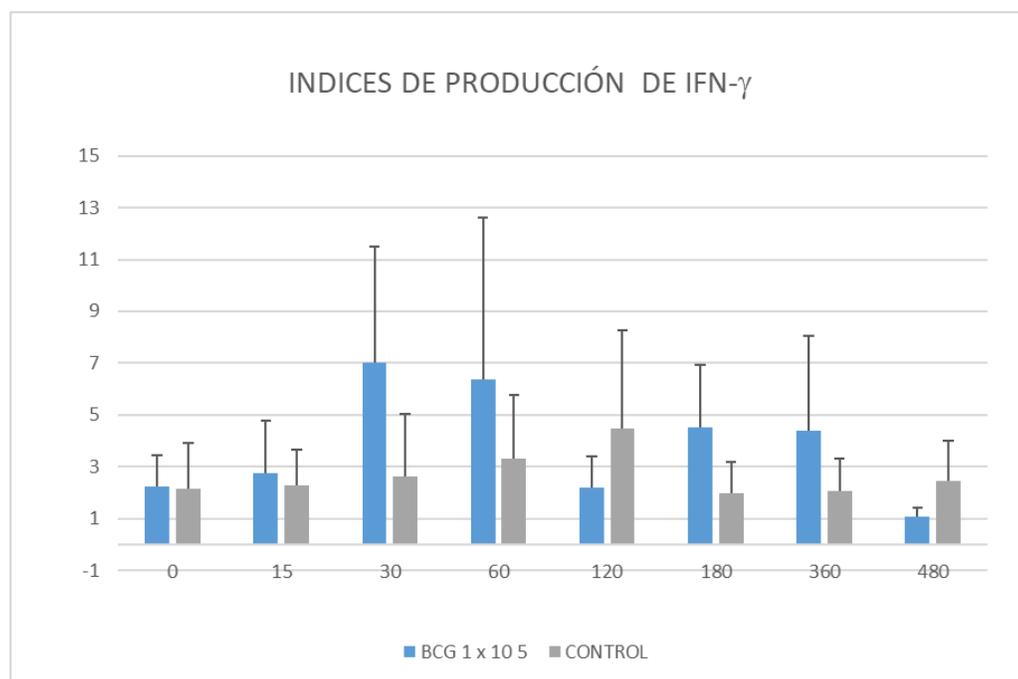


Figura 21. Comparación de la prevalencia de TBb en vacas del establo en producción (A) en los años 2017 (a), 2019 (b) y 2020 (c). Donde se observa una disminución gradual en la cantidad de animales retores.

6.2 Respuesta inmune celular y humoral

Como se explicó anteriormente, la evaluación de la respuesta inmune inducida por la vacuna BCG-Phipps, se realizó en un grupo de 10 becerras neonatas negativas a las diferentes pruebas diagnósticas para la TBb, teniendo un grupo del mismo número de animales con el mismo status inicial a la enfermedad. Los resultados de evaluación en los niveles de producción de IFN- γ en cultivos de sangre completa estimulados con el CFPE de *M. bovis*, indican diferencia

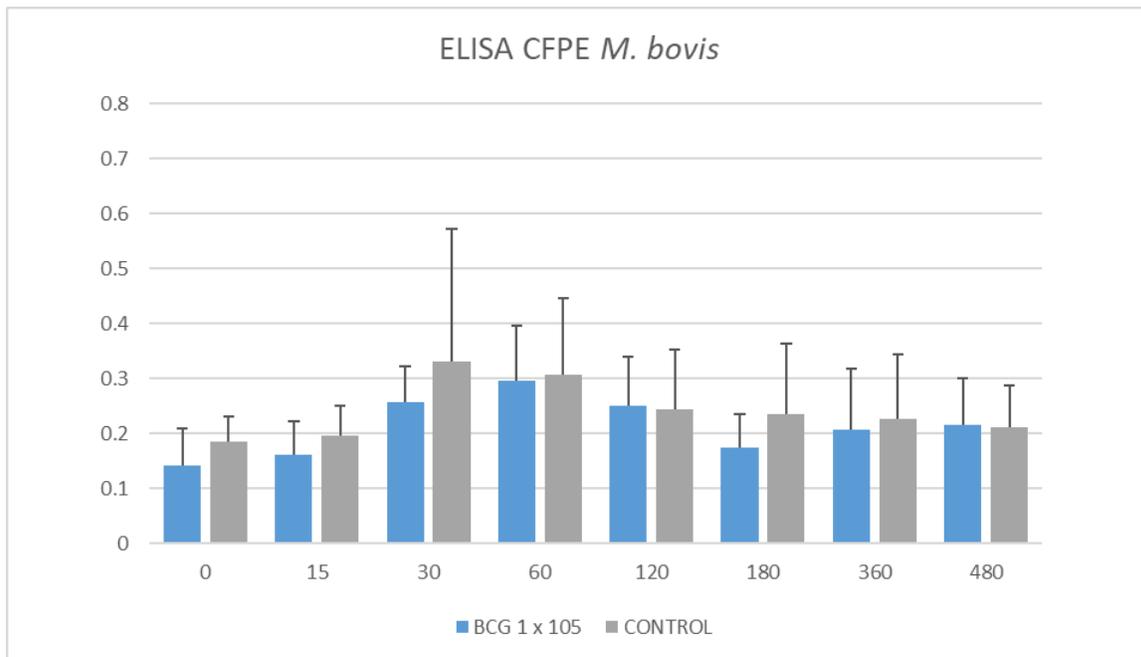
significativa a los 30 días ($P=0.007$) y a los 180 días ($P=0.008$) para el grupo vacunado en relación con el grupo control; en tanto que, para éste se observaron incrementos importantes a los 120 y 480 días de seguimiento, señalando posibles infecciones en los animales del grupo. También se registraron diferencias en los niveles de producción de la citocina en el grupo vacunado en función del tiempo, para los días 30, 60, 180 y 360 días con respecto al primer y último muestreo ($p<0.05$) (Figura 22).



*Figura 22. Grafico del promedio \pm DE en los índices de producción de IFN- γ en función del tiempo de muestreo, obtenidos en cultivos de sangre completa estimulados con el CFPE de *M. bovis* en los animales del grupo vacunado con BCG-Phipps 1×10^5 UFC y del grupo control.*

Las variaciones en los niveles de anticuerpos IgG en el grupo inmunizado con respecto al grupo control determinados por ELISA, no mostraron diferencias significativas en función del tiempo; sin embargo, si se registraron niveles

ligeramente más altos que el promedio determinado a los 30 días para el grupo control (Figura 23).



*Figura 23. Grafico del promedio \pm DE en los niveles de anticuerpos IgG determinados por ELISA empleando el CFPE de *M. bovis* en los animales del grupo vacunado con BCG-Phipps 1×10^5 UFC y del grupo control.*

En la prueba intradérmica de la tuberculina doble comparativa efectuada a los seis meses post-vacunación, una de las becerras del grupo vacunado fue reactiva, y ninguna de las becerras del grupo control lo fue (Cuadro 1). A los 12 meses que fueron nuevamente probados los animales, la reactividad del animal reactor del grupo vacunado desapareció, y no volvió a ser reactor en la subsecuente prueba efectuada a los 18 meses. En tanto que, dos animales del grupo control fueron positivos a los 12 meses y permanecieron igual a los 18 meses (Cuadro 1), indicando un estado de infección en ellos, lo cual se confirmó por su resultado positivo a la prueba IGRA (BOVIGAM®).

Cuadro 1. Reactividad a la prueba de tuberculina doble comparativa en el Grupo de becerras vacunadas con BCG-Phipps y Grupo control

| | <i>Prevacunación</i> | <i>6 meses post vacunación</i> | <i>12 meses post vacunación</i> | <i>18 meses post vacunación</i> |
|---------------------------------|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>BCG 1x10⁵ UFC</i> | 0/10 | 1/10 | 0/10 | 0/10 |
| <i>No vacunado</i> | 0/10 | 0/10 | 2/10 | 2/10 |

7. Discusión

La Tuberculosis bovina constituye un problema de difícil control y erradicación en los sistemas producto-bovino-leche con alta prevalencia; lo cual se relaciona con factores inherentes a la propia enfermedad como lo es, su curso crónico y grado de infección; así como, la capacidad del patógeno de permanecer latente en el hospedador por un largo período. Mayormente, una nutrición deficiente, presencia de enfermedades concurrentes, esquemas intensivos en la producción de leche; además de un mal manejo de los establos, incluyendo la falta de medidas de bioseguridad son factores de riesgo que favorecen la aparición de nuevos casos, a la vez que dificultan el control de la enfermedad ^(17,132,133).

Actualmente las estrategias rutinarias de control se fundamentan en la identificación de animales infectados mediante la prueba de tuberculina, principal herramienta diagnóstica empleada para el efecto, y la posterior eliminación o segregación de los animales reactivos ⁽¹³³⁾. Sin embargo, debido a la carencia de esquemas de compensación por el alto costo que ello



representa, existe una baja participación en apoyo a las actividades de la Campaña contra la Tuberculosis Bovina. Mayormente, en los sistemas de producción bovinos-leche con tecnificación semi-intensiva e intensiva, en los cuales las estrategias de control anteriormente mencionadas no han logrado el éxito esperado, se observan incrementos en los índices de incidencia y prevalencia, que conlleva a una disminución de los parámetros productivos y reproductivos en los sistemas, por lo que se busca otras estrategias de control, basadas en el establecimiento de medidas sanitarias y de bioseguridad, conjuntamente con un programa de vacunación contra la TBb, primordialmente en becerras y posteriormente en las diferentes etapas de desarrollo de los animales en producción ^(11,74). Al respecto la vacuna BCG se considera el biológico más idóneo, dado que deriva del propio microorganismo causante de la enfermedad, *Mycobacterium bovis*. La BCG es una bacteria viva atenuada que ha mostrado induce una respuesta inmune celular protectora ante desafíos controlados y bajo condiciones de campo ^(134,135,136). Durante muchos años se ha puesto en tela de juicio su efectividad y un problema que ha impedido su práctica es la posible interferencia de la vacunación con la prueba diagnóstica de la tuberculina ^(137,138). Actualmente, se desconoce el porcentaje de conversión de la PTCC inducida por la BCG, su significado con respecto a la inmunidad protectora y cuáles son los factores que determinan o influyen en el establecimiento de ésta, ya que puede estar afectada por la cepa de BCG empleada, dosis, edad de aplicación, participación de las micobacterias ambientales, la idiosincrasia inmunológica de cada organismo y un sin número de factores que han sido poco analizados. Por lo anterior, en este estudio se evaluó la eficacia de la vacuna BCG-Phipps a una dosis de 1 x

10^5 UFC, considerada una dosis baja en el control de la tuberculosis bovina en un hato de alta prevalencia. Para ello, se aplicó la vacuna a toda la población de becerras y vaquillas de los establos de remplazo o de repoblación (B y C), al hato de producción, estable A. De los cuales se determinó la prevalencia de la enfermedad previo a la aplicación de la vacuna BCG, registrándose una prevalencia en el hato de producción de 47.1% (224/475) en octubre de 2017 (Figura 18); en tanto que, para los establos de recría (B y C) la prevalencia fue del 17.7% (75/423) (Figura 14). Al momento de vacunar y de tener los datos de prevalencia, se les encomendó y dieron instrucciones al propietario y a los encargados de los establos de seguir las medidas de bioseguridad indicadas para coadyuvar en el control de la enfermedad, las cuales incluían: Eliminación de becerras confirmadas tuberculosas, la no introducción de becerras de otros establos, cuyo estatus a la enfermedad era incierto, pero si la repoblación con becerras vacunadas desde su nacimiento, no dar calostro ni leche de vacas reactoras salvo previa pasteurización. Mayormente, en establos de alta prevalencia hay una mayor posibilidad de que existan vacas anérgicas, por lo que es una condicionante fuerte para que el calostro y la leche se pasteuricen, o en su caso usar sustituto lácteo. Debido a que los animales anérgicos, que generalmente se encuentran en estados avanzados de la enfermedad resultan negativos a las pruebas de tuberculina e IFN- γ , es por ello que, el monitoreo diagnóstico de los animales de los hatos se realizó rutinariamente lo cual permitiría verificar si las medidas de control aplicadas estaban dando los resultados esperados de reducir la prevalencia de la tuberculosis. Considerando este seguimiento durante dos años después de haber aplicado la vacuna BCG-Phipps a la población de vaquillas y becerras, y dando



continuidad de vacunar a toda becerria neonata durante el periodo que duró el estudio, que a los nueve meses la prevalencia determinada por la PTCC disminuyó de 17.7% a 5.63%; mientras que, a los dos años la reactividad fue de 10.3%, mostrando un aumento con respecto a la que se registró a los nueve meses post vacunación (Figura 17). Al momento de pasar los números de animales reactivos a la base de datos, se observaron números diferentes a los ya previamente registrados, comentando esta situación con el propietario y encargado de los establos, se nos informó que habían adquirido becerrias de otros establos desconociendo su estatus ante la enfermedad; además, se observó que no había una separación de los calostros ni de la leche proveniente de vacas reactivas, tal fue así que, becerrias probadas menores a un mes de edad mostraban reactividad a la PTCC. En relación a ello, se ha documentado ampliamente que la introducción de ganado bovino a los establos de control es una práctica frecuente en los sistemas producto-bovino-leche, lo cual representa un riesgo alto de transmisión de tuberculosis entre hatos, que facilita la propagación de la TBb a otras áreas geográficas. Mayormente, también se ha documentado que el movimiento de ganado es la principal fuente de transmisión de la enfermedad a hatos libres ⁽¹³⁹⁾. Es así que, muchos de los brotes de tuberculosis que se han producido, sobre todo en países donde la enfermedad ha sido controlada, se han presentado con posterioridad al traslado de ganado ^(128,140).

Por otro lado, y en particular en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hgo, pocos propietarios cuarentenan a los animales de reciente compra, lo cual representa un riesgo alto de transmisión de tuberculosis u otras enfermedades en el hato, este escenario de riesgo es mayor si se trata de becerrias, a las

cuales, y de acuerdo a la norma de la CANETB no se tuberculinizan hasta pasados los tres meses de edad, escapando a la detección temprana de la enfermedad; máxime cuando se tienen informes de casos de tuberculosis diseminada en becerras menores a cinco meses de edad, señalando la adquisición de infecciones congénitas o perinatales ⁽¹⁴¹⁾. Existen informes previos de neumonía grave con lesiones granulomatosas en pulmón, hígado y ganglios linfáticos en becerras de 15 y 45 días de edad ^(142,143). Estos informes señalan la relevancia de realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y de limitar la introducción de becerras a los hatos en fase de control. En este contexto, la introducción de becerras a los establos de recría (B y C) tuvo un efecto negativo en el estudio de control de la enfermedad que se había implementado, lo que se pudo constatar al realizar las pruebas de tuberculina a los dos años posteriores a su establecimiento, cuando se observó un porcentaje mayor de reactividad en la población de estos establos. Con ello se destaca la importancia de mantener y dar seguimiento a las medidas de bioseguridad en los establos en los que en un futuro remoto se aplique la vacuna contra la TBb, así como realizar un diagnóstico preventivo y oportuno a los animales que se introduzcan a los hatos.

Contrario a lo que se registró durante el periodo de estudio en la población de becerras y vaquillas, la prevalencia en el establo de vacas en producción si se mantuvo a la baja, en relación a ello, y de acuerdo a los registros inicial y posteriores de la PTCC, la prevalencia bajo de 47.1% a 20.9% en un periodo de dos años (Figura 21). Señalando una reducción del 44.3% de vacas reactoras en el establo de producción, calculándose entonces una eficacia vacunal de 55.62 % lo cual fue posible en un plazo de dos años de establecido el programa



de control, y considerando la dinámica de población en los establos de producción; puesto que, por edad o enfermedad muchos animales fueron eliminados, y para mantener el número de vacas productoras, éstas fueron reemplazados por las vaquillas previamente vacunadas.

Ello indica las grandes posibilidades de disminuir la incidencia y prevalencia de la tuberculosis en los sistemas-bovino-leche de alta prevalencia, luego del establecimiento del programa de control evaluado a mediano y largo plazo, siempre y cuando los animales a introducir estén vacunados y exista el compromiso de mantener y vigilar que las medidas de biocontención y bioexclusión que permitan garantizar el éxito del programa de control de la TBb evaluado en este estudio, lo cual resultaría altamente beneficioso para los productores. Debido a que, como se comentó anteriormente, el programa actual basado en la eliminación o segregación de bovinos reactivos es económica y socialmente incosteable en hatos de alta prevalencia, puesto que los programas gubernamentales no cuentan con un programa efectivo de indemnización para apoyar a los productores que tienen hatos con tuberculosis, lo cual se vuelve un círculo vicioso, pues los animales declarados como enfermos se quedan en los hatos diseminando la enfermedad. Sin embargo, hasta ahora la normatividad vigente no contempla la vacunación, aun cuando se ha demostrado en estudios controlados y a nivel de campo su utilidad para el propósito buscado.

Es importante mencionar que, si bien la evaluación del programa de control propuesto en este estudio duró solo dos años, registrándose en el periodo una eficacia vacunal de 55.62 %, existe una alta probabilidad de que si el programa de vacunación se aplica de manera permanente a todo animal neonato la



eficacia vacunal aumente, dado que la población adulta en producción sería reemplazada por los animales vacunados a edad temprana, lo cual tendría un alto costo-beneficio a los productores del sistema-producto bovino-leche.

Estudios previos de vacunación contra la tuberculosis bovina a nivel de campo empleando la vacuna BCG-Phipps a una dosis de 1×10^4 UFC efectuados también en un hato de la Cuenca de Tizayuca, Hidalgo, mostraron una reducción significativa de la prevalencia de la enfermedad en un periodo de tres años, del 50 al 11% ⁽⁸⁵⁾. Por otro lado, López-Valencia et al. (2010) en Baja California México reportaron una eficacia vacunal del 59.4 % empleando la vacuna BCG cepa Tokio, señalando además que si bien el uso de esta vacuna BCG, aunque no fue capaz de proteger al 100%, si evitó que los animales vacunados contra la tuberculosis excreten bacilos en sus secreciones nasales durante el periodo evaluado ⁽¹⁴⁴⁾; mientras que, en otro estudio efectuado también bajo condiciones de campo por Ameni et al (2010) en Etiopia empleando la BCG cepa Danesa, mostró una eficacia vacunal entre el 56% y 68% considerando en la evaluación parámetros de producción de interferón gamma (IFN- γ) empleando los antígenos ESAT-6 y CFP-10 (antígenos que permiten distinguir animales vacunados de infectados), la PTCC, el examen post mortem y el cultivo bacteriológico de *M. bovis* a partir de las lesiones ⁽¹⁴⁵⁾. Más recientemente, Retamal et al (2021) ⁽¹⁴⁶⁾ evaluaron la eficacia y los impactos que sobre la productividad y la fertilidad ofreció la vacunación con la cepa BCG-Rusia en vaquillas de 11 meses de un hato lechero, en condición de transmisión natural, considerando el posible estado de infección de los animales vacunados y control por el ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA) con los antígenos DIVA (ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c). La eficacia se calculó como el

porcentaje de reducción en la incidencia de infección atribuible a la vacunación, que mostró un nivel estadísticamente significativo de protección global del 66,5%. Sin observar efectos adversos en la fertilidad y la producción, antes, al contrario, los efectos fueron más bien benéficos considerando los parámetros de producción de leche que fue significativamente mayor en el grupo vacunado con las novillas no vacunadas. Sugiriendo, que la vacunación con BCG de vaquillas en un entorno de transmisión natural podría resultar en beneficios tanto sanitarios como productivos, apoyando su implementación como una nueva estrategia para la prevención de la tuberculosis en zonas con alta prevalencia. En la evaluación de vacunas contra la TB la cuantificación y seguimiento de la producción de IFN- γ por las células T específicas, ha sido un parámetro esencial que permite determinar parcialmente el establecimiento de la inmunidad protectora, de manera que el aumento de la eficacia de la vacuna está ligado al incremento de la producción específica de IFN- γ ^(10,147). De acuerdo a ello, y en lo que respecta al seguimiento de la respuesta inmune en las becerras inmunizadas con la vacuna BCG-Phipps a la dosis evaluada de 1×10^5 UFC, los resultados señalan una mayor producción del IFN- γ en los animales del grupo vacunado con BCG, en presencia del PPD de *M. bovis*, en relación al grupo de animales control, sobre todo a los 30 y 60 días post vacunación, indicando con ello el establecimiento de una inmunidad de tipo celular. No obstante, se observaron variaciones importantes en la producción de la citocina en ambos grupos, señalando igualmente la influencia que ejerce la exposición continua a micobacterias atípicas ambientales, o las propias cepas de campo de *M. bovis*, circulantes en la respuesta inmune de los animales. Si bien, en el estudio no hubo un desafío experimental de los



animales, si hubo una exposición natural a las cepas de campo de *M. bovis* considerando la elevada prevalencia de tuberculosis existente en el hato. De igual modo, esta situación se refleja en la cinética de anticuerpos determinada para ambos grupos a los antígenos de la micobacteria, en la cual se observan variaciones significativas tipo refuerzo durante el periodo evaluado, mostrando con ello la exposición continua a la que estuvieron sometidos los animales en el campo. La prueba intradérmica de la tuberculina se aplicó en ambos grupos en tres ocasiones. En la primera, uno de los animales vacunados fue reactor, y dejó de serlo en las posteriores pruebas intradérmicas; mientras que, dos de los animales del grupo control, mostraron reactividad al año y siguieron manteniendo su reactividad a los 18 meses. Estas observaciones señalan que la prueba de la tuberculina no se muestra comprometida, con la dosis empleada de vacuna, situación que para fines prácticos resulta conveniente y provechosa en la identificación de animales tuberculosos, mediante el empleo de esta prueba diagnóstica. González et al (2012) mostraron que la aplicación de la vacuna BCG-Phipps a una dosis 10 veces más baja que la aquí evaluada (1×10^4 UFC), bajo condiciones naturales de exposición en un hato lechero de alta prevalencia, promovieron la proliferación y activación de linfocitos T CD4 + y CD8 +, con un nivel moderado en la producción de IFN- γ , biomarcadores que indican el desarrollo de una buena inmunidad contra *M. bovis* ⁽⁶¹⁾.

Contrario a lo que se ha observado en estudios controlados y a nivel de campo empleando dosis bajas de vacuna BCG, los cuales han resultados bastante prometedores para su posible uso en el control de la enfermedad, las investigaciones empleando dosis más altas de vacuna BCG de 10^6 - 10^8 UFC,



muestran que los animales vacunados desarrollaron la hipersensibilidad tardía a la tuberculina antes de ser desafiados experimentalmente, aunado a ello, se informó que el grado de protección fue menor en los animales vacunados, que mostraron reactividad a la prueba intradérmica ⁽¹⁴⁸⁾. Estudios realizados al respecto, en modelo ratón, muestran que dosis bajas de BCG, $\leq 10^4$ UFC inducen preferentemente una respuesta Th1 que se confirma por el aumento significativo de las citocinas IL-2 e IFN- γ , mientras que dosis altas de 10^6 - 10^8 UFC favorecen el desarrollo de una respuesta Th2, debido a la producción de IL-4 e IL-10 ^(52,149) ; respuesta que no es protectora contra el patógeno intracelular. Resultados similares se han registrado en estudios realizados para evaluar la efectividad de la vacuna BCG a dosis mayores de 6×10^6 UFC en becerras, observándose también una respuesta mixta Th1/Th2, definida por la expresión de IFN- γ e IL-4, que no fue protectora ^(150,151). De igual modo se ha determinado que la aplicación repetida de la vacuna induce una respuesta similar, que ante el desafío micobacteriano, no es protectora.

Dado que, la efectividad y grado de protección de la vacuna BCG se relaciona con la cepa vacunal utilizada, dosis de vacuna, edad de los animales y sensibilización de los mismos a micobacterias atípicas. La importancia del presente estudio estriba en la aplicación y evaluación de la eficacia de la vacuna BCG, cepa Phipps, en condiciones de campo, en un hato con elevada prevalencia de la enfermedad, que de acuerdo a los parámetros inmunológicos evaluados, fue capaz de inducir una respuesta inmune celular protectora, caracterizada por una baja, pero significativa producción de IFN- γ , junto con bajos niveles de anticuerpos; lo cual es deseable que se logre en el desarrollo de resistencia contra la enfermedad a través de la aplicación de la vacuna.



Mayormente, se demuestra que en las becerras vacunadas la reactividad que se puede inducir a la tuberculina es baja y transitoria, por tanto, la utilidad diagnóstica de la prueba no se vería comprometida dado que desaparece en los primeros meses pos vacunación. Esto concuerda con lo reportado por Whelan et al, 2011, quienes observaron que a los 9 meses post vacunación desaparece cualquier reactividad a la prueba intradérmica de la tuberculina [\(148\)](#).

Es importante mencionar que la vacuna BCG-Phipps ha sido evaluada en modelos de ratón conjuntamente con otras cepas de BCG, en esos estudios se observó que los ratones inmunizados con esta cepa desarrollaron áreas de neumonía menos extensas ante un desafío con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, que aquellas observadas en los animales vacunados con otras cepas de BCG, además la carga bacteriana en las muestras de tejido pulmonar fue menor, indicando el establecimiento de resistencia a la enfermedad. Además, se observó que la reacción a la PTCC fue relativamente baja, en comparación con las otras cepas de BCG y el grupo control [\(106\)](#). Es un hecho que la pérdida de sensibilidad de la prueba de tuberculina no correlaciona con la pérdida de la inmunidad protectora, de acuerdo a los resultados observados en este estudio y a los realizados por otros investigadores. Los resultados obtenidos en la evaluación del programa de control contra la tuberculosis bovina empleando la vacuna BCG-Phipps en un hato de alta prevalencia conjuntamente con el establecimiento de medidas de bioseguridad, y manteniendo las actividades de vacunación de todo animal neonato durante el periodo que duró el estudio mostró resultados satisfactorios, por lo que se considera que el programa es una excelente

propuesta para aplicarse en los sistemas producto bovino-leche con alta prevalencia de TBb que junto con buenas prácticas de manejo y el control estricto en la movilización de animales contribuya a reducir los índices de incidencia y prevalencia de la enfermedad.

8. Conclusiones

1. Los índices de prevalencia de la tuberculosis bovina disminuyeron considerablemente en el establo de producción, luego del establecimiento del programa de vacunación empleando la vacuna BCG-Phipps a la dosis de 1×10^5 UFC, en un plazo de dos años, en el cual las vacas que fueron removidas por circunstancias diversas fueron reemplazadas por vaquillas previamente vacunadas.
2. Si bien los índices de prevalencia de la TBb no disminuyeron de manera importante en los establos de becerras y vaquillas, por el sesgo que se tuvo por la introducción de becerras provenientes de otros hatos con desconocimiento de su estatus a la enfermedad, la respuesta inmune que se estableció en las becerras vacunadas fue protectora y de larga vida considerando los parámetros inmunes evaluados durante el periodo que duro el estudio.
3. La dosis de vacuna empleada indujo niveles significativos de la citocina IFN- γ , considera uno de los principales mediadores de la respuesta



inmune celular, que permite determinar parcialmente el establecimiento de la inmunidad protectora.

4. La dosis de vacuna empleada indujo una respuesta de hipersensibilidad tardía a la tuberculina baja y transitoria, situación que, para fines prácticos, resulta conveniente y beneficiosa en la identificación de animales tuberculosos mediante el empleo de esta prueba diagnóstica, bajo el escenario probable del establecimiento de un programa de vacunación en los hatos bovinos.

Por lo anterior expuesto, la BCG subcepa Phipps a dosis de 1×10^5 UFC es una alternativa viable para controlar la TBb en hatos lecheros con altas prevalencias, con la condición previa y determinante de implementar un buen programa de bioseguridad dentro de la UPP lechera.



9. Referencias.

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Tuberculosis Bovina. Disponible en: <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/tuberculosis-bovina/#G>
2. Gallagher J., Clifton-Hadley R.S. (2000) Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance for other animals. *Research in veterinary science* 69, 203-217. (doi:10.1053/rvsc.2000.0422).
3. Menzies FD, Neill SD. (2000) Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J*;160: 92-106.
4. C. Gortazar, J. Vicente, D. Gavier-Widen. (2003) Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*), *Vet. Rec.*, 152, pp. 779-780
5. SAGARPA. SENASICA. (2016) *Guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina.*
6. SAGARPA. SENASICA. (2009) Manual de Buenas Prácticas Pecuarias en Unidades de Producción de Leche Bovina.
7. Chamizo Pestana, E. G. (2019). Tuberculosis Bovina. *Anuario Ciencia en la UNAH*, 17(1). Disponible en: <https://rcta.unah.edu.cu/index.php/ACUNAH/article/view/1177>

8. Ortiz Muñoz, E. P. (2016). *La Tuberculosis Bovina: un problema aún sin resolver. / Bovine Tuberculosis: a yet unresolved issue. CIBA Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, 4(8), 162 - 169. Recuperado a partir de <http://ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/32>
9. Corona-Gómez, L., Jaramillo-Meza, L., Pérez-González, R., Diosdado-Vargas, F., Santiago-Cruz, J., Espitia-Pinzón, C. I., Lascurain, R., Díaz-Otero, F. (2017). Effect of a low dose of BCG-Phipps vaccine on the development of reactivity to tuberculin skin test in neonatal calves and adult cows. *Journal of Veterinary Medicine Animal Health*. 9, 290-299.
10. Balseiro, Ana, Jobin Thomas, Christian Gortázar y María A. Risalde. (2020) "Desarrollo y desafíos en la vacunación contra la tuberculosis animal" *Patógenos* 9, no. 6: 472. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060472>
11. Odio, A. D., Polanco, R. P., Marrero, I. G., Proenza, R. T., Garlobo, Y. R., Coipel, Y. R., & Guevara, I. A. (2015). *Mycobacterium bovis*: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria. *Bionatura*, 1(1), 34-39.
12. Bazezew Marshet. (2020) A review on bovine tuberculosis and its zoonotic important. *Int J Vet Sci Anim Husbandry*; 5(5):31-38.
13. McVey, D. S., Kennedy, M., & Chengappa, M. M. (2013). *Veterinary microbiology* (Third edition). Wiley-Blackwell.
14. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., FitzPatrick, E. S., & Fanning, S. (2016). *Concise review of veterinary microbiology* (Second edition). Wiley-Blackwell.



15. Vincent AT, Nyongesa S, Morneau I, Reed MB, Tocheva EI and Veyrier FJ (2018) The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution?. *Front. Microbiol.* 9:2341. doi: 10.3389/fmicb.2018.02341
16. Beksisa Urge Hurrisa. (2020). Nuevo escenario evolutivo y métodos de diagnóstico molecular en la tipificación de cepas del complejo Mycobacterium Tuberculosis. *Archivos de Ciencias Veterinarias y Animales* 2 (1). DOI: 10.5281 / zenodo.3812681
17. El-Sayed, A., El-Shannat, S., Kamel, M., Castañeda-Vazquez, M.A. and Castañeda-Vazquez, H. (2016), Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. *Zoonoses Public Health*, 63: 251-264. <https://doi.org/10.1111/zph.12242>
18. Echeverria-Valencia, G., Flores-Villalva, S., & Espitia, C. I. (2017). Virulence Factors and Pathogenicity of Mycobacterium. In *Mycobacterium-Research and Development*. IntechOpen. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/mycobacterium-research-and-development/virulence-factors-and-pathogenicity-of-mycobacterium>
19. Díaz Otero, F, Jaramillo Meza, L, *Tuberculosis Bovina. De Robert Koch a nuestros días. (2012)*. D.F., México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
20. González Ruiz, S., Cantó Alarcón, G. J., Rodríguez-Hernández E., Flores Villalba S., Román Ponce, S. I., & Milián Suazo, F. (2018). Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(2), 328-345. Disponible en: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4396>
21. Panorama de la Lechería en México. SIAP. (Mayo 2020). Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/prensa/boletin-de-leche-155932>



22. Clavijo, A. M., Rolo de M, A. C., & Corso, M. (2004). Todo lo que usted debe saber sobre la tuberculosis bovina. *Revista Digital CENIAP HOY*, (Especia).
23. Mellado, M., Reséndiz, D., Martínez, A. M., de Santiago, M. A., Véliz, F. G., & García, J. E. (2015). Milk yield and reproductive performance of Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis. *Tropical animal health and production*, 47(6), 1061–1066. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0828-1>
24. Maas, A., Mihura, H. E., Traversa, M. J. *Estudio descriptivo de pérdidas productivas en ganado lechero tuberculino positivo (Tesis)*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias; Argentina. 2016. URI: <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1210>
25. H. de Waard J. ¿Ordeñando micobacterias del ganado? Impacto económico y en salud de Tuberculosis bovina y Paratuberculosis en Colombia. (2010). *Revista MVZ Córdoba*, 15(2), 2037–2040.
26. Pérez-Barragán, E., & Manjarrez-Tellez, B. (2017). Tuberculosis por *Mycobacterium bovis*: ¿una infección reemergente?. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(5), 635–640.
27. Cousins, S. (2018). The challenges of preventing bovine tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 96(2), 82+. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272217/PMC5791786.pdf>



28. Martínez, J. C., Llerena, C., & Valbuena, Y. A. (2019). La importancia de investigar *Mycobacterium bovis* en muestras clínicas de procedencia humana. *Biomédica*, 39, 117-124. Disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i2.4358>
29. de la Rúa-Domenech R. (2006). Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 86(2), 77–109. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>
30. López Marín L. M., Díaz Otero F., Vallecillo Maza A. J., Esquivel Solís H., Gutierrez Pabello J. Tuberculosis humana y bovina en Latino américa: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Microbiología*. 2006;48(2):173-178. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11467>
31. Higareda-de Sales, L. G., Ramírez-Cervantes, F. J., Razo-Ibarra, F., Milián-Suazo, F., Aguilar-Tipacamú, G., & Herrera-Rodríguez, S. E. (2015). *Potencial presencia de tuberculosis zoonótica en la región Altos Sur de Jalisco, México*. *Salud Jalisco*, 2(1), 25-29.
32. Pérez-Guerrero, Laura, Milián-Suazo, Feliciano, Arriaga-Díaz, Camila, Romero-Torres, Cecilia, & Escartín-Chávez, Minerva. (2008). *Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México*. *Salud Pública de México*, 50(4), 286-291. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342008000400006&lng=es&tlng=pt.
33. Torres-Gonzalez P, Cervera-Hernandez ME, Martínez-Gamboa A, Garcia-Garcia L, Cruz-Hervert LP, Bobadilla-Del Valle M, Ponce-de Leon A, Sifuentes-Osornio J. *Human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis: a retrospective comparison with*

Mycobacterium tuberculosis in a Mexican tertiary care centre, 2000-2015. BMC Infect Dis. 2016 Nov 8;16(1):657. doi: 10.1186/s12879-016-2001-5. PMID: 27825312; PMCID: PMC5101666.

34. Loiseau, C., Menardo, F., Aseffa, A., Hailu, E., Gumi, B., Ameni, G., Berg, S., Rigouts, L., Robbe-Austerman, S., Zinsstag, J., Gagneux, S., & Brites, D. (2020). An African origin for *Mycobacterium bovis*. *Evolution, medicine, and public health*, 2020(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/emph/eoaa005>
35. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299>
36. Byrne, A.W., Graham, J., Brown, C. et al. Bovine tuberculosis visible lesions in cattle culled during herd breakdowns: the effects of individual characteristics, trade movement and co-infection. *BMC Vet Res* 13, 400 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1321-z>
37. Bedolla M. (25 de noviembre de 2020) Principales Patologías que Causan Muerte en Unidades de Producción Pecuaria Lechera. Ammveb A.C. Disponible en: <https://www.facebook.com/ammv.especialistasenbovinos/videos/2703046846615589>
38. Carrisoza-Urbina J, Bedolla-Alva MA, Gutiérrez-Pabello JÁ. Exacerbada linfadenitis granulomatosa por *Mycobacterium bovis* como causa de timpanismo gaseoso en un becerro. *Clínica Veterinaria: abordaje diagnóstico y terapéutico*. 2018;4(2). Disponible en: <https://revistas.fmvz.unam.mx/index.php/Clinica-Veterinaria/article/view/24>



39. Dubey, S., Singh, R. V., Gupta, B., Nayak, A., Rai, A., Gupta, D., ... & Dhakad, B. M. S. (2020). Bovine tuberculosis and its public health significance/bovine tuberculosis and its public health significance: A review, *Entomol Zool Stud* 2020;8(5):2281-2287.
40. Zachary, J. F. (2017). *Pathologic basis of veterinary disease* (Sixth edition). Elsevier.
41. Maxie, M. G., & Jubb, K. V. F. (2015). *Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals* (Sixth edition). Elsevier. Vol. 2.
42. Xu F, Tian L, Li Y, Zhang X, Qi Y, Jing Z, et al. (2021) High prevalence of extrapulmonary tuberculosis in dairy farms: Evidence for possible gastrointestinal transmission. *PLoS ONE* 16(3): e0249341. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249341>
43. Iowa State University Center for Food Security and Public Health, "Tuberculosis bovina" (2009). Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets. 21. Disponible en: https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis_bovina.pdf
44. Bozzano, F., Marras, F., & De Maria, A. (2014). Immunology of tuberculosis. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 6(1), e2014027. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.027>
45. Chambers, M. A., Gordon, S. B., Olea-Popelka, F., & Barrow, P. (2018). *Bovine tuberculosis*. CABI.



46. Walters, A., Keeton, R., Labuschagné, A., Hsu, N.-J. and Jacobs, M. (2020), TNFRp75-dependent immune regulation of alveolar macrophages and neutrophils during early *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.13277>
47. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S., Baker, D. L., Baker, A., & Abbas, A. K. (2015). *Inmunología celular y molecular* (Octava edición). Elsevier España.
48. Gutiérrez Pabello, J. Á. G., & Morales Saavedra, J. L. (2010). *Inmunología veterinaria*. Manual Moderno.
49. Alcaraz-López, O.A., García-Gil, C., Morales-Martínez, C., López-Rincón, G., Estrada-Chávez, C., Gutiérrez-Pabello, J.A. and Esquivel-Solís, H. (2017), Divergent macrophage responses to *Mycobacterium bovis* among naturally exposed uninfected and infected cattle. *Immunol Cell Biol*, 95: 436-442. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/icb.2016.114>
50. Abdalla, A. E., Lambert, N., Duan, X., & Xie, J. (2016). Interleukin-10 Family and Tuberculosis: An Old Story Renewed. *International journal of biological sciences*, 12(6), 710–717. Disponible en: <https://doi.org/10.7150/ijbs.13881>
51. Casal Comendador, C. (2016). Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38795/>
52. Parlane, N. A., & Buddle, B. M. (2015). Immunity and vaccination against tuberculosis in cattle. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(1), 44-53.



53. Mezouar, S, Mege, J-L. Changing the paradigm of IFN- γ at the interface between innate and adaptive immunity: Macrophage-derived IFN- γ . *J Leukoc Biol.* 2020; 108: 419– 426. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0420-619RR>
54. García-Barragán, Á., Gutiérrez-Pabello, J. A., & Alfonseca-Silva, E. (2018). Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 59, 17–23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.001>
55. Choreño-Parra JA, Weinstein LI, Yunis EJ, Zúñiga J and Hernández-Pando R (2020) Thinking Outside the Box: Innate- and B Cell-Memory Responses as Novel Protective Mechanisms Against Tuberculosis. *Front. Immunol.* 11:226. doi: 10.3389/fimmu.2020.00226
56. Shekhar, S., & Yang, X. (2015). *Natural killer cells in host defense against veterinary pathogens. Veterinary immunology and immunopathology*, 168(1-2), 30–34. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.10.001>
57. Boysen, P., & Storset, A. K. (2009). Bovine natural killer cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 130, 163-177. doi: [10.1016/j.vetimm.2009.02.017](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.02.017)
58. Cheng Y, Huang C, Tsai HJ. Relationship of bovine TNF- α gene polymorphisms with the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle. *J Vet Med Sci.* (2016) Jun 1; 78 (5):727-32. doi: 10.1292/jvms.15-0506. Epub 2016 Feb 13. PMID: 26876219; PMCID: PMC4905823.
59. Cobián García A. (2020). Obtención de interferón gamma recombinante de bovino y producción de anticuerpos reactivos (Tesis de Maestría). CIATEJ. Guadalajara, Jalisco. México. Disponible en: <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/676>



60. Quevillon, E. M. I., Gutiérrez Pabello, J. Á. G., Arriaga Díaz, C., & Díaz Otero, F. (2013). *Respuesta inmune de becerras vacunadas con Mycobacterium bovis BCG, en un hato de alta prevalencia de tuberculosis bovina* (Tesis Doctoral), D.F., México.
61. González González X. A., Jaramillo Meza L., Lascurain Ledezma R., Torres Barranca J., Quevillon Cardinal E., & Díaz Otero F. (2012). Evaluación de subpoblaciones de linfocitos T en bovinos vacunados contra la tuberculosis bovina: estudio longitudinal comparativo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(2), 137–154.
62. Oropeza Jiménez, R., & Hernández Pando, R. (2009). *Influencia de variabilidad genética de Mycobacterium bovis en la virulencia y respuesta inmune experimental* (Tesis de Maestría). UNAM, D.F., México.
63. Kaufmann S. (2020). Vaccination Against Tuberculosis: Revamping BCG by Molecular Genetics Guided by Immunology. *Frontiers in immunology*, 11, 316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00316>
64. Maggioli MF, Palmer MV, Thacker TC, Vordermeier HM, McGill JL, Whelan AO, Larsen MH, Jacobs WR Jr. and Waters WR (2016) Increased TNF- α /IFN- γ /IL-2 and Decreased TNF- α /IFN- γ Production by Central Memory T Cells Are Associated with Protective Responses against Bovine Tuberculosis Following BCG Vaccination. *Front. Immunol.* 7:421. doi: 10.3389/fimmu.2016.00421
65. Eberl M., Hayday A., Cortegano I., Gil J. (S.F.). Celulas T Gamma Delta ($\gamma\delta$). British Society for Immunology. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/file/3235/download?token=0Nw5ySaa>



66. Guzman, E., Price, S., Poulsom, H., & Hope, J. (2012). Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Veterinary immunology and immunopathology*, 148, 161-167. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.03.013
67. Lyashchenko, K. P., Vordermeier, H. M., & Waters, W. R. (2020). Memory B cells and tuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 221, 110016. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110016>
68. Montaraz Crespo, J. A. (2012). Introducción a la inmunología (2a edición). UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
69. Organización Mundial de Sanidad Animal OIE (2018). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. Recuperado de: <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>
70. Doménech Gómez, A., Blanco Gutiérrez, M. del M., Cid Vázquez, M. D., Cutuli de Simón, M. T., Díez Guerrier, A. A., Domínguez Bernal, G., Gibello Prieto, A., & Gómez-Lucía Duato, E. (2017). *Manual gráfico de inmunología y enfermedades infecciosas en vacuno*. Servet.
71. Mohamed AM (2017) Tuberculin Skin Test for Control of Bovine Tuberculosis: Limitation History, Current Challenges and Future Opportunities. *J Microbiol Exp* 4(4): 00118. DOI: 10.15406/jmen.2017.04.00118
72. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. (2016) Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annual Review of Animal Biosciences*.;4:87-109. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111311.



73. Conlan AJK, Brooks Pollock E, McKinley TJ, Mitchell AP, Jones GJ, et al. (2015) Potential Benefits of Cattle Vaccination as a Supplementary Control for Bovine Tuberculosis. *PLOS Computational Biology* 11(2): e1004038. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004038>
74. Buddle BM, Vordermeier HM, Chambers MA and de Klerk-Lorist L-M (2018) Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. *Front. Vet. Sci.* 5:259. doi: 10.3389/fvets.2018.00259
75. Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., Rivera Muñoz, B., & Owen, J. A. (2014). *Kuby inmunología* (Tercera edición). McGraw-Hill Interamericana.
76. Tizard, I. R., & Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria*. Elsevier.
77. Roitt, I. M., Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., Rondinone, S. N., & Roitt, I. M. (2015). *Inmunología : fundamentos* (12a edición). Editorial Médica Panamericana.
78. Ada, G.L. The ideal vaccine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7, 105–109 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00328978>
79. Domínguez-Odio A, González Marrero I, Toirac-Proenza R, Rodríguez-Coipel Y. Prevención y diagnóstico veterinario de la tuberculosis bovina. Una revisión de las tendencias globales. *Spei Domus*. 2016;12(25):1-16. doi: <http://dx.doi.org/10.16925/2382-4247.2016.02.03>
80. Van der Heijden EMDL, Chileshe J, Vernooij JCM, Gortazar C, Juste RA, Sevilla I, et al. (2017) Immune response profiles of calves following vaccination with live BCG and inactivated



Mycobacterium bovis vaccine candidates. PLoS ONE 12(11): e0188448.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188448>

81. Jones GJ, Steinbach S, Sevilla IA, et al. Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2016 Dec;182:85-88. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.10.010.
82. Cai H, Tian X, Hu XD, Li SX, Yu DH, Zhu YX. Combined DNA vaccines formulated either in DDA or in saline protect cattle from *Mycobacterium bovis* infection. *Vaccine*. (2005) Jun 10;23(30):3887-95. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.03.025. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15917109.
83. Barba, Jeannette & Flores-Valdez, Mario Alberto & Aceves-Sánchez, Michel & C., Pacheco-Gallardo & Alvarez, Angel & Aguilar, Delia. (2013). A DNA vaccine containing PPE68 induces humoral response in cattle. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, The. 11. 96.
84. Alfonseca Silva, E., Hernández Pando, R., Gutiérrez Pabello, J. Á. G., & Cataldi, Á. (2013). *Gen de la invasina mce2a de mycobacterium bovis: su expresión in vitro e in vivo, generación y evaluación de una vacuna mutante (mce2a), proteína recombinante (mce2ar) y herramienta de diagnóstico para la tuberculosis* (Tesis Doctoral), D.F., México.
85. Espinosa Alaniz, A. U., Jaramillo Meza, L., Pérez González, R., & Díaz Otero, F. (2008). *Evaluación de la vacuna BCG PHIPPS recombinante en becerras recién nacidas en un hato con prevalencia alta en tuberculosis* (Tesis), Edo de México, México.



86. Martin, Carlos & Aguilo, Nacho & Gonzalo-Asensio, Jesus. (2018). Vacunación frente a tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 36. 10.1016/j.eimc.2018.02.006.
87. Ortiz Covarrubias MA. (2011). Albert Calmette y la vacuna BCG. *Pediatría de México* Vol. 13 Núm. 2. Disponible en: <https://historiadelaveterinaria.es/wp-content/uploads/Camille-Guerin-y-la-BCG.pdf>
88. Carrizo-Chuecos, Juan Tercero. (2011). Nuevas vacunas de BCG. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 74(3), 127-134. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492011000300009&lng=es&tlng=es.
89. Comité Asesor de Vacunas (CAV-AEP). Tuberculosis. BCG. Manual de vacunas en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; ene/2021. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/cap-40>
90. López, Francisco Javier Usos y efectos del bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (vacunación con BCG). *Salud Pública de México*. 1997; 39(2):156-161. [Fecha de Consulta 12 de Julio de 2021]. ISSN: 0036-3634. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10639212>
91. Behr M. A. (2002). BCG--different strains, different vaccines?. *The Lancet. Infectious diseases*, 2(2), 86–92. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00182-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00182-2)
92. Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*.



Journal of bacteriology, 178(5), 1274–1282. <https://doi.org/10.1128/jb.178.5.1274-1282.1996>

93. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol.* 1999 May;32(3):643-55. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01383.x. PMID: 10320585.
94. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, et al. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 2004; 51(2):359-370. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03844.x
95. Tsungda Hsu, Suzanne M. Hingley-Wilson, Bing Chen, Mei Chen, Annie Z. Dai, Paul M. Morin, Carolyn B. Marks, Jeevan Padiyar, Celia Goulding, Mari Gingery, David Eisenberg, Robert G. Russell, Steven C. Derrick, Frank M. Collins, Sheldon L. Morris, C. Harold King, William R. Jacobs. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette–Guérin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Oct 2003, 100 (21) 12420-12425; DOI: 10.1073/pnas.1635213100
96. Behr M, Wilson M, Gill W, Salamon H, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DN *Science*, 1999. Vol 284: 1520-1523
97. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, García-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Nuñez García J, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST (2007). Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(13): 5596-5601. Disponible en: <http://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>



98. Zhang W, Zhang Y, Zheng H, Pan Y, Liu H, Du P, Wan L, Liu J, Zhu B, Zhao G, Chen Ch, Wan K (2013). Genome Sequencing and Analysis of BCG Vaccine Strains. PLoS ONE. 8(8):e71243. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071243>
99. Abdallah AM, Behr MA. (2017) Evolution and Strain Variation in BCG. Adv Exp Med Biol. 2017;1019:155-169. doi: 10.1007/978-3-319-64371-7_8. PMID: 29116634.
100. Bottai, D., & Brosch, R. (2016). The BCG Strain Pool: Diversity Matters. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(2), 201–203. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.18>
101. Abdallah, A., Hill-Cawthorne, G., Otto, T. *et al.* (2015) Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep* 5, 15443.
102. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine*. 2003 Oct 1;21(27-30):4270-4. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00484-5. PMID: 14505909.
103. Okkels LM, Brock I, Follmann F, Agger EM, Arend SM, T. H. M. Ottenhoff THM, Oftung F, Rosenkrands I, Andersen P (2003). PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of Mycobacterium tuberculosis: strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. *Infect. Immun.* 71(11):6116-6123. Disponible en: <http://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6116-6123.2003>
104. Joung, S. M., & Ryoo, S. (2013). BCG vaccine in Korea. *Clinical and experimental vaccine research*, 2(2), 83–91. <https://doi.org/10.7774/cevr.2013.2.2.83>



105. da Costa AC, Nogueira SV, Kipnis A and Junqueira-Kipnis AP (2014) Recombinant BCG: innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting memory. *Front. Immunol.* 5:152. doi: 10.3389/fimmu.2014.00152
106. Castillo-Rodal, A. I., Castañón-Arreola, M., Hernández-Pando, R., Calva, J. J., Sada-Díaz, E., & López-Vidal, Y. (2006). Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infection and immunity*, 74(3), 1718–1724. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1718-1724.2006>
107. Zhang, L., Ru, H. W., Chen, F. Z., Jin, C. Y., Sun, R. F., Fan, X. Y., Guo, M., Mai, J. T., Xu, W. X., Lin, Q. X., & Liu, J. (2016). Variable Virulence and Efficacy of BCG Vaccine Strains in Mice and Correlation With Genome Polymorphisms. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(2), 398–405. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.216>
108. Castillo Rodal, Antonia Isabel. (2003). "Comparación de la capacidad protectora de seis subcepas de M Bovis BCG en el modelo Murino de tuberculosis pulmonar". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/76082>
109. Balseiro A. (18 jun 2020) Tuberculosis, epidemiología y control en Europa [Webinar]. UPAEP. <https://www.facebook.com/medicinaveterinariaupaepuebla/posts/3341064819260481/>
110. Enticott, G. (2008). The Spaces of Biosecurity: Prescribing and Negotiating Solutions to Bovine Tuberculosis. *Environment and Planning A: Economy and Space*, 40(7), 1568–1582. <https://doi.org/10.1068/a40304>



111. Soberanis Ramos, O. (2016) Tuberculosis por Mycobacterium bovis en humanos, bovinos y caninos, un problema de Salud Publica en México. Memorias de la Academia Veterinaria, A.C., disponible en: [http://www.academiaveterinariamexicana.com.mx/PDF/07Publicaciones/K MEMORIAS 2016.pdf#page=53](http://www.academiaveterinariamexicana.com.mx/PDF/07Publicaciones/K_MEMORIAS_2016.pdf#page=53)
112. Baraitareanu S. & Vidu L. (2020). Dairy Farms Biosecurity to Protect against Infectious Diseases and Antibiotics Overuse, Antimicrobial Resistance - A One Health Perspective, Mihai Mareş, Swee Hua Erin Lim, Kok-Song Lai and Romeo-Teodor Cristina, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.93200. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/antimicrobial-resistance-a-one-health-perspective/dairy-farms-biosecurity-to-protect-against-infectious-diseases-and-antibiotics-overuse>
113. Reyes Hernandez, P., (S.F) TUBERCULOSIS BOVINA: LA IMPORTANCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LA INTRODUCCIÓN Y EXPOSICIÓN-DISEMINACIÓN DE M. BOVIS EN EL REBAÑO BOVINO (tesis de doctorado), Chile.
114. Calleja Ramos, A. (2016). Bioseguridad en las Granjas de Producción de Leche de vaca. PRODUCCION ANIMAL 294. Disponible en: [http://oa.upm.es/40202/1/INVE MEM 2016 217242.pdf](http://oa.upm.es/40202/1/INVE_MEM_2016_217242.pdf)
115. Arango Peña, M., & Manzano Cañas, J. C. asesor. (2005). *Bioseguridad en explotaciones bovinas (revisión bibliográfica)*.
116. Sibley, R. (2010). Biosecurity in the dairy herd. *In practice*, 32, 274-280. doi: 10.1136/inp.c3913



117. Koleci, X., Quinn, P. J., Çela, M., & Malaj, Z. (2007). The place of disinfection in the control of infectious diseases. *Albanian J Nat Tech Sci*, 12, 139-156.
118. Scanlon, M. and Quinn, P. (2000), Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 854-861. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01190.x>
119. Díaz Otero F., Jaramillo Meza L., Manzo Sandoval A., (2020) Guía para el mejoramiento sanitario y bioseguridad en el control de la tuberculosis, Folleto Técnico INIFAP, CENID SAI.
120. Ambriz Barajas, M. T. D. J., & Juan José Pérez Rivero Cruz Y Celis. (2014). *Manual para el control de fauna nociva como una herramienta de la bioseguridad para la salud animal y la salud pública* (Tesis de Maestría), D.F., México.
121. Santos N, Santos C, Valente T, Gortázar C, Almeida V, Correia-Neves M (2015) Widespread Environmental Contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revealed by a Molecular Detection Protocol. *PLoS ONE* 10(11): e0142079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142079>
122. Garro C, Bresky F., Garbaccio S., Abdala A. & Paolicchi F. (23 Oct 2020) Tuberculosis bovina Epidemiología, diagnóstico y control [Webinar]. Ciclo de charlas de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario del INTA disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=2NkiZ2YyUqk&t=4514s&ab_channel=INTABalcarce
123. Phillips, C., Foster, C., Morris, P., & Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in veterinary science*, 74, 1-15. doi: [10.1016/S0034-5288\(02\)00145-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00145-5)



124. Garbaccio, S. (2018). Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis bovina en bovinos reactivos positivos a la prueba tuberculínica. *Revista De Investigaciones Agropecuarias*, 44(1), 69-75. Consultado de <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ria/article/view/9536>
125. Tomazic, M. L., Celi Castillo, A. B., Garro, C. J., & Garbaccio, S. G. (2019). Detección de mycobacterium bovis en leche bovina a través de bacteriología y PCR.
126. Torres P., Kistermann J. C., Venditti N & Casan A. ESTUDIO DE UN CASO: ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN UN TAMBO DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES (2016). SNS N° 10, mayo-octubre. ISSN 2314-2901. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_leche/129-Tuberculosis.pdf
127. Godden S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 24(1), 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
128. Jaramillo Meza L., Fernando Díaz Otero F., Milián Suazo F., Hernández Andrade L., Mejía Estrada F., Barradas Peña F. (2015). TUBERCULOSIS BOVINA EN LAS CUENCAS LECHERAS DE MÉXICO en SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA GANADERÍA LECHERA EN MÉXICO. INIFAP-SAGARPA.
129. World Health Organization (2013) Expert Committee on Biological Standardization, Sixty second report: Recommendations to assure de quality, safety and efficacy of BCG vaccines. WHO Technical Report Series No. 979. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/89156/9789241209793_eng.pdf?ua=1



130. Estrada Chávez, Ciro, & Mancilla, Raúl, & Arriaga Díaz, Camila, & Pérez González, Rafael, & Díaz Otero, Fernando (2001). Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México*, 32(3),207-211. ISSN: 0301-5092. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42332307>
131. Rothel, J. S., Jones, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., & Wood, P. R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian veterinary journal*, 67(4), 134–137. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1990.tb07730.x>
132. Thoen C, Lobue P, de Kantor I (2006). The important of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet. Microbiol.* 112(2-4):339-345. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.047>
133. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR (2010). Bovine Tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 57(4):205–220.
134. Buddle BM, Pollock JM, Skinner MA, Wedlock DN. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int J Parasitol.* 2003; 33(5-6):555-66. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00060-2.
135. Buddle B. M. (2010). Tuberculosis vaccines for cattle: the way forward. *Expert review of vaccines*, 9(10), 1121–1124. Disponible en: <https://doi.org/10.1586/erv.10.112>
136. Hope C, Thom ML, Mc Aulay M, Mead E, Vordermeier MH, et al. (2011) Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin. Vaccine Immunol.* 18:373-379.

137. Good M, Duignan A (2011). Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Vet. Med. Int.* 2011 (2011): 410470
138. Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM, Wedlock DN. (2013) Subcutaneous administration of a 10-fold-lower dose of a commercial human tuberculosis vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Danish, induced levels of protection against bovine tuberculosis and responses in the tuberculin intradermal test similar to those induced by a standard cattle dose. *Clin.Vaccine Immunol.* 20(10):1559-1562. <https://doi.org/10.1128/CVI.00435-13>
139. Carrique-Mas JJ, Medley GF, Green LE. Riesgos de tuberculosis bovina en granjas de ganado británicas repobladas después de la epidemia de fiebre aftosa de 2001. *Prev Vet Med.* 2008; 84: 85–93. pmid: 18164499
140. Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* 2003; 74:1-15.
141. Favila-Humara, Lucia del Carmen, Santillán-Flores, Marco Antonio, Martínez-Serrano, María Guadalupe, & Morales-Álvarez, José Francisco. (2021). Meningoencefalitis causada por *Mycobacterium bovis* en un ternero. Reporte de caso. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(1), e19498. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i1.19498>
142. Vural SA, Tunca R. 2001. Generalized tuberculosis in a 45-day-old calf. *Deut Tierarztl Woch* 108: 468-70
143. Ozyigit MO, Senturk S, Akkoc A. 2007. Suspected congenital generalized tuberculosis in a newborn calf. *Vet Rec* 160: 307-308. doi: 10.1136/vr.160.9.307
144. López-Valencia G, Rentería-Evangelista T, Williams JJ, Licea-Navarro A, Mora-Valle AL, Medina-Basurto G (2010). Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium*

- bovis BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 88(1):44-49.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.022>
145. Ameni G, Vordermeier M, Aseffa A, Young DB, Hewinson RG (2010). Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(10):1533-1538.
<http://doi.org/10.1128/CVI.00222-10>
146. Retamal, P, Ábalos, P, Alegría-Morán, R, et al. Vaccination of Holstein heifers with *Mycobacterium bovis* BCG strain induces protection against bovine tuberculosis and higher milk production yields in a natural transmission setting. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 00: 1– 7. <https://doi.org/10.1111/tbed.14108>
147. Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):20–30.
148. Whelan AO, Coad M, Upadhyay BL, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM (2011). Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitization and protective immunity in cattle. *Vaccine.* 29(33):5453–5458
149. Buddle BM, Shu D, Parlane NA, Subharat S, Heiser A, Hewinson RG, Vordermeier HM, Wedlock DN (2016). Vaccination of cattle with a high dose of BCG vaccine 3 weeks after experimental infection with *Mycobacterium bovis* increased the inflammatory response, but not tuberculous pathology. *Tuberculosis (Edinb).* 99:120-127.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.05.004>
150. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995;13:1123–1130.

151. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun* 1998;66(2):5743–5750



10. Índice de figuras

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figura 1 Pared celular de las micobacterias.</i> | 6 |
| <i>Figura 2 Respuesta inmune inducida por el BCG.</i> | 16 |
| <i>Figura 3 representación esquemática de la prueba del interferón gamma.</i> | 18 |
| <i>Figura 4 Fase de sensibilización de la HDT.</i> | 22 |
| <i>Figura 5 Fase efectora de la HDT.</i> | 23 |
| <i>Figura 6 Vacunas contra la tuberculosis en ensayos clínicos.</i> | 27 |
| <i>Figura 7 Genealogía de las subcepas del BCG.</i> | 34 |
| <i>Figura 8 Cuenca lechera de Tizayuca, estado de Hidalgo.</i> | 45 |
| <i>Figura 9 Establos B y C.</i> | 47 |
| <i>Figura 10 Diseño experimental para el análisis de la eficacia vacunal del BCG Phipps.</i> | 48 |
| <i>Figura 11 Prueba de la tuberculina cervical comparativa.</i> | 49 |
| <i>Figura 12 Grafica para la interpretación de la prueba cervical comparativa.</i> | 50 |
| <i>Figura 13 Obtención de la vacuna BCG-Phipps.</i> | 52 |
| <i>Figura 14 Prevalencia de TBb por prueba cervical comparativa en los establos de recría.</i> | 59 |
| <i>Figura 15 Determinación de niveles individuales de anticuerpos en las becerras de los establos de recría por ELISA, empleando el CFPE de M. bovis, previo a la vacunación.</i> | 60 |
| <i>Figura 16 Determinación de niveles individuales de anticuerpos en las becerras de los establos de recría por ELISA, empleando el CFPE de M. avium, previo a la vacunación.</i> | 60 |
| <i>Figura 17 Establos de recría, becerras reactoras y negativas al PPD bovino después de la vacunación durante un periodo de 2 años.</i> | 62 |
| <i>Figura 18 Prevalencia inicial de TBb en el establo de producción (A), determinada por la PTCC.</i> | 63 |
| <i>Figura 19 Determinación de niveles individuales de anticuerpos en vacas en producción por ELISA, empleando el CFPE de M. bovis, previo a la vacunación.</i> | 63 |
| <i>Figura 20 Determinación de niveles individuales de anticuerpos en vacas en producción por ELISA, empleando el CFPE de M. avium, previo a la vacunación.</i> | 64 |
| <i>Figura 21 Comparación de la prevalencia de TBb en vacas del establo en producción (A) en los años 2017, 2019 y 2020.</i> | 65 |
| <i>Figura 22 Grafico del promedio de producción de IFN-γ en los animales del grupo vacunado con BCG-Phipps 1×10^5 UFC y del grupo control.</i> | 66 |
| <i>Figura 23 Grafico del promedio de niveles de anticuerpos IgG en los animales del grupo vacunado con BCG-Phipps 1×10^5 UFC y del grupo control.</i> | 67 |