



**Universidad Nacional  
Autónoma de México**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Diseño experimental de un sistema de captura de anticuerpos  
circulantes en suero de bovinos naturalmente expuestos a *M.  
bovis* con los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33.**

Tesis

**Que para obtener el título de  
Médico Veterinario Zootecnista**

**Presenta**

Juan José Almontes Beltrán

Asesores

**MVZ Esp MC PhD Edgar Alfonseca Silva**

**MVZ Post PhD PhD MC Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar**

**MVZ MC Ana Delia Rodríguez Cortez**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Septiembre 2022.**



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.

---

## Dedicatorias

A mis padres, familiares, amigos, profesores y maestros. Por su cariño, confianza, lealtad y sobre todo generosidad.

A mi madre Enaine Beltrán quien durante su vida llenó de esperanza, sueños y anhelos mi trayecto académico, me brindó sabiduría conocimiento, principios y valores para luchar con los embates de la vida, uno de ellos su partida, a quien le estaré profundamente agradecido hasta volvernos a ver.

A mi padre Pedro Almontes que ha batallado por sacarme adelante, a quien le dedicó y reconozco los últimos trayectos que tuve vivir para concluir mi tesis, aunque le faltará mano dura en sus palabras de aliento hacía mí lo llevo en el corazón, por todas sus enseñanzas y más importante por guiarme en la vida del ser hombre. Más aún por haberse casado con mi madre, quienes quizá no hubiesen navegado tanto sin su último hijo o el más consentido.

A mi hermano Miguel y Mayra, que me han apoyado moralmente en todas las decisiones buenas y malas. En especial mención a mis sobrinos Luis, Oscar, Renesmy y Edson, que, aunque quizá deseen un primo con quien convivir, se ve lejano.

A mis familiares, que me apoyaron y jalieron las orejas cuando estaba cursando la carrera que tanto me dio vida y sentido de pertenencia al gremio de MVZ.

A mis amigos por mencionar a algunos Ana, Carlos, Priscila, Paula, Santiago, Franco, Francisco, Juan, Sofía, Ángel, Mario, León, Pablo, Oscar, María Fernanda, Citlalli, Nayan, Ximena, Vanessa, Marilyn, Viridiana, Alonso, Denisse, Raúl, José, Jorge, Yahir, Antonio, Lorena, Mariana, Andrea, Diego, Frida, Karla, Jimmy, Sergio, Natali, Enrique, Diana, Ninel, Fernando,

---

Mónica, Eugene, Gloria, Deyanira, Gabriel, Manuel, Belén, Daniel, Dafne, Paris, Roger, Itzel, Danela, Kerena, Gio, Julio, Ricardo, Elisa, María, Rocío, Ehécatl, Armando, David, Chris, Paola, Jesús, José Luis, Sintique, Stephanie, Guigui, Darinka, Valeria, Pau, Kenia, Vianey, Alejandro, Marco, Miros, Demian, Iván, Héctor, Hugo, Alejandra, Betty, Elí, Lybia, Emma, Jessica, Michelle, Rosa, Erick, Alan, Daniela, Monse, Brenda y aquellos que aunque no compartimos más tiempo los llegué a reconocer en su momento.

Y en especial mención a mis profesores y maestros, que me dan ánimos de seguir superándome.

---

## **Agradecimientos**

Aquellas personas que con sus consejos ayudaron al desarrollo de este proyecto.

A la flaca (Natali), con la que he compartido momentos desde el kínder, y me ha sabido escuchar y guiar en momentos difíciles.

A mis tutores Dr. Carlos Gutiérrez que fue una de las personas que me inspiró con su trayectoria a enfocar mi proyecto hacia la investigación, al Dr. Edgar Alfonseca que me acercó al laboratorio desde tercer semestre y me fue guiando en el desarrollo científico y académico, a la Dra. Ana Delia Rodríguez quien me apoyó cuando inicié con la tesis y me estuvo llevando al trote sobre el quehacer científico.

En especial y no menos importante mención, a los individuos por los cuales cursé tan maravillosa carrera, que me ha dotado de cualidades que a las que el humano debería de aspirar, mirar y apostar. De ellos de los que vienen grandes características que le brindan al humano eso, su humanismo. Me refiero a los animales, desde el más pequeño hasta el más desarrollado en todos los sentidos de la palabra, que sin ellos la ciencia y la tecnología no estaría a la vanguardia de las exigencias que nuestra época lo exige.

---

### ***Recursos para el proyecto***

El proyecto se realizará como parte del proyecto del Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar "Desarrollo y validación de un inmuno-ensayo multiplex para el análisis seroepidemiológico de enfermedades abortivas en ganado bovino en regiones tropicales en México" con número 247539.

Los procedimientos se realizarán como parte del proyecto CONACYT 247539 Desarrollo y validación de un inmuno-ensayo multiplex para el análisis seroepidemiológico de enfermedades abortivas en ganado bovino en regiones tropicales en México a cargo del Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar.

PAPIIT IN220615 Evaluación del efecto inmunomodulador de la vitamina D en la viabilidad de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovino.

- I. Introducción**
- II. **Revisión de literatura**
  - II. I. Importancia de la tuberculosis
  - II. II. Breve historia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)
    - II. III. Tuberculosis bovina
    - II. III. I. Situación mundial y nacional de la tuberculosis bovina
    - II. III. II. Patogenia de la tuberculosis bovina
    - II. III. III. Diagnóstico de la tuberculosis bovina.
    - II. IV. Características de los antígenos proteicos micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33.
- III. Justificación**
- IV. Hipótesis**
- V. Objetivos**
  - V. I. Objetivo general
  - V. II. Objetivos específicos
- VI. Material y métodos**
  - VI. I. Antígenos micobacterianos
  - VI. II. Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes de captura HBHA, MCE2A y PGRS33 del MTBC
  - VI. III. Procedencia de los sueros de bovinos y conejos utilizados en este estudio
  - VI. IV. Producción de sueros policlonales  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A en becerras de seis meses, procedentes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis
  - VI. V. Prueba de tuberculinización en bovinos inmunizados con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995

---

(*Mycobacterium bovis*)

VI. VI. Validación del ELISA indirecto para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis bovina

VI. VI. I. Punto de corte, Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA y MCE2A

VI. VI. II. Precisión del ELISA indirecto

VI. VI. III. Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (selectividad)

VI. VI. IV. Límite de detección del ELISA indirecto

VI. VI. V. Robustez del ELISA indirecto

VI. VI. VI. Estabilidad de la muestra ( $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A, séricos)

#### VII. **Resultados**

VII. I. Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA, MCE2A y PGRSS33 del MTBC

VII. II. Validación del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes de captura HBHA y MCE2A, para el diagnóstico de la tuberculosis bovina

VII. II. I. Punto de corte, Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA y MCE2A

VII. II. II. Precisión del ELISA indirecto

VII. II. III. Límite de detección del ELISA indirecto

VII. II. IV. Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (Selectividad)

VII. II. V. Robustez del ELISA indirecto

VII. II. VI. Estabilidad de la muestra

VII. III. Estimulación para la producción de sueros policlonales  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A del MTBC, en becerras de seis meses sin la prueba de tuberculinización,

---

procedentes de un hato certificado por SADER como libre  
de tuberculosis

VII. IV. Aplicación de la prueba de intradermorreacción  
a la tuberculina según la Norma Oficial Mexicana NOM-  
031-ZOO-1995 (*Mycobacterium bovis*), Campaña Nacional de  
erradicación contra la tuberculosis bovina

VIII. **Discusión**

IX. **Conclusiones**

X. **Recomendaciones**

XI. **Bibliografía**

XII. **Protocolos**

XIII. **Anexos**

---

## Subíndice

Portada.....	1
Dedicatorias.....	2
Agradecimientos.....	4
Recursos para el proyecto.....	5
Índice.....	6
Subíndice.....	9
Resumen.....	12
Introducción.....	15
Revisión de literatura.....	24
Importancia de la tuberculosis.....	24
Breve historia del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC).....	26
Tuberculosis bovina.....	28
Situación mundial y nacional de la tuberculosis bovina.....	29
Patogenia de la tuberculosis bovina.....	31
Diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	35
Características de los antígenos proteicos micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33.....	38
Justificación.....	41
Hipótesis.....	42
Objetivos.....	42
Objetivo General.....	42

---

Objetivos específicos.....	42
Material y Métodos.....	43
Antígenos micobacterianos.....	43
Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos recombinantes de captura HBHA, MCE2A y PGRS33.....	43
Procedencia de los sueros de bovino y conejos utilizados en este estudio.....	44
Producción de sueros policlonales $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A en becerras de seis meses, procedentes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis.....	45
Prueba de tuberculinización en bovinos inmunizados con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 ( <i>Mycobacterium bovis</i> ) .....	47
Validación del ELISA indirecto para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	47
Punto de corte, Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA y MCE2A.....	48
Precisión del ELISA indirecto.....	49
Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (selectividad).....	49
Límite de detección del ELISA indirecto.....	49
Robustez del ELISA indirecto.....	50
Estabilidad de la muestra ( $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A, séricos) .....	50
Resultados.....	51

---

Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33 del MTBC.....	51
Validación del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes de captura HBHA y MCE2A, para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.....	54
Punto de Corte.....	54
Precisión del ELISA indirecto.....	60
Límite de detección del ELISA indirecto.....	61
Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (selectividad) .....	62
Robustez del ELISA indirecto.....	63
Estabilidad de la muestra ( $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A, séricos) .....	66
Estimulación para la producción de sueros policlonales $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A del MTBC, en becerras de seis meses de edad sin la prueba de tuberculinización procedentes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis.....	67
Aplicación de la prueba de intradermorreacción a la tuberculina según la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 ( <i>Mycobacterium bovis</i> ), Campaña Nacional de erradicación contra la tuberculosis bovina.....	69
Discusión.....	70
Conclusiones.....	74
Recomendaciones.....	75
Bibliografía.....	76
Protocolos .....	86
Protocolo número uno.....	86

---

Soluciones de ensayo para el ELISA indirecto.....	90
Protocolo número dos.....	92
Plan de trabajo.....	94
Relación para inmunizar becerras, respecto a la concentración antígeno/adyuvante.....	94
Anexos.....	96
Anexo uno. Objetivos de Desarrollo Sostenible (ONU: ODS's) & La Medicina Veterinaria y Zootecnia como herramienta para su cumplimiento.....	96
Anexo dos. Enfoque Una Sola Salud.....	97

---

## Resumen

Almontes Beltrán Juan José. Diseño de un sistema de captura de anticuerpos circulantes en suero de bovinos naturalmente expuestos a *Mycobacterium bovis* con los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33. Bajo la dirección de Dr. Edgar Alfonseca Silva, Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar y MC. Ana Delia Rodríguez Cortez.

**Antecedentes:** La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad de relevancia biológica, económica y social. La innovación e investigación en todas sus áreas de intervención y prevención son necesarias para desarrollar herramientas que contribuyan a lograr su control y posterior erradicación. La NOM-031-ZOO-1995 (*M. bovis*) Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, no contempla pruebas serológicas como el ELISA en la detección de anticuerpos para el diagnóstico de la tuberculosis. Sin embargo, las pruebas serológicas son utilizadas en otros países como apoyo en los programas de control zoonosario contra la TBb.

**Justificación:** La evaluación de la respuesta humoral en la TBb es una herramienta complementaria. Los antígenos de superficie micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33 son objetivos de una respuesta mediada por anticuerpos que se producen durante la enfermedad y pueden ser útiles en el diagnóstico. La TBb requiere de un diagnóstico integral con el uso de metodologías serológicas que apoyen donde otras pruebas diagnósticas fallan en la detección de la TBb. Este estudio propone el desarrollo de un ELISA indirecto que detecte anticuerpos específicos contra los antígenos HBHA, PGRS33 y MCE2A producidos durante la infección por *M. bovis*, como una alternativa para el diagnóstico, que reduzca costos, minimice el manejo zootécnico, y arroje un resultado rápido, confiable y fácil de interpretar.

---

**Hipótesis:** Los bovinos expuestos e infectados de manera natural con *M. bovis* desarrollarán anticuerpos contra los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33. Estos antígenos podrán ser acoplados a un sistema de diagnóstico de tuberculosis bovina mediante un ELISA indirecto, y determinar la condición zoonositaria de un hato respecto a la incidencia de tuberculosis bovina.

**Objetivos:** Desarrollar, estandarizar y validar un sistema de captura de anticuerpos circulantes en suero de bovino para el diagnóstico inmunológico de tuberculosis bovina (TBb) mediante un ELISA indirecto acoplado los antígenos proteicos micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33.

**Métodos y materiales:** El desarrollo de un diseño de un sistema de diagnóstico, requiere por su naturaleza ser sujeto a varias fases de evaluación, como la estandarización de las condiciones de ensayo, validación de estas condiciones que cumpliera con los objetivos de discriminar los antígenos acoplados al sistema como son HBHA, MCE2A y PGRS33, de entre aquellos antígenos del MTBC.

En la fase de estandarización se probaron concentraciones distintas del conjugado, anticuerpos, así como placas de adsorción, las condiciones de ensayo como temperaturas de incubación fueron incorporadas a ejemplos de proyectos previos y homologadas en el laboratorio de trabajo para su posterior evaluación durante la validación de las características de desempeño del ELISA indirecto.

La fase de validación de las características de desempeño se realizó por análisis estadísticos cualitativos y cuantitativos.

**Resultados:** Por medio de un análisis de curva ROC con el software Graph Pad Prism 7®, se obtuvieron resultados de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnósticas, con el

---

antígeno HBHA de 96.67% (Se) y de 96.67% (Sp), para el antígeno MCE2A se obtuvieron 93.33%(Se) y 93.33%(Sp), respectivamente. También se evaluó la respuesta inducida por la estimulación inmunogénica con los antígenos HBHA y MCE2A en una dinámica de inmunización-respuesta-dependencia de la concentración sérica de anticuerpos policlonales  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A en terneras de seis meses de edad sin la prueba de tuberculinización durante 225 días.

**Conclusiones:** Los bovinos expuestos naturalmente a *M. bovis* en hatos libres como en hatos con prevalencia de tuberculosis bovina desarrollaron anticuerpos circulantes en suero específicos contra los antígenos HBHA y MCE2A. Estos anticuerpos son detectables por el sistema propuesto, basado en un ELISA indirecto acoplado con los antígenos HBHA y MCE2A, mostrando sensibilidades y especificidades diagnósticas por encima del 90%, lo que demuestra un sistema diagnóstico confiable y seguro para ser utilizado como herramienta complementaria y de apoyo en el diagnóstico de tuberculosis bovina.

La proteína PGRS33 no presentó cualidades ni características para ser utilizada como antígeno durante la fase de estandarización, por lo que no se incorporó en el sistema de diagnóstico propuesto en este proyecto.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis, HBHA, MCE2A, PGRS33, ELISA indirecto, Tuberculosis bovina (TBb).

---

## I. Introducción

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad que ha generado un gran impacto en la salud y economía a lo largo de la historia, afectando al hombre como a los animales. Su control y erradicación se complica por la complejidad *per se* del *Mycobacterium*, respecto a su epidemiología, falta de comprensión de los mecanismos de evasión inmunológica del *Mycobacterium tuberculosis* complex, tanto su capacidad de prevalecer en una amplia variedad de reservorios en la naturaleza como su alta adaptabilidad, variabilidad y recombinación genética ([1-5](#)).

La tuberculosis es causada por una familia de ecotipos micobacterianos conocido como *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ([6](#)); *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette and Guérin (BCG), *M. canettii*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae*, *Dassie bacillus* o llamado recientemente *M. mungi*, *Oryx bacillus* ([4-6](#)). Las micobacterias del MTBC se han diversificado e introducido a diferentes especies y ecosistemas (fenómeno conocido como especiación o divergencia evolutiva), lo que ha permitido su evolución y conservación, paralelamente con el crecimiento de las poblaciones humanas y animales ([1](#), [2](#), [4-11](#)).

La coexistencia del MTBC con el medio ambiente, así como su prevalencia en los humanos y animales donde se establece, permea en su dificultad para la erradicación mundial en todas sus manifestaciones tanto agudas como crónicas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) plantea un abordaje a la prevención, atención y erradicación de la tuberculosis en todas sus formas desde el enfoque de Una Salud (One Health) ([1-5](#) [9-20](#)).

---

*Mycobacterium bovis* se caracteriza por su pared celular conformada por ácidos micólicos, lipoarabinomananos y polisacáridos como  $\alpha$ -arabinogalactanos, características del orden de los Actinomycetales, que en conjunto con proteínas de superficie y de secreción son estructuras esenciales de la micobacteria para su virulencia, confiriéndole la capacidad de invadir, colonizar y sobrevivir al ambiente intracelular. La interacción de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4) promueve la secreción de quimiocinas y citocinas inflamatorias, que son clave en la inmunopatogénesis de la tuberculosis.

Estudios recientes de espiligotipificación en distintas cuencas y hatos lecheros nacionales destaca la incidencia de cepas virulentas de *M. bovis* ([21](#)), que han sido de interés en la vigilancia epidemiológica y de salud pública del país ([1](#), [3](#), [11](#), [20-23](#)).

La manifestación de la enfermedad tanto en humanos como en los animales, ya sea en su presentación pulmonar clínica o subclínica, extrapulmonar multiorgánica (también conocida como tuberculosis miliar), aguda, latente o crónica, desarrollada por cualquiera de las bacterias patógenas del MTBC en sí mismo es una limitante para cualquier individuo con la enfermedad. Es decir, que podría llegar a causar estragos de salud durante la vida productiva de un individuo estabulado en un hato con características extensivas/trashumantes/pastoreo y/o fines intensivos/ciclos productivos estabulados, cerrados o completos, así mismo afectar la salud de los trabajadores de los hatos ganaderos (Zoonotic Tuberculosis, zTb), principalmente en hatos con prevalencia alta de la enfermedad.

La infección inicia desde la inhalación o el contacto directo con fluidos con presencia del bacilo (se ha reportado el inicio de la infección con cargas de 10-15 bacilos viables). La

---

micobacteria va a las células bronquio-alveolares ayudándose de múltiples factores, entre ellos antígenos que se acoplan a las células epiteliales e ingresan a las mismas, para después de la internalización establecerse en el tejido infectado. El reconocimiento se da por células de tipo TH1, el macrófago inicia un proceso conocido como fagocitosis que delimita a *M. bovis* en una vesícula fagocítica que se fusiona con los lisosomas para formar la estructura conocida como fagolisosoma, que en muchas ocasiones la micobacteria evade con la ayuda de estos antígenos de naturaleza proteica. En otros casos inician un proceso inducido hacia la apoptosis del macrófago y de las células epiteliales (raramente). Una vez establecida la infección en el tejido (ya sea de tipo pulmonar o extrapulmonar), dependiendo del estado de salud que presente el hospedero, así como la virulencia de la micobacteria, la replicación micobacteriana regularmente no es focalizada, es decir, puede haber varios puntos activos donde se estableció la infección en el mismo órgano (también conocida como tuberculosis miliar). El sistema inmunológico empieza a incrementar su respuesta hacia el agente micobacteriano agresor, que en muchos casos esta misma respuesta puede ser exacerbada, el hospedero en cuestión pierde la vida por una reacción de hipersensibilidad de tipo IV ([22-29](#)).

Cuando la infección es controlada por el sistema inmunológico del hospedero, ya sea porque en el individuo infectado se activan células de memoria, que una vez reconocida la micobacteria es marcada por anticuerpos iniciando el proceso de reconocimiento antigénico por el complejo mayor de histocompatibilidad o MHC, se da la fagocitosis por el macrófago, y terminando la infección en detritus celulares y bacterianos. En este proceso se ven involucradas la respuesta

---

inmunológica celular y humoral, por lo que no hay una remodelación parénquimal resultado del proceso infeccioso. Caso contrario, cuando la infección rebasa la inmunidad celular o también llamada TH1, el proceso de reacción inmunológico se torna hacia un perfil de tipo TH2 activando los linfocitos T y formando una lesión característica provocada por este tipo de bacterias, conocidas como lesiones fibróticas-granulomatosas o granuloma ([23-27](#)).

El granuloma es la lesión caracterizada por un centro calcificado y difuso, por su composición contiene detritus celulares y bacterianos, que son delimitados por células linfocíticas, neutrófilos, macrófagos y células epitelioides a la periferia de este centro caseoso. Algunos macrófagos se fusionan formando células gigantes multinucleadas o de herradura, que son propias de este tipo de lesiones. El tamaño de estas lesiones puede variar, desde una micro lesión de 0.1mm a 1mm, o ser lesiones aparatosas de 3cm hasta los 15-20cm de diámetro. El granuloma en cuestión puede ser descrito en formación, activo y calcificado. En esta última fase del granuloma, el centro de la lesión presenta calcificaciones de tipo fibrótico-caseoso y la micobacteria se encuentra atenuada o delimitada con restos de detritus celulares y micobacterianos (hay estudios donde se han encontrado lesiones cancerígenas asociadas), la presencia de la micobacteria se comprueba por PCR y mediante tinciones histopatológicas Z-N. Cuando la micobacteria se encuentra atenuada es muy probable que se vuelva a reactivar, principalmente cuando el individuo o hato entra en contacto con enfermedades virales o compuestos inmunodepresores ([7](#), [20](#), [22-29](#)).

El problema en salud pública es su capacidad de establecerse dentro del individuo, que en pocas ocasiones va a presentar la

---

sintomatología (en humanos) o signología (en animales) aguda, menos visible en su fase crónica, perpetuándose por el tipo de pases infecciosos entre individuos, poblaciones y cepas infectantes. Complicando su atención y vigilancia epidemiológica por país, región y especie afectada.

Por ejemplo, un individuo con una cepa atenuada o de baja virulencia puede infectar a otro que nunca estuvo en contacto con la micobacteria e incluso a aquel individuo que se recuperó de una infección de carácter tuberculoso, esto es muy frecuente y retoma importancia en el cruce de fronteras, o también conocido como enfermedades transfronterizas. La vigilancia epidemiológica recae en el organismo encargado de la salud zoonosanitaria de cada país, entre países esta normatividad se hace cumplir por un organismo conocido como OMSA (fundada como OIE), que en América sus oficinas regionales reciben el nombre de OIRSA, ya que es muy frecuente que un ejemplar exportado de Argentina, Uruguay o Venezuela (países sudamericanos, con políticas de salud animal carentes o empobrecidas por las situaciones financieras, públicas o políticas) no tenga su certificado como libre de tuberculosis y/u homologar sus estatutos de salubridad del ejemplar/res, productos o subproductos entre países. Es muy frecuente que ejemplares entren a territorio Nacional y no se pida un reporte de estatus zoonosanitario o no se lleven a cabo las medidas de cuarentena y vigilancia epidemiológica por MVZ's, por lo que el individuo con las características de enfermedad e inclusive aquellos con manifestaciones subclínicas van a infectar el hato en el territorio Nacional de recepción o ser un problema de salud pública (zTb), afectando un trabajo Zoonosanitario de años, es decir, un hato que por cinco años estuvo en trámites y supervisión por SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad

---

Inocuidad y Calidad Animal, en México) para que se le constara como hato libre de tuberculosis, pierda su constancia (estatuto) como hato libre de tuberculosis (estipulado en la NOM-031-ZOO-1995), y por ende ser notificado como hato de riesgo en la Asociación Ganadera Local a la que pertenezca. Esto remarcado y plasmado por las políticas de las oficinas regionales de la OIRSA, y en México se supervisa la vigilancia epidemiológica por la SENASICA a través del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). En México la política de salubridad animal refiriéndose a la TBb esta descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-1995 Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), así como en el *Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos* publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) el 29 de Noviembre del 2018 , cumpliendo con el Código Sanitario de los Animales Terrestres y Acuáticos de la OMSA ([10](#), [11](#), [17-22](#)).

La NOM-ZOO-031-1995 Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), enumera distintas formas de abordar y evaluar la enfermedad. Las pruebas aquí descritas se orientan en la detección de la respuesta inmune celular de tipo TH1 o la prueba definitiva (de referencia o de oro) que es el aislamiento de *M. bovis* por cultivo bacteriológico. La detección de la respuesta celular TH1 por la prueba de intradermorreacción a la tuberculinización que en ocasiones llega a dejar una ventana de incertidumbre (se estima que del 20%), ya sea por los distintos factores tanto extrínsecos e intrínsecos de los individuos, la población donde convive, así como el medio ambiente que la rodea. El aislamiento por cultivo

---

de *M. bovis* es conocido como la prueba de oro, pero puede tardar días o incluso meses para aislar la cepa y dar por ratificado la presencia de *M. bovis*, esto por la presencia de otras especies del género, tanto saprófitas como patógenas o del *M. avium* subesp *paratuberculosis* MAP ([1-5](#), [9-11](#), [16](#), [19-23](#)).

El diagnóstico de la TBb es complejo, por la adecuación con otros esquemas de atención de medicina preventiva, es decir, que se acople al diagnóstico de otras enfermedades de tipo estacional, brote epidemiológico o de campaña obligatoria como es el caso de la brucelosis, rabia parálitica, entre otras. Así como equipararlo con los manejos zootécnicos del hato ganadero y lograr una medicina preventiva poblacional, de hato o individual.

Debido a lo anterior las pruebas recomendadas por la NOM-031-ZOO-1995 como la tuberculinización, el aislamiento por cultivo bacteriológico (que en muchos casos las muestras no son viables para el trabajo bacteriológico, por mala colección de las mismas, contaminación, etc.), histopatología y recientemente la prueba de detección de IFN- $\gamma$ , tienden a dejar incertidumbre en los casos con sospecha de tuberculosis ocasionada por el MTBC. Se estima que alrededor del 20% de los individuos diagnosticados por estas pruebas son falsos negativos, esto por los mismos factores extrínsecos e intrínsecos del hato poblacional sometido al muestreo. Otras pruebas recomendadas rápidas, confiables y seguras, para la detección del *M. bovis* son pruebas como el ELISA, detección del IFN- $\gamma$  (comercialmente conocido como Bovigam®), PCR punto final o PCR tiempo real, el empleo de cada una de estas pruebas en un hato o en muestras individuales, será por el tipo de muestra, el presupuesto con

---

que se disponga y el momento de la infección en que se decida realizar diagnóstico o cribado del hato.

Los sistemas diagnósticos propuestos en este proyecto, están diseñados para la diferenciación específica entre micobacterias patógenas del MTBC de las no patógenas ([4](#), [9](#), [23](#), [29-32](#)). La importancia de este proyecto es el desglose que puede tener el uso de estos antígenos inmunogénicos, ya sea por su capacidad para estimular la respuesta inmunológica, su implementación como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad en su etapa agudas, de latencia o crónica. Este sistema de diagnóstico se puede desarrollar e implementar para la vigilancia seroepidemiológica masiva y/o poblacional mediante tiras reactivas, pruebas de Snap e inclusive que los antígenos proteicos recombinantes sean candidatos en sistemas vacunales ([19-23](#), [27](#), [31-35](#)).

La búsqueda de biomarcadores presentes en la micobacteria o como resultado de su proceso infeccioso, así como aquellas estructuras proteicas o genes que se expresan en cada etapa de la infección, son de importancia para el diseño de sistemas de diagnóstico.

Este proyecto estudia tres antígenos proteicos recombinantes de la micobacteria HBHA, MCE2A y PGRS33 que ayudan a la internalización en la célula hospedadora y a la evasión del fagolisosoma, hasta llegar a un estado de latencia o atenuación.

Los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33 no se expresan en todas las micobacterias patógenas del MTBC, es decir, los antígenos mencionados posiblemente no tienen el mismo ensamble y funcionalidad en una cepa de *M. tuberculosis* donde las estructuras proteómicas (conocidos como sistema de secreción tipo VII) favorecen la síntesis y movimiento a la superficie o

---

al exterior de la micobacteria, en comparación con una *micobacteria* ambiental o *M. mungi* que no expresan ni ensamblan estas estructuras proteómicas que le confieren la virulencia o patogenicidad a la cepa infectante, esto para el caso del antígeno PGRS33 que se encuentra fragmentado en el citoplasma, membrana celular y como proteína soluble.

El antígeno proteico MCE2A se encuentra en el espacio citoplasmático como integrina de la membrana citoplasmática, así como transportador hacia el espacio periplásmico de otras proteínas y al espacio extracelular.

El antígeno proteico HBHA tiene función de adhesina, que forma cúmulos de lípidos en el espacio citosólico, así como en la membrana citoplasmática para auto agregarse con otras micobacterias o adherirse a receptores membranales de células epiteliales para facilitar la entrada y colonización en el tejido de infección ([34-41,44](#)).

Incluso en la misma especie de micobacterias, estos antígenos proteicos que le confieren la virulencia al microorganismo pueden no tener la misma función que en una bacteria con los factores de virulencia altamente expresados y/o co-expresados. Ejemplo de esto son las proteínas PE, PPE y PGRS donde los genes que la codifican conforman del 5 al 10% del genoma de la micobacteria, pero PGRS33 solo se expresa en cepas patógenas del MTBC ([36, 44, 45](#)).

El papel de la respuesta humoral en la tuberculosis se ha cuestionado durante mucho tiempo, entre que, si es una respuesta protectora o no, durante el proceso infeccioso. Estudios recientes han aportado pruebas contundentes sobre el papel de los anticuerpos en las infecciones por especies del MTBC. Por lo tanto, los antígenos de superficie HBHA, MCE2A y PGRS33 pueden ser el objetivo de una respuesta inmune mediada por anticuerpos potencialmente protectora contra la TBb y estos

---

anticuerpos pueden ser detectados en sistemas de captura, como un ELISA, para el diagnóstico de la Tb, TBb y zTb.

---

## II. Revisión de literatura

### II. I. Importancia de la tuberculosis

Desde 1997 hasta el 2020, en el mundo se enfermaron 10 millones de personas de Tb (incluyendo 214 mil con VIH) de estas, aproximadamente 90% son adultos, 5.6 millones hombres, 3.3 millones de mujeres y 1.1 millones niños ([1](#), [2](#)).

Uno punto cinco millones de estas personas murieron a causa de la Tb, un millón de personas se infectaron con cepas de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos (también conocidas como Multidrogo Resistentes o MDR por sus siglas en inglés, Multidrug Resistance). La Tb es la décimo tercera causa de muerte por infección de patógenos a nivel mundial, por encima del VIH/SIDA ([1](#), [4](#), [5](#)).

En 2015 los líderes mundiales pertenecientes a la OMS y a la Organización de las Naciones Unidas (ONU), se reunieron para abordar la situación de la tuberculosis a nivel mundial integrando este problema a las metas de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS's), en lo particular al ODS 3 Salud y Bienestar, que garantiza una vida sana y la promoción del bienestar en todas las personas ([Anexo 1](#)) ([1](#), [12-19](#)).

En la producción de animales para abasto, la tuberculosis causa principalmente un bajo rendimiento en los parámetros productivos de las especies domésticas afectadas, decomisos y candados zoonosológicos en el comercio nacional e internacional, reflejado en las producciones que no siguen la Normatividad local, nacional o internacional ([1-4](#), [11](#), [45](#)). Las técnicas de diagnóstico, tratamientos e inmunización existentes se remontan a más de un siglo desde el descubrimiento del agente causal de la tuberculosis y de la vacuna BCG (la vacuna BCG, solo está disponible para uso en humanos) ([1](#)).

---

La tuberculosis es una zoonosis global representando una amenaza para el equilibrio de los ecosistemas y las interacciones humano-animal-medio ambiente. Ejemplo de esto, son los sistemas trashumantes de pastoreo donde el ganado va a puntos de agua y/o alimento donde converge fauna silvestre infectada, con la enfermedad persistente o en su etapa subclínica (así como de hospedadores tipo reservorios de la enfermedad) ([4](#), [5](#), [11](#), [19](#), [20](#), [28](#), [46-50](#)). Se ha sugerido un abordaje al problema desde la visión de Una Salud ([Anexo 2](#)), con equipos de trabajo interdisciplinarios, haciendo participe a las localidades en esta visión para asegurar un futuro sostenible en lo económico, cultural, alimenticio y de salud ([2-5](#), [10](#), [11](#), [16](#), [17](#), [19](#), [20](#)).

La transmisión de *M. bovis* de animales a humano, tuberculosis zoonótica, en muchas ocasiones se encuentra subestimada, principalmente en países en vías de desarrollo ([4](#), [9](#), [11](#), [23](#), [46-50](#)).

La Tb de origen animal (zTb) está directamente relacionada a la prevalencia de TBb presente en determinado país, región o localidad. Esto se debe a la falta de políticas públicas oficiales que incluyan y lleven los programas de pasteurización de la leche a las localidades rurales, programas de control y erradicación de la tuberculosis, así como el cumplimiento de compromisos por parte de los distintos sectores afectados ([2](#), [3](#), [9](#), [11](#), [23](#), [51](#)).

Esta enfermedad es ejemplo de enfermedades reemergentes en el mundo según la OMSA, la tuberculosis plantea un problema sin solución clara. Buscar estrategias para un monitoreo constante como la implementación de centinelas en fauna silvestre para su seguimiento epidemiológico, así como distintas sugerencias enmarcadas y subrayadas en el ODS 3 de los 16 Objetivos de

---

Desarrollo Sostenible de la ONU a cumplirse para el 2030 ([12-19](#), [52](#)).

## **II. II. Breve historia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC)**

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) está formado por una familia de ecotipos de micobacterias ([6](#), [9](#), [30](#)); *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette and Guérin (BCG), *M. canettii*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. caprae*, *Oryx bacillus*, *Dassie bacillus* o recientemente renombrado *M. mungi* ([7-11](#)).

El MTBC es caracterizado por tener un nivel del 99.9% de similitud entre nucleótidos, secuencias de 16S rRNA virtualmente idénticas, y originado a partir de un ancestro común ([7-9](#)).

Las micobacterias más estudiadas del MTBC son *M. tuberculosis* y *M. bovis* descendientes de un grupo de bacilos tuberculosos ancestrales denominados *Mycobacterium prototuberculosis*, un pequeño grupo de micobacterias de baja patogenicidad, caracterizadas por su amplia propiedad de ganar resistencia a antibióticos y su capacidad de transmisibilidad debido a su trasfondo genético y evolutivo ([8-11](#)).

Anteriormente, se pensaba que la tuberculosis se desarrolló en animales y pasó al ser humano, después se demostró que fue a partir de cepas de humanos el desarrollo de la enfermedad en animales ([7](#), [9](#), [30](#)), por ende, se dio un proceso de especiación conocido como ecotipos de Cohan hasta el punto de diferenciarse de sus parientes más cercanos los actinomicetos y posteriormente formar las micobacterias del MTBC ([6](#), [9](#), [30](#)).

El ancestro común del MTBC emergió hace 40,000 años en el Este de África, el mismo periodo en que el humano se distribuyó en el continente. Seguido a esto hace aproximadamente 10,000-

---

20,000 años hubo una separación radial de dos grandes linajes micobacterianos, uno que afecta a los humanos y otro que afecta a los animales ([9](#), [23](#), [30](#)).

Hace 13,000 años en la región del creciente fértil de Mesopotamia (actualmente la región de oriente medio), se establecieron las primeras comunidades humanas dedicadas a la agricultura y ganadería, actividades que sirvieron para el nacimiento de las civilizaciones y su expansión demográfica ([51-54](#)). Coincidente con estos sucesos las vacas y las cabras fueron las primeras especies en ser domesticadas, la domesticación del *Ox uro* Salvaje (*Bos primigenius*) dio origen a las dos especies de bovinos actuales: *Bos primigenius taurus* y *Bos primigenius indicus*. Este suceso de domesticación propicio la diseminación, adaptación y especialización de patógenos, 160 años atrás a la par de la revolución industrial se favoreció un crecimiento demográfico de la población humana, con esto una fuerte expansión de la ganadería, así como de los patógenos que afectan a los animales de esta actividad ([9](#), [30](#), [52-56](#)).

En algunos estudios se ha reportado el descubrimiento de lesiones sugerentes a la enfermedad de Pott en restos humanos de 3000 años de antigüedad. Dicha enfermedad se caracteriza por lesiones tuberculosas extrapulmonares, principalmente en la columna vertebral donde se confirmó la detección de bacterias del MTBC y su linaje molecular mediante pruebas de PCR ([55](#), [56](#)). Otros estudios han encontrado lesiones patognomónicas de tuberculosis en bovinos que pueden datar de la era de hielo ([57](#)).

Los animales de fauna silvestre, como animales domésticos que afecta *M. bovis* son amplias, sin descartar que podría afectar a la mayoría de los mamíferos, inclusive aquellos organismos no mamíferos como son aves, reptiles e inclusive insectos (la

---

infección en estos últimos poco reportada como vector de la enfermedad). Ejemplo de especies de animales infectados por las micobacterias del MTBC son: bisonte americano (*Bison bison*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), ciervo (*Cervus elaphus*), alce (*Alce alce*) cabra (*Capra hircus*), camello (*Camelus bactrianus*), perro (*Canis lupus familiaris*), gato (*Felis catus*), borrego (*Ovis aries*), zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), tejón europeo (*Meles meles*), hurón (*Putorius furo*), visón (*Lutreola vison*), elefante (*E. maximus*), rinocerontes negros (*Diceros bicornis*), cabras montañeses (*Oreamnos americanus*), ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*) primates no humanos, e incluso afectando sistemas de salud marinos como a lobos marinos dos pelos (*Arctocephalus australis*), leones marinos sudamericanos (*Otaria flavescens*) y león marino subantártico (*Arctocephalus tropicalis*), agrupándolos en tres tipos de hospedadores de mantenimiento, reservorios y finales con posibles vectores ([8](#), [9](#), [20](#), [25](#), [26](#), [28](#), [30](#), [46-50](#)), por mencionar algunas.

## **II. III. Tuberculosis bovina**

La TBb es una enfermedad de curso crónico causada por bacterias del MTBC, principalmente por las cepas de *M. bovis* ([4](#), [5](#), [11](#), [19](#), [20-23](#)).

Su alta distribución se ha consolidado debido a la actividad humana como la revolución industrialización, la ganadería intensiva, extensiva y trashumante ([9](#), [30](#)).

Algunos países de África con alta prevalencia de tuberculosis tanto en animales como en humanos, la TBb se han perpetuado debido a que existen múltiples factores de riesgo como el consumo de leche y sus subproductos sin pasteurizar, la alta incidencia de VIH/SIDA y el papel de *M. bovis* como agente co-infectante, que en muchos de los casos no es identificado correctamente, haciendo de esto un microorganismo

---

subdiagnosticado. Además, la bacteria es naturalmente resistente a isoniazida, estreptomycinina y pirazinamida antibióticos utilizados como tratamiento en la tuberculosis humana provocada por *M. tuberculosis* ([1](#), [4](#), [5](#), [9](#), [11](#), [19-21](#), [23](#), [32](#), [44-48](#)).

## **II. III. I. Situación mundial y nacional de la tuberculosis bovina**

Las bacterias del MTBC afectan el sector comercial, salud, ganadero entre otros, principalmente con los países con los que comparten frontera o acuerdos comerciales ([9](#), [23](#), [30](#), [32](#), [50](#)).

Se estima que existen más de 50 millones de bovinos infectados a nivel mundial, la enfermedad cuesta alrededor de 3 billones de dólares al año a los países que integran la OIMSA basado en reportes anuales a este organismo ([4](#), [9](#), [19](#)). En USA el Programa de Erradicación Nacional de Tuberculosis Bovina les ahorra a los productores de ganado más de 150 millones de dólares por año ([1](#), [19](#), [50](#)).

La prevalencia de TBb ha disminuido principalmente en aquellos países en donde se realiza como proceso rutinario la pasteurización de la leche con sus subproductos y cuentan con políticas de control como la de "prueba y eutanasia" de animales positivos a Tb, práctica que ha demostrado su efectividad en países desarrollados, como fue el caso del Reino Unido (UK) ([45](#)).

Por otra parte, las medidas que se han implementado de manera correcta en países en vías de desarrollo, donde la respuesta por parte de los productores con limitaciones económicas que trae consigo el esquema de prueba y eutanasia o los programas adoptados no ha sido la esperada por parte de los organismos encargados de llevar a la práctica de estos programas de

---

vigilancia epidemiológica, recordando que los productores son importantes en la continuidad o erradicación de Tuberculosis en cualquiera de sus formas.

Existe más probabilidad de contraer tuberculosis de origen bovino en aquellos países en donde los programas para el control y erradicación de la tuberculosis no existen o son ineficaces y en donde aún se consumen productos lácteos sin pasteurizar ([4](#), [9](#), [11](#)).

En varios países de Latinoamérica la Tb se considera enzoótica como en México, Argentina y Venezuela. En Brasil se considera esporádica, pero se ha estimado que alrededor del 47% de la leche en ese país se vende sin pasteurizar ([11](#), [45](#)). En la región de LATAM existe el sesgo en la información y rezago en la investigación de la interacción humano-ganado-fauna silvestre con respecto a la Tb. En el estado de California, Estados Unidos de América (USA), el queso fresco introducido posiblemente de manera ilegal y sin controles sanitarios adecuados, fue la principal fuente de infección de tuberculosis en hispanos ([9](#), [11](#), [21](#), [28](#), [35](#)). Se reporta que el 6% del total de migrantes con diagnóstico de Tb, están infectados con *M. bovis*, y esto puede estar relacionado al consumo de queso fresco o subproductos lácteos de origen mexicano que son enviados a familiares que se encuentran en USA ([9](#), [11](#), [21](#), [45-50](#)).

En México se tiene establecido un programa de control y erradicación de la tuberculosis en territorio nacional, siendo el 86.23% del territorio cubierto por la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) NOM-031-ZOO-1995, y reportándose una prevalencia de la misma del 0.5%, este programa llevado a cabo e implementado por la SENASICA organismo de la SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) ([22](#), [56](#), [57](#)).

---

Para el 2017, la producción de quesos en México fue de 236,000 toneladas, de las cuales el producto más consumido fue el queso fresco con un 17.4%, seguido del queso doble crema 15.2% y queso panela 12.8%, la importancia de esta industria recae al momento de llevar a cabo normas de salubridad o los POES, HCCP y programas de control de calidad en la elaboración de alimentos y productos lácteos regulado por las NOM-183-SCFI Y NOM-251-SSA2009. Estas Normas regulan a nivel nacional la elaboración de los productos y subproductos lácteos, que en México en promedio se reporta un 16% de prevalencia de Tb en los hatos lecheros del país ([49](#), [58](#), [59](#)).

En América Latina, México ocupa el primer lugar en tuberculosis de origen animal por *M. bovis* seguido de algunos países africanos ([23](#)). Recientemente se reportó en la meseta central mexicana el mismo espoligótipo de *M. bovis* en aislados de bovinos y de humanos en áreas conurbadas a cuencas lecheras ([21](#)).

La implementación de políticas públicas de salud relacionadas con la supervisión, control y erradicación de la tuberculosis bovina. Enfermedad de potencial riesgo para el medio ambiente, humanos y animales, siendo las producciones de lecheras y producciones cárnicas, el sector más vulnerable, así como el más afectado por las políticas públicas actuales, implementadas para el control y erradicación de la tuberculosis en la República de Mexicana ([9](#), [11](#), [23](#), [30](#), [50](#)).

## **II. III. II. Patogenia de la tuberculosis bovina**

El curso de infección de la TBb inicia desde que el animal tiene contacto con la micobacteria mediante la inhalación (transmisión directa) de gotas en aerosoles con presencia de bacilos. La bacteria interactúa con las células epiteliales del bronquiolo, ya en el bronquiolo el bacilo es fagocitado por el macrófago alveolar interactuando con células epiteliales

---

y del sistema inmune innato eliminando al microorganismo, llevándolo a una resolución rápida. Por el contrario, si la bacteria no es eliminada, los macrófagos hacen una presentación antigénica en linfonodos locales montando una respuesta celular y formación de lesiones granulomatosas en el tejido afectado. La infección también puede suceder mediante la ingestión de pastos, agua o material contaminado con el bacilo (transmisión indirecta) provocando lesiones en linfonodos mesentéricos.

La diseminación entre animales puede ocurrir principalmente por la presencia de bacilos en distintos fluidos corporales como: leche, descargas directas de la lesión, saliva, orina y semen ([29](#)). La infección congénita (infección indirecta), vertical y a través de órganos reproductivos también se ha reportado, principalmente cuando los órganos reproductivos se encuentran infectados.

Las producciones intensivas representan un mayor riesgo por el hacinamiento de los animales. Por otra parte, en el sistema extensivo, la transmisión ocurre principalmente en puntos de agua o saladeros con el riesgo de transmisión hacia la fauna nativa o viceversa ([20](#), [26](#), [58](#)).

Las lesiones características de la tuberculosis bovina es el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico de tipo granulomatoso que puede presentarse en diferentes órganos como pulmón hígado, bazo, membranas serosas, pleura, linfonodos retrofaríngeo, bronquial, mediastínico mesentéricos y hueso.

El granuloma consiste en una estructura con un centro calcificado formado por detritus celulares que es reemplazado por tejido fibrótico. En estadios tempranos se observa la presencia de micobacterias y macrófagos delimitadas por células epitelioides, linfocitos T y B. La diseminación bacteriana a partir de las lesiones primarias en bovinos se da principalmente por ductos bronquiales y linfáticos, en el caso

---

de tuberculosis miliar masiva la diseminación es heterogénea ([24-26](#)). Es aquí donde tanto el hospedero como la bacteria que se enfrentan, uno para defenderse del agente invasor y el otro por internalizarse en las células y evitar ser destruido ([27](#), [44](#), [62](#)).

El macrófago tiene un papel importante debido a que es el único capaz de montar una respuesta en contra de la micobacteria y activar a los linfocitos T. La célula fagocítica lleva al bacilo en una vacuola hasta el lisosoma para formar la fagolisosoma, iniciando un proceso de reconocimiento interno de los detritus bacterianos o antígenos. Que posteriormente el macrófago lleva a la membrana celular y lo presenta mediante el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC por sus siglas en inglés) a los linfocitos T para montar una respuesta de tipo celular caracterizada por un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  e inflamación local (linfocitos T cooperadores) o focalizada (linfocitos T citotóxicos que van a inducir la apoptosis celular), así como la presentación antigénica a linfocitos B que van a iniciar con la expansión clonal generando células de memoria y producción anticuerpos específicos contra antígenos micobacterianos que contribuyen con la eliminación del microorganismo mediante la reestructuración del parénquima celular del pulmón y desencadenar en la formación del granuloma, esta estructura es fundamental para controlar a la micobacteria y evitar la diseminación ([24-27](#), [62](#)).

El papel de la respuesta inmunológica de tipo TH2 o conocida como respuesta inmunológica humoral, se ha interpretado como una respuesta poco asociada al control y erradicación de *M. tuberculosis* o de *M. bovis* dentro de la célula y/o tejido infectado. Siendo los linfocitos T cooperadores los más estudiados al momento de establecerse la enfermedad, por otro

---

lado, los linfocitos B se ha especulado su poca participación en la respuesta inmune ante de la infección por *Mycobacterium*. Sin embargo, los linfocitos B juegan un papel importante durante las primeras fases de la infección y más aún cuando la infección se ha tornado hacia un estado latente o cuando la micobacteria entra en dormancia. La estimulación de la respuesta inmune hacia un perfil TH2 es quizá lo crucial al momento de atenuar al *Mycobacterium*, ya que siendo dos eventos importantes la de los linfocitos T reguladores y T Cooperadores CD4 para que la respuesta TH1 sea moderada y enfocada hacia el *Mycobacterium*, como con los linfocitos T citotóxicos CD8 que se acoplan a las células ya infectadas. En el microambiente donde se está montando la respuesta hacia el agente infectante los linfocitos B participan como presentadores de antígenos, reguladores de la quimiotaxis e inclusive generando quimiocinas para consolidar una fase de la enfermedad ya sea en latencia, dormancia o total atenuación del *Mycobacterium*, e iniciar con la producción de los anticuerpos contra la micobacteria ([7](#), [27](#), [44](#), [63-68](#)).

La manifestación clínica de la tuberculosis es raramente observable en animales infectados, pero esta va de una presentación pulmonar a una miliar masiva (estos animales pueden tener una emaciación progresiva), algunos signos que se pueden notar es la falta de apetito, fluctuaciones en la temperatura corporal y en la forma pulmonar avanzada puede haber tos crónica, disnea y signos de un grado bajo de neumonía ([69](#)). Los animales infectados con *M. bovis* pueden no desarrollar ningún signo clínico lo mismo pasa en la presentación de tuberculosis miliar extensiva, pero el desarrollo de signos clínicos se va presentando de una manera progresiva ([24](#), [69](#)).

---

En el caso de los bovinos no existe un esquema de tratamiento con antibióticos, esto debido a que es impráctico, costoso y puede volverse un riesgo debido a que la micobacteria puede desarrollar genes resistencia a los antibióticos, como es el caso de las MDR-TB (multidrug resistance tuberculosis, micobacterias resistentes a isoniazida), MDR/RR-TB (Multidrug Resistance to Rifampicin tuberculosis, tuberculosis resistentes a rifampicina) y XDR-TB (Tuberculosis resistente a rifampicina más fluoroquinolona y linezolid) ([1](#), [4](#), [5](#)).

### **II. III. III. Diagnóstico de la tuberculosis bovina**

La Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), mencionan el aislamiento del *M. bovis* como prueba diagnóstica concisa e irrefutable, otros métodos de diagnóstico de la tuberculosis bovina son la prueba de intradermorreacción o tuberculinización, ya sea en el pliegue ano-caudal, cervical simple o cervical doble comparativa, en esta prueba se utiliza como antígeno de aplicación el Derivado Proteico Purificado (PPD) a partir de un cultivo de *M. bovis* cepa AN5, en caso de ser cervical doble comparativa se aplica PPD de *M. avium* subesp *paratuberculosis* (MAP) a un lado del PPD bovino. La tuberculinización es universalmente usada y acoplada a la mayoría de los programas para el control de la TBb. En esta prueba se inyecta el PPD de forma intradérmica para observar una reacción de hipersensibilidad retardada 72 horas post inoculación. Otras pruebas utilizadas son estudios histopatológicos y el cultivo bacteriológico del microorganismo. Tanto la OMSA y la NOM-031-ZOO-1995 recomiendan otras alternativas complementarias como los ensayos de producción de IFN- $\gamma$ , técnicas moleculares como PCR y espoligotipificación ([19](#), [21](#), [22](#), [58](#)).

---

Algunos métodos utilizados para el diagnóstico de la TBb se pueden ver opacados por la incapacidad de diferenciar entre bacterias del MTBC, estados latentes de la enfermedad y la anergia que se puede generar por la presencia de micobacterias ambientales o errores técnicos, e incluso la heterogeneidad en el punto de corte de las pruebas que varía entre países y/o regiones ([5](#), [9](#), [23](#), [70](#)). El diagnóstico *post mortem* es una herramienta importante en la vigilancia epidemiológica, se realiza principalmente en la inspección de las carcasas en el matadero, requiere de instalaciones adecuadas, protocolos de bioseguridad y personal altamente capacitado que en países de bajos recursos son escasos ([22](#), [23](#), [46](#), [62](#)). La observación directa del bacilo mediante microscopia con la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) a partir de muestras de fluidos o por histopatología de lesiones macroscópicas del órgano infectado, son técnicas baratas, rápidas y funcional para un diagnóstico preliminar que puede ser utilizada en países de bajos recursos. El cultivo microbiológico es considerado como el estándar de oro para la detección de las micobacterias, es importante realizar el cultivo de animales reactivos a la tuberculina, o con presencia de lesiones tuberculosas, el principal medio de cultivo para *M. bovis* es Stonebrink piruvato sódico (originalmente Löwenstein-Jensen para *M. tuberculosis*). La prueba de intradermorreacción tuberculinización, que se realiza en el animal y la prueba de producción de IFN- $\gamma$ , que se desarrolla en el laboratorio, tienen el mismo fundamento y funcionan bajo el esquema de detección de la respuesta inmune mediada por células TH1, la primera de ellas en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, la segunda sugerida por la OMSA. Conforme transcurre el tiempo y la enfermedad se vuelve crónica, la respuesta inmune va cambiando hacia un perfil TH2 caracterizada por la producción de anticuerpos por parte de

---

los linfocitos B. En esta etapa las pruebas como, medición del IFN- $\gamma$  y prueba de intradermorreacción a la tuberculina, no son sensibles ni específicas para detectar animales enfermos, se especula que hay un 20% de animales falsos negativos y falsos positivos que estas pruebas orientadas a la detección de la respuesta inmune mediada por células (CMI) no detectan ([51](#), [58](#)).

Esta ventana del 20-30% de incertidumbre de animales falsos positivos y falsos negativos en el diagnóstico de la tuberculosis bovina abre una oportunidad para la complementación del diagnóstico de la tuberculosis bovina como los ensayos serológicos como el ELISA indirecto propuesto en este proyecto, e incluso el desarrollo de pruebas tipo Snap. El uso de pruebas que evalúan la respuesta tipo TH2 como el ELISA indirecto es necesario para realizar test complementarios y diseños de esquemas de diagnóstico de enfermedades presentes en los hatos ganaderos. La detección de anticuerpos mediante acoplado antígenos inmunológicamente dominantes del MTBC como son MPB70, MPB83, ESAT-6, CFP10 y FTsZ en ELISA's de tipo indirecto, han arrojado variaciones de Se del 60-90% y de Sp del 80-100%.

Acoplar estas pruebas diagnósticas como un complemento en el diagnóstico de la TBb, así como en el estudio de fenómenos inmunológicos como la respuesta anamnésica (evento descrito después de la tuberculinización), basado sobre esta misma respuesta, se abre una posibilidad hacia el uso de los antígenos proteicos como HBHA, MCE2A y PGRS33 en uso como vacuna y/o inmunoestimulante. Ejemplo de esto, la vacunación con la cepa BCG como coadyuvante en el combate contra la enfermedad provocada por el COVID-19 produce una respuesta en el incremento de anticuerpos así como de células inflamatorias en lavados bronquio-alveolares en cuyos retados con la cepa

---

H37Rv e inmunizados a las 2-4 semanas, mismo efecto se produce después de la prueba de tuberculinización en concentraciones séricas de anticuerpos contra distintos antígenos del MTBC como ESAT-6, CFP-10, MPB70, MPB83 y FTsZ ([26](#), [27](#), [31-34](#), [39](#), [64](#), [70](#), [71](#)).

## **II. IV. Características de los antígenos proteicos micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33**

Las micobacterias del MTBC se caracterizan por presentar proteínas asociadas a su pared celular involucradas en la invasión, adhesión y colonización de células epiteliales, estructurales y fagocíticas del huésped. Estas proteínas reciben su nombre como HBHA (Heparin-Binding Hemagglutinin o Hemagglutinina ligada a heparina), PE\_PGRS33 (Polymorphic GC-rich sequence o Secuencias polimórficas ricas en GC, siendo estas proteínas una subfamilia de la familia de genes *pe* y *ppe*) y MCE2A (por su significado en inglés Mammalian Cell Entry, los genes *mce* están agrupados en operones que recibe su nombre por su función en la internalización de las micobacterias a células de mamíferos).

Los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33 han sido estudiado bajo distintas condiciones, desde identificarlos, aislarlos, evaluar su funcionalidad y sobre todo sus características inmunogénicas para ser acoplados a sistemas de diagnóstico serológicos, así como posibles candidatos vacunales.

La familia de genes *pe/ppe* forman parte de dos grandes familias de genes que ocupan del 5 al 10% en la codificación del genoma completo de *M. tuberculosis*. Las secuencias polimórficas de genes repetitivos se asocian a la virulencia, lento crecimiento en cultivo y patogenicidad de las micobacterias. Basado en la presencia de secuencias de aminoácidos repetitivos conservados en su estructura Pro-Glu (*pe*) y Pro-Pro-Glu (*ppe*) en la porción

---

N terminal de estas proteínas de superficie de la micobacteria, los genes que las codifican reciben el nombre de *pe* y *ppe*. La familia de proteínas PE\_PGRS se caracteriza por la alta presencia de dominios polimórficos con repeticiones de aminoácidos Gly-Gly-Ala/Gly-Gly-Asp. La familia de genes *pe*, *ppe* y *pgrs* codifican para proteínas con el mismo nombre PE, PPE y PGRS, con variabilidad proteómica presente en la superficie celular. Aunque se ha estudiado que estas proteínas se encuentran fragmentadas en tres sitios celulares del citoplasma, membrana celular, espacio periplásmico y pared bacteriana. Acoplándose al sistema de secreción tipo VII y activación de otros antígenos de la micobacteria que participan en la estrategia de evasión del sistema inmune y la colonización de tejidos. También se ha descrito la interacción con el receptor TLR2 de macrófagos, células dendríticas, así como a los receptores CD4+ y CD8+ de linfocitos T, y se asocia a eventos patogénicos como la apoptosis, necrosis, autofagia, producción de citocinas y activación celular ([35](#), [36](#), [44](#), [45](#)). La proteína HBHA (Heparin-binding Hemoagglutinin por sus siglas en inglés Hemaglutinina ligada a heparina), participa en la diseminación, adhesión y reconocimiento extracelular en células epiteliales del tejido pulmonar promoviendo la adhesión de la bacteria a células alveolares por medio de exportación de lípidos del citosol a la superficie bacteriana y en la auto agregación de la micobacteria en medios de cultivo, así como en la matriz extracelular. Esta proteína tiene un peso aproximado de 28-29 kDa, identificada por primera vez por Menozzi en 1996 ([37](#)) en suero de humanos infectados con *M. tuberculosis* donde se exagera la concentración de Inmunoglobulinas M en suero con afinidad a este antígeno y detectables en ensayos de inmunoblotting, seguido de Inmunoglobulinas G en pacientes humanos con la tuberculosis en

---

fase activa, así mismo se han descrito ciertos procesos en los cuales la inducción por parte de la proteína HBHA activa al sistema inmune en estados latentes como en estados activos por mencionar algunos, la estimulación para la producción de IFN- $\gamma$ , activación de linfocitos CD4+ y CD8+. Lo característico en el uso del antígeno proteico HBHA como marcador antigénico para el diagnóstico, es que no muestra reacción cruzada con *M. avium* subesp *paratuberculosis* ni *M. kansasii* u otra micobacteria del MTBC ([37-39](#)).

En las micobacterias patógenas se han descrito una serie de genes conformados en operones llamados *mce* (mammalian cell entry, por sus siglas en inglés), los cuales exportan proteínas que se involucran con el reconocimiento de la célula hospedadora y después en la interrupción de citocinas intracitoplasmáticas de células epiteliales como de macrófagos. El primero en reportar la presencia de estos genes fue Arruda en 1994, al insertar estos genes en una *E. coli*, que le conferían la capacidad de poder ingresar a células, así como al atenuar estos genes se veía la disminución de la virulencia de las bacterias, se ha reportado la presencia de estos genes en bacterias no pertenecientes al MTBC, pero no están asociadas a la conferencia de factores de virulencia ni patogenicidad. Los genes *mce* son característicos porque están agrupados como operones *mce* del 1-4, esta conformación es integrada por proteínas codificadas en genes llamados *yrb* EA-B con función de (integrina ya sintetizada), que agrupan a los seis genes *mce* del A-F. Los genes *mce* (1-4, A-F) sintetizan proteínas con distintas funciones como mantener la asimetría lipídica, el transporte de invasinas y adhesinas, así mismo como de adhesina e invasinas ubicadas en la superficie bacteriana, en el acarreo de invasinas y lípidos hacia el espacio periplásmico como hacia el citoplasma celular y en la

---

interferencia de la respuesta inmune, como es la señalización de la activación mitogénica de la proteína quinasa (MAPK signaling), en las vías de la degradación proteosomal, tanto como en la señalización de integrinas del citoesqueleto como de la membrana celular ([39](#), [40-43](#)).

La presencia de los antígenos proteicos micobacterianos HBHA, MCE2A y PGRS33, se ha encontrado en pacientes con tuberculosis latente o activa e interesantemente el desarrollo de anticuerpos séricos en convivientes generan anticuerpos contra estas proteínas en estados latentes y activos de la enfermedad, por lo que la innovación en sistemas de diagnóstico podría ayudar en metodologías auxiliares de programas de diagnóstico de tuberculosis ([34-46](#)), siendo necesario realizar la evaluación de posibles antígenos que sean candidatos para ser acoplados en sistemas de captura de anticuerpos presentes en suero de bovinos infectados por bacterias del complejo de MTBC. Los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33 son objetivos de estudio, para determinar su funcionamiento de la micobacteria, así como en el rol que tienen durante la internalización de la célula hospedadora e incluso su papel en la respuesta inmune del hospedero, con el fin de ser antígenos vacunales contra las bacterias del MTBC ([31-47](#)).

### **III. Justificación**

La investigación de tuberculosis va encaminada a contar con sistemas de detección capaces de identificar y diferenciar en un hato ganadero a los bovinos con la infección activa de aquellos con tuberculosis latente de aquellos que presentan un estado crónico de la enfermedad. La patogenia de la enfermedad es en sí misma, un desafío importante para la identificación de biomarcadores confiables durante el diagnóstico, la prevención y posterior erradicación de la enfermedad.

---

En la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional para la Erradicación de Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), las pruebas autorizadas y utilizadas en el territorio nacional están orientadas a la detección bacteriológica, histopatológica y de la respuesta inmune mediada por células inducida por *M. bovis*. La evaluación de la respuesta humoral contra las proteínas de superficie HBHA, MCE2A y PGRS33 de *M. bovis*, puede ser utilizada para la detección de biomarcadores de TBb. La necesidad de desarrollar un ensayo que disminuya costos y minimice el manejo zootécnico como el otorgar un resultado rápido y confiable que brinde información del panorama de salud en los hatos lecheros nacionales con relación a la Tuberculosis bovina.

#### **IV. Hipótesis**

Los bovinos expuestos e infectados de manera natural con *M. bovis* desarrollarán anticuerpos contra los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33. Estos antígenos podrán ser acoplados a un sistema de diagnóstico de tuberculosis bovina mediante un ELISA indirecto.

#### **V. Objetivos**

##### **V.I. Objetivo general**

Desarrollar un sistema de captura de anticuerpos circulantes en suero de bovino para el diagnóstico inmunológico de tuberculosis bovina mediante un ELISA indirecto acoplando los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33.

##### **V. II. Objetivos específicos**

- Estandarizar las condiciones de ensayo de los antígenos, anticuerpos y conjugado para su uso en un ELISA indirecto.
- Detectar la presencia de anticuerpos circulantes en suero de bovino contra los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33 de *M. bovis* en condición diferente con relación a la TBb, bovinos positivos

---

y negativos a la prueba de intradermorreacción tuberculinización y animales de hatos libre.

- Producir sueros policlonales en bovinos  $\alpha$ HBHA,  $\alpha$ MCE2A y  $\alpha$ PGRS33.
- Validación de las características de desempeño del ELISA indirecto para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

## **VI. Material y métodos**

### **VI. I. Antígenos micobacterianos**

Los antígenos proteicos micobacterianos recombinantes HBHA y PGRS33 fueron donadas por la Dra. Clara Espitia (Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM); el antígeno proteico recombinante MCE2A fue donado por el Dr. Edgar Alfonseca (FMVZ, UNAM).

El método de obtención de las proteínas recombinantes se realizó mediante la inserción de la información genética en un vector de expresión (plásmido), que posteriormente fue clonado en un sistema bacteriano para su producción. Se realizó una cinética de crecimiento para determinar el tiempo óptimo de inducción. La inducción de la proteína recombinante con tallo de histidina, se comprobó por inmunoblotting utilizando un anticuerpo anti-histidina. La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad a metales pesados y su concentración en las fracciones fue cuantificada por Lowry.

### **VI. II. Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes de captura HBHA, MCE2A y PGRS33 del MTBC**

En la etapa de estandarización del ensayo ELISA indirecto se utilizaron placas de 96 pozos de la marca Maxisorp® y Polisorp®, en las cuales se sensibilizó de forma independiente

---

con los antígenos proteicos HBHA, MCE2A y PGRS33 a distintas concentraciones de antígeno 0.01 µg, 0.1 µg y 1 µg por pozo, con la finalidad de determinar su adsorción la fase inorgánica.

Se utilizaron sueros policlonales αHBHA, αMCE2A y αPGRS33 producidos en conejos como Control de Calidad Positivo de Conejo (CCPc), los sueros policlonales se diluyeron a una concentración de 1/500 previamente estandarizada, a estos sueros policlonales se les determinó CCPc o de Unión Máxima (B0). Para determinar los valores de Unión Máxima (B0), por fila en placas de 96 pozos se realizaron los complejos antígeno/anticuerpo (también llamado B0), a la par en la misma placa de 96 pozos por cuadruplicado, en ausencia del sensibilizado antigénico (solo el tapizado con Albumina Sérica Bovina, BSA 1%) se evaluaría la unión inespecífica de los anticuerpos ante cualquier otro componente del ensayo, conocido esto como Uniones No Específicas (UNE).

Conjuntamente en la misma placa de 96 pozos se evaluó el conjugado Proteína G-peroxidasa de rábano (PG-HRP de la marca Biorad®), a diluciones de 1/5000, 1/10000, 1/20000 y 1/40000, la Proteína G-HRP se diluyó en PBS 1x, y como instrumento de lectura el espectrofotómetro EPOCH marca Biotek® a una longitud de onda (λ) 450nm refiriéndose a la Densidad Óptica descrito en el [Protocolo número Uno](#).

#### **VI. III. Procedencia de los sueros de bovinos y conejos utilizados en este estudio**

En una primera etapa, se utilizaron sueros de bovinos de la raza Holstein-Friesian previamente colectados en establos del Complejo Agroindustrial Tizayuca S.A. de C.V. (CAIT), ubicado en el municipio de Tizayuca municipio del estado de Hidalgo, México; así como de bovinos estabulados en un sistema de

---

producción en pastoreo semi-intensivo de la raza Limousin provenientes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis ubicado en el municipio de Tequisquiapan en el estado de Querétaro de Arteaga, México.

Se colectaron muestras de bovinos positivos a la prueba de tuberculina. Se obtuvieron n=16 PPD+ y n=16 PPD- del CAIT y n=56 muestras de bovinos libres de tuberculosis negativos a la prueba de PPD, la colecta de sangre se hizo por el sistema vacutainer® en tubos sin anticoagulante, se procedió a realizar la separación de las fases de la sangre por centrifugación a 2500rpm, se realizó la identificación de cada muestra y posterior almacenaje en congelación a -5°C, hasta su posterior evaluación.

Los sueros policlonales de conejo  $\alpha$ HBHA,  $\alpha$ MCE2A y  $\alpha$ PGRS33, se obtuvieron de estudios previos y se recibieron como donación en este proyecto, para ser usados como CCPc y Controles de Calidad de Negativo de Ensayo CCNE se recibió Suero Fetal Bovino (SFB), para el caso del Control de calidad positivo de conejo (CCPc) se utilizó a un dilución de 1/500 ya que venía de un estudio previo de hiperinmunización para la posterior obtención de anticuerpos policlonales  $\alpha$ HBHA,  $\alpha$ MCE2A y  $\alpha$ PGRS33, así como Controles de Calidad de Ensayo (CCE) denominados Blancos, que era el probar si el conjugado-sustrato-develador reaccionaban ante cualquiera otro componente del ELISA indirecto.

#### **VI. IV. Producción de sueros policlonales $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A en becerras de seis meses, procedentes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis**

Con el objetivo de obtener un suero policlonal de origen bovino que pudiera ser usado como Control de Calidad Positivo de

---

bovino (CCPb) en el ensayo, se realizaron cuatro inmunizaciones en serie, con los antígenos HBHA y MCE2A, en terneras de seis meses de edad sin prueba de tuberculina. Durante esta etapa se realizaron muestreos desde el estado basal hasta la aplicación de la prueba de intradermorreacción tuberculina con PPD bovino.

Se inmunizaron seis terneras de raza Holstein-Friesian de seis meses de edad procedentes de un hato libre de tuberculosis, ubicado en el Altiplano de México y certificado por SADER como libre de tuberculosis bovina. Independientemente, se inmunizaron tres animales por antígeno proteico, en la región toraco-vertebral dorsal zona pre-escapular, alternando el costado (lado) de aplicación por inmunización, con el fin de evaluar anormalidades antes, durante y después de cada inmunización. La concentración de antígeno por inmunización fue de 100 mg por antígeno proteico HBHA y MCE2A, en relación 1:1 con el adyuvante hidróxido de aluminio (Rehydragel HPA, Calisher®), en total se realizaron cuatro inmunizaciones en un periodo de doscientos veinticinco días. El muestreo del día cero se hizo para obtener el estado basal de anticuerpos presente en el suero de las terneras, después de la toma de muestra se realizó la primera inmunización con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A, el antígeno PGRS33 no se utilizó en esta etapa del proyecto debido a que no presentó reacción esperada en la etapa de estandarización. El día catorce se colectaron muestras de sangre para la obtención de suero y poder realizar el seguimiento de la seroconversión de anticuerpos y la segunda inmunización. Se repitió el proceso de toma de sangre para evaluación del título de anticuerpos en los días 28, 42 y 56, en este último día también se realizó la tercera inmunización. A partir del cuarto y último estímulo inmunológico se agruparon para ser esquematizados el

---

seguimiento de seroconversión los días 84, 98, 203, 211, 222 y 225. Esto plasmado en el [Protocolo Número Dos](#).

En el día 211 se realizó la cuarta inmunización, el seguimiento de la seroconversión de anticuerpos hasta el día 225 ya con la cuarta inmunización, así como con la prueba de tuberculinización 72 horas posterior a su aplicación. El proceso de obtención de anticuerpos policlonales de origen bovino se detalla en el [Protocolo Número Uno](#).

#### **VI. V. Prueba de tuberculinización en bovinos inmunizados con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM031-ZOO-1995 (*Mycobacterium bovis*)**

La aplicación de la tuberculina según la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, se realizó por un médico veterinario zootecnista autorizado por SADER ([22](#)). La finalidad de realizar la prueba de tuberculina fue determinar el tipo de respuesta inmune evocada por la aplicación subcutánea de las proteínas HBHA y MCE2A en las terneras. La tuberculinización se realizó en el pliegue ano caudal, también se realizó la prueba cervical simple en el segundo tercio de la tabla del cuello aplicando 10µg de antígeno HBHA diluido en 100 µl de PBS y 15µg de antígeno MCE2A en 100µl de PBS, detallado en el [Protocolo Número Uno](#).

#### **VI. VI. Validación del ELISA indirecto para su uso en el diagnóstico de la tuberculosis bovina**

Para realizar la validación del ELISA indirecto, se realizaron pruebas a características de desempeño por métodos estadísticos para validar el ELISA indirecto tanto cualitativamente como cuantitativamente.

---

Las características de desempeño que se evaluaron fueron precisión, selectividad, límite de detección, robustez y estabilidad de la muestra (34, 74, 75). En ninguna de las siguientes pruebas se utilizó PGRS33, ya que en la estandarización no se obtuvieron los resultados deseados.

#### **VI. VI. I. Punto de corte, Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA y MCE2A**

El punto de corte del ensayo se refiere a la discrepancia en una determinación analítica matemático-estadístico, en términos cuantitativos con respecto a la media, la desviación estándar, cuartiles, en un plano ordinario con respecto a la medida de unidad que se esté empleando, donde, una prueba diagnóstica puede discriminar entre un animal enfermo de un animal sano y/o viceversa. Este método de análisis de punto de corte nos sirve para determinar la Sensibilidad (Se) diagnóstica, que se refiere a la capacidad de un ensayo de diferenciar de un resultado falso positivo de un verdadero positivo; de igual forma se obtuvo la Especificidad (Sp) diagnóstica que se refiere a la capacidad del ensayo de arrojar un resultado verdadero negativo de un falso negativo.

Para establecer el punto de corte, así como determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba, se realizó un análisis de curva ROC (por sus siglas en inglés Receiver Operating Characterisc) con muestras de sueros de bovinos PPD+ (n=30) y PPD- (n=30), animales expuestos naturalmente a *M. bovis* (34, 74, 75). El análisis de curva ROC se hizo con el Software GraphPad Prism 7®, que determinó el punto de corte, la Especificidad (Sp) y Sensibilidad (Se) diagnóstica del ELISA indirecto. La evaluación de las

---

características de desempeño para la validación del ensayo, se realizaron con el programa de paquetería Microsoft Excel ®.

#### **VI. VI. II. Precisión del ELISA indirecto**

La precisión de la prueba indica la cercanía de resultados independientes de acuerdo con distintas condiciones previamente estipuladas en términos de repetibilidad ( $r$ ) y reproducibilidad ( $R$ ) donde se evaluó por quintuplicado durante tres días consecutivos el porcentaje de coeficiente de variación (%CV, que no sobrepasará el 20% de CV), para esto se utilizaron muestras de sueros de animales positivos a la tuberculinización PPD+ y PPD- llamados Control de Calidad Positivo de bovino (CCPb) y Control de Calidad Negativo de bovino (CCNb) ([34](#), [74](#), [75](#)).

#### **VI. VI. III. Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (selectividad)**

La característica de desempeño selectividad del ensayo, se refiere a la capacidad del método para reconocer sin interferencias los anticuerpos particulares en presencia de compuestos similares suspendidos en la matriz de la muestra. En placas de 96 pozos se sensibilizó de manera independiente con antígeno P35 de *M. avium* subesp *paratuberculosis* y lisado bacteriano de *Staphylococcus aureus* retándolo con el CCPb, donde se evaluó el porcentaje de unión, partiendo del 100% el porcentaje de unión del CCPb acoplado el ELISA indirecto con los antígenos HBHA y MCE2A, contrastando el resultado del porcentaje de unión con el antígeno P35 (MAP) y el lisado bacteriano de *Staphylococcus aureus*, el ensayo se realizó por triplicado ([34](#), [72](#), [73](#)).

---

#### **VI. VI. IV. Límite de detección del ELISA indirecto**

Para determinar el límite de detección se realizaron una serie de diluciones dobles seriadas hasta encontrar la dilución máxima en que la prueba pueda detectar el CCPb como una muestra positiva. La prueba se realizó por duplicado y se midió la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 450nm, con un espectrofotómetro, donde la menor absorbancia en términos de Densidad Óptica) se igualará al control de calidad del ensayo (SFB), para tal caso se conocería este punto como el límite de detección ([34](#), [74](#), [75](#)).

#### **VI. VI. V. Robustez del ELISA indirecto**

La característica de desempeño robustez del ensayo es la habilidad del ELISA indirecto, de permanecer sin alteraciones ni variaciones durante cambios deliberados del procedimiento experimental. Los cambios deliberados fueron: la temperatura de incubación, el analista y el lector de placas, en dos ensayos individuales simultáneos donde se ensayó por triplicado los CCPb y CCE (SFB).

Se dice que el ensayo es robusto cuando en términos de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) el porcentaje de variabilidad no superen el 20% del coeficiente de variabilidad (%CV) ([34](#), [74](#), [75](#)).

#### **VI. VI. VI. Estabilidad de la muestra ( $\alpha$ HBHA y $\alpha$ MCE2A, séricos)**

En cuanto a la evaluación de la estabilidad de la muestra, descrita como la capacidad de la muestra de no presentar variaciones ante el tiempo de almacenaje de muestras, considerando que hay estabilidad si la desviación estándar de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con

---

muestras recién obtenidas no sea mayor al 10% en un período de 15 días en términos de porcentaje de recuperación. La muestra se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación evaluando el porcentaje de unión del día uno, siete y quince contrastando el Control de Calidad de Ensayo (CCE) Suero Fetal Bovino (SFB) con los CCPb y CCNb. Se realizó un acúmulo de muestras sometidas a ciclos de congelación-descongelación en tres períodos de tiempo uno, siete y quince días, el día uno es el punto de referencia donde las muestras tendrían un punto de referencia en la gráfica de absorbancia (DO) de uniones antígenos/anticuerpos séricos, que van disminuyendo con el tiempo su unión y por lo tanto su afinidad al sistema de diagnóstico, posiblemente por la degradación o pérdida de la estructura propia del anticuerpo, antígeno o por la pérdida de la fracción fc del anticuerpo y/o degradación proteómica ([34](#), [74](#), [75](#)).

## **VII. Resultados**

### **VII. I. Estandarización del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA, MCE2A y PGRS33 del MTBC.**

Las condiciones de estandarización para el uso del ELISA indirecto se encuentran detalladas en el Protocolo Número Uno, se determinó que los antígenos proteicos HBHA y MCE2A tuvieron mejor adsorción en placas Maxisorp Nunc® ([Cuadro 1](#)), a una concentración del antígeno proteico de 1 µg por pozo con HBHA y 0.1 µg por pozo con MCE2A. Las placas tipo Polisorp Nunc® no adsorbieron las proteínas MCE2A, HBHA ni PGRS33. Las densidades ópticas  $\lambda_{450\text{nm}}$  del B0 o unión máxima con los CPE obtenidas, fueron menores o iguales a los UNE, por lo que fueron descartados para pasar la etapa de estandarización.

La proteína PGRS33 no mostró una adecuada adsorción en placas Maxisorp®, por lo que, los resultados recopilados al momento de la estandarización con base en su densidad óptica no fue la que se acoplaba a las exigencias de los posteriores ensayos, por lo que a partir de este momento se descartó su uso en el proyecto, tanto para realizar las inmunizaciones como en la etapa de validación.

La dilución de trabajo para el conjugado proteína G-peroxidasa de rábano con la proteína HBHA fue de 1/10000 y para la proteína MCE2A fue de 1/5000. La proteína PGRS33 no mostró señal de absorbancia con una longitud de onda  $\lambda_{450nm}$  DO, a distintas concentraciones de antígeno-conjugado en la fase sólida ni en fase líquida con las placas Maxisorp Nunc® ni Polisorp Nunc®. Los resultados de la estandarización para cada proteína se muestran en el [Cuadro 1](#).

**Cuadro 1.** Estandarización de los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33 con el CCPc y CCE's.

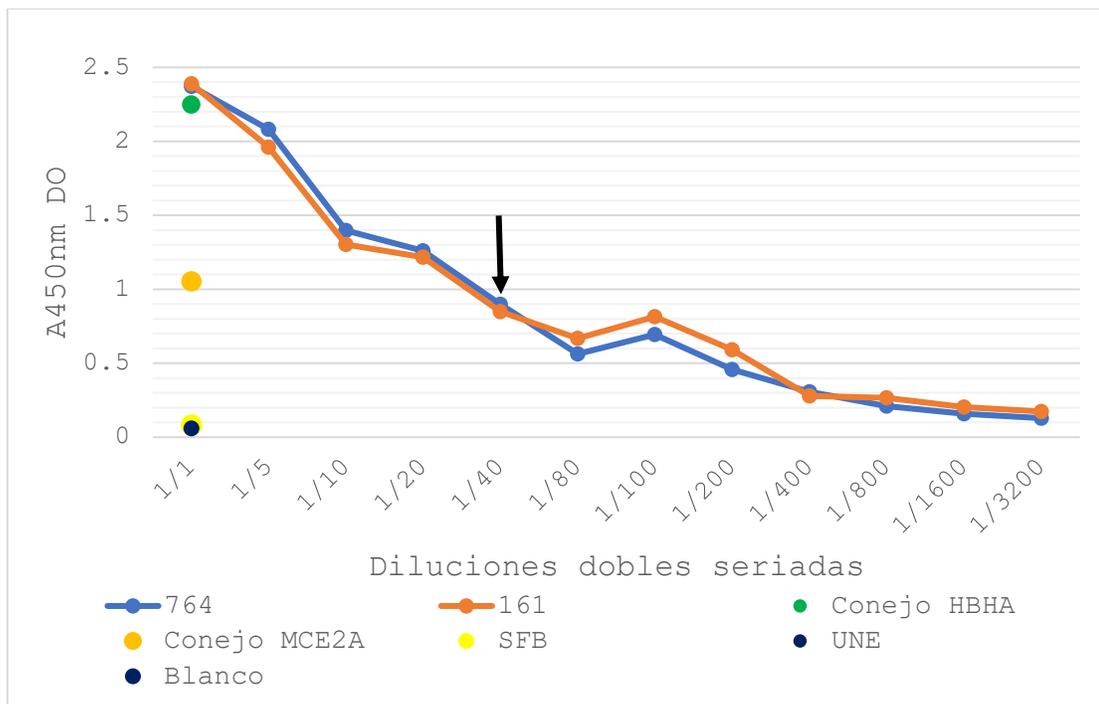
	<b>HBHA</b>	<b>UNE</b>	<b>MCE2A</b>	<b>UNE</b>	<b>PGRS33</b>	<b>UNE</b>	<b>PGRS33</b>	<b>UNE</b>
<b>Densidad Óptica <math>\lambda_{450nm}</math></b>	2.65	0.1	1.14	0.09	0.47	0.09	0.38	0.09
<b>Conjugado PG HRP</b>	1/10,000	1/10,000	1/5,000	1/5,000	1/10,0000	1/10,0000	1/5,000	1/5,000

\*Los CCPc (son aquellos sueros de conejo previamente obtenidos, con una concentración de 1/500 de anticuerpos séricos  $\alpha$ HBHA,  $\alpha$ MCE2A y  $\alpha$ PGRS33). Los controles de Calidad de Ensayo (CCE) son aquellas como las Uniones No específicas (UNE) y Blanco [Protocolo Número 1](#), para descartar posibles alteraciones en la configuración del ELISA indirecto, así como el CCNE Suero Fetal Bovino (SFB).

La dilución óptima del suero control de calidad positivo (CCP), con el ELISA indirecto acoplado a cada antígeno proteico recombinante HBHA y MCE2A, se determinó mediante una curva de diluciones de los sueros CCPc y CCPb, iniciando desde su estado crudo 1/1 hasta la dilución 1/3200, siendo la dilución 1/40 la

dilución de trabajo o ensayo. La determinación de la dilución óptima de trabajo se representa en la [Gráfica 1](#).

**Gráfica 1.** Determinación de la dilución de trabajo del suero control positivo CCPb.



**Gráfica 1.** La Dilución óptima de sueros policlonales CCPb  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A fue de 1/40. A partir de sueros policlonales CCPb de los bovinos con identificación 764 del grupo inmunizado con el antígeno HBHA y 161 del grupo inmunizado con MCE2A, se realizaron diluciones dobles seriadas, desde el estado crudo hasta la dilución 1/3200, donde se determinó la dilución de trabajo óptima del suero CCPb en 1/40, de igual forma con el CCPc. Como valores de referencia positivos (CCPc) se utilizaron sueros policlonales  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A elaborados en conejo, como CCE se utilizó SFB.

---

**VII. II. Validación del ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes de captura HBHA y MCE2A, para el diagnóstico de la tuberculosis bovina**

**VII. II. I. Punto de corte, Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la prueba ELISA indirecto con los antígenos proteicos recombinantes HBHA y MCE2A**

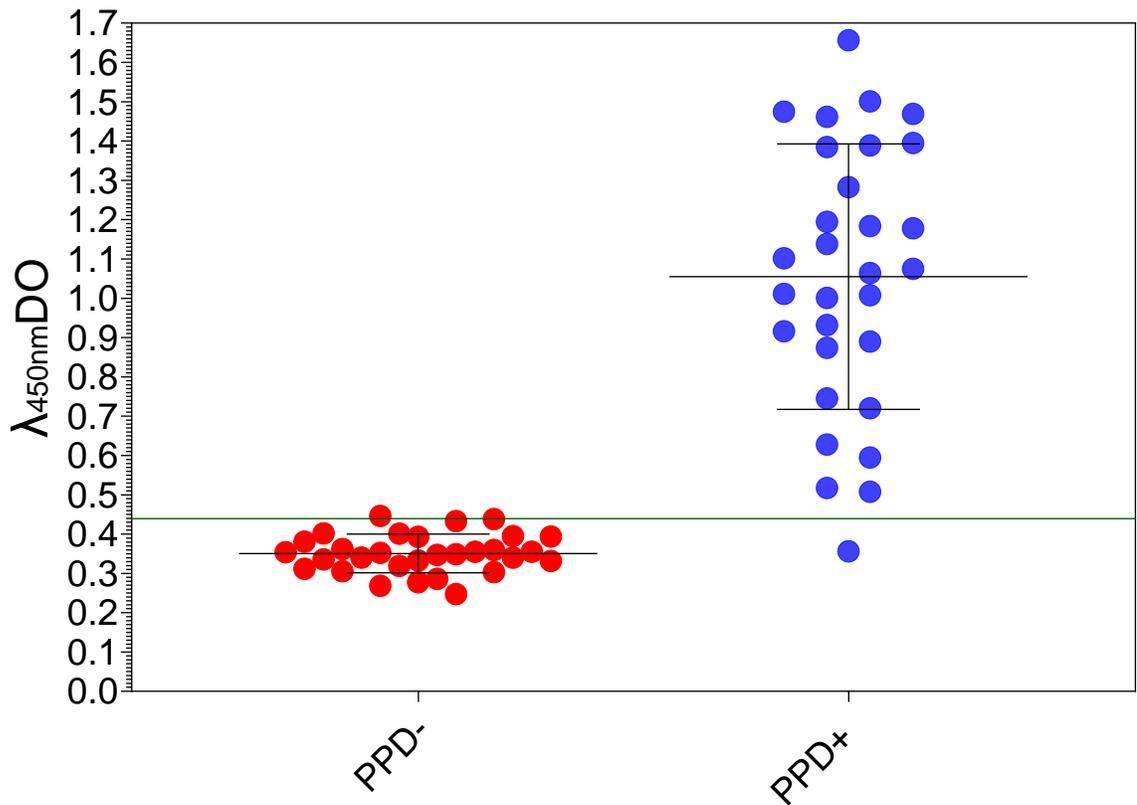
El ELISA indirecto estandarizado con el antígeno proteico recombinante HBHA en la fase sólida para el acoplamiento de los anticuerpos circulantes en sueros de bovinos provenientes de hatos con presencia del *M. bovis* en becerros de seis meses de edad, el análisis de curva ROC determinó un punto de corte con densidades ópticas mayores a 0.442 ( $\lambda_{450nm}$ ) ([Gráfica 2](#)), con una sensibilidad de 96.67% (IC 95%=82.78% a 99.92%) y una especificidad de 96.67% (IC 95%=82.78% a 99.92%), con un índice de verosimilitud positivo (Likelihood ratio=LR) LR+=29 e índice de verosimilitud negativo LR- = -0.98 ([Cuadro 2](#)). En la [Gráfica 2](#) se aprecia que hay un animal PPD+ (punto azul) por debajo de la línea del punto de corte, este animal es considerado como un falso positivo. En la misma [Gráfica 2](#) con respecto a los animales PPD- tres de ellos hacen contacto con la línea del punto de corte, por lo que son considerados como animales sospechosos o posibles falsos negativos. Con un Área Bajo la Curva (AUC= Area Under the Curver) de 0.987 (P<0.0001) y un error estándar de 0.0127 ([Gráfica 3](#)). En la [Gráfica 3](#), se observa el índice de Youden con valores de Y=0.933 y X=0.034 (Calculado por medio de  $IY=Se + Sp - 1 = Se - (1-Sp)$  o  $IY=[Se/(1-Sp)]$ ). Así como la línea de discriminación que va desde el Y=0 X=0, hasta el Y=100 X=100 (Se y Sp respectivamente).

**Cuadro 2.** Análisis curva ROC para determinar el punto de corte, Se y SP diagnóstica del ELISA indirecto acoplado con el antígeno HBHA.

Punto de Corte	Sensibilidad	IC 95%	Especificidad	IC 95%	LR+	LR-
> 0.4355	96.67	82.78% a 99.92%	93.33	77.93% a 99.18%	14.5	-0.98
> 0.442	96.67	82.78% a 99.92%	96.67	82.78% a 99.92%	29	-0.98
> 0.477	96.67	82.78% a 99.92%	100	88.43% a 100%		

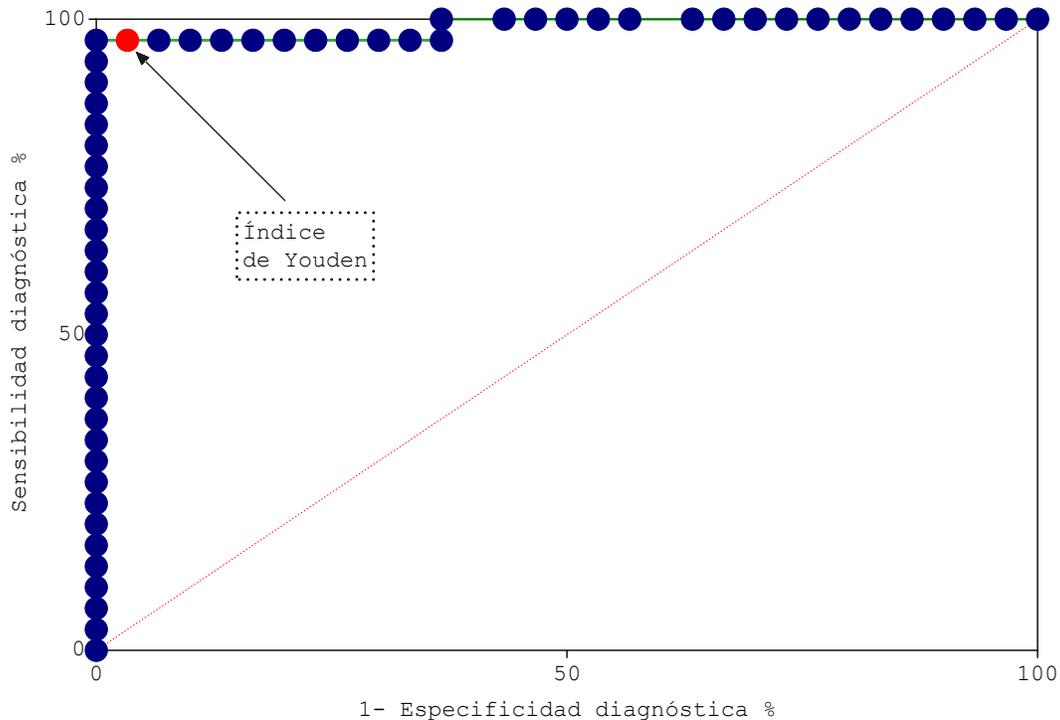
**Cuadro 2.** Distribución de los grupos PPD+ y PPD- (n=30) en un análisis de curva ROC con las muestras de suero de bovino retadas con el antígeno HBHA, con su respectiva media ( $\bar{x}$ ), desviación estándar (SD), punto de corte en 0.442 (DO  $\lambda_{450\text{nm}}$ ), Se 96.67% y Sp 96.67%.

**Gráfica 2.** Grupo de sueros de bovinos PPD+ y PPD- en una distribución normal analizados por curva ROC para el ELISA indirecto acoplado al antígeno MCE2A, con su respectivo punto de corte en 0.442 (DO  $\lambda_{450nm}$ ).



**Gráfica 2.** Grupos de bovinos PPD+ y PPD- en una distribución normal evaluadas con el ELISA indirecto acoplado con el antígeno HBHA. Los sueros PPD- (puntos rojos) (n=30) y PPD+ (puntos azules) (n=30), en una distribución de Nominal con su media  $\bar{T}$ = 1.055, desviación estándar SD= 0.337 y punto de corte en 0.442 (DO  $\lambda_{450nm}$ ) delimitado por la línea horizontal negra, con una significancia de  $P < 0.0001$ .

**Gráfica 3.** Curva ROC de los bovinos PPD+ (n=30) y PPD- (n=30), del ELISA indirecto acoplado con el antígeno HBHA.



**Gráfica 3.** Curva ROC con la prueba de ELISA indirecto acoplada con el antígeno HBHA. La prueba presenta una Se de 96.67% y Sp 96.67% con una significancia de  $P < 0.0001$ . Así como la línea de discriminación que va desde el  $Y=0$   $X=0$ , hasta el  $Y=100$   $X=100$  (Se y Sp respectivamente). Con el índice de Youden (IY) y su línea de discriminación.

El análisis de curva ROC del ELISA indirecto, con la placa acoplada con el antígeno proteico MCE2A, arrojó un punto de corte de  $0.702 \lambda_{450nm}$  (DO), se muestra en la [Gráfica 4](#). El ELISA indirecto sensibilizado con el antígeno MCE2A bajo el análisis de Curva ROC demuestra una sensibilidad de 93.33% (IC 95%=77.93% a 99.18%) y una especificidad de 93.33% (IC 95%=77.93% a 99.18%), con un índice de verosimilitud positivo (Likelihood ratio=LR)  $LR+=14$  e índice de verosimilitud negativo  $LR- = -0.98$  ([Cuadro 3](#)). Con un Área Bajo la Curva (AUC= Area Under the Curver) de 0.971 ( $P < 0.0001$ ) y un error estándar de

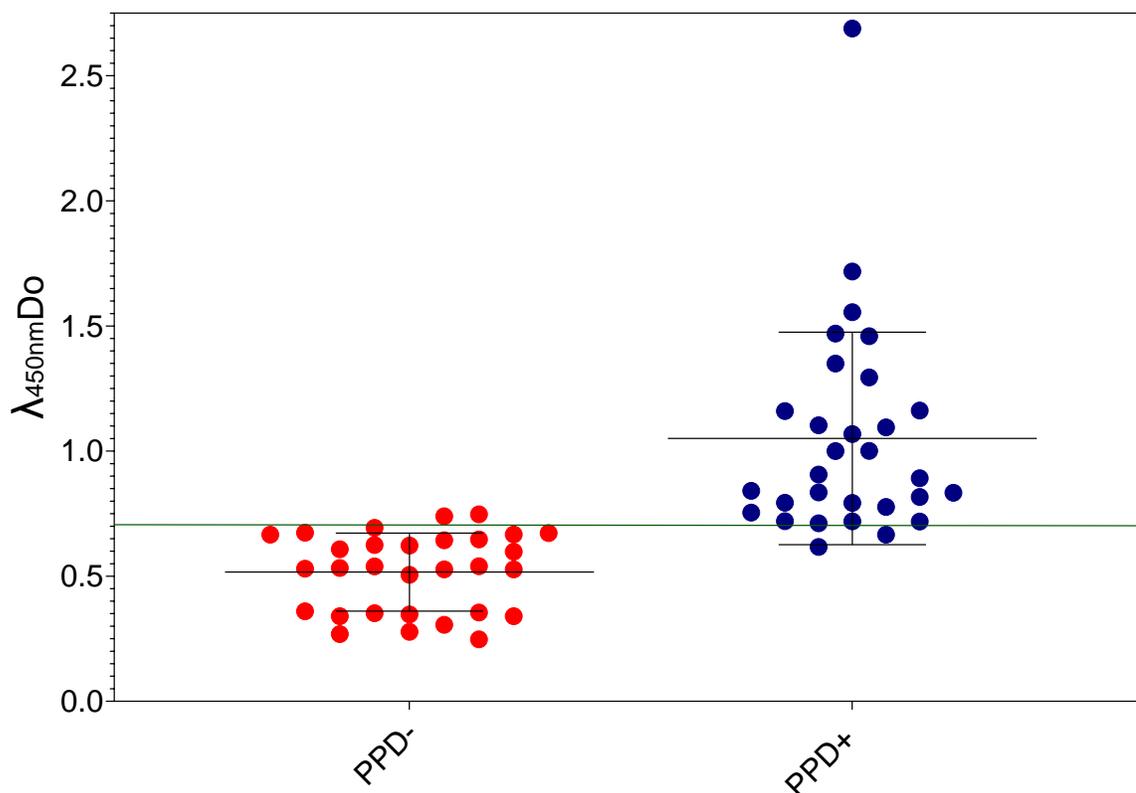
0.0174, apreciable en la [Gráfica 5](#). Lo que se observa en la [Gráfica 5](#) es que existen dos animales PPD+ (puntos azules) por debajo de la línea del punto de corte, estos animales son considerados como un falso positivo, con respecto a los animales PPD- donde hay dos que rebasan la línea del punto de corte por lo que serían considerados como falsos negativos, y al menos cinco de ellos que hacen contacto con la línea del punto de corte, por lo que podrían ser considerados como animales sospechosos o posibles falsos negativos. En la [Gráfica 5](#), se observa el índice de Youden con valores de  $Y=0.86$  y  $X=0.075$  (Calculado por medio de  $IY=Se + Sp - 1 = Se - (1-Sp)$  o  $IY=[Se/(1-Sp)]$ , Así como la línea de discriminación que va desde el  $Y=0$   $X=0$ , hasta el  $Y=100$   $X=100$  (Se y Sp respectivamente).

**Cuadro 3.** Análisis curva ROC para determinar el punto de corte, Se y SP diagnóstica del ELISA indirecto acoplado con el antígeno HBHA.

PUNTO DE CORTE	SENSIBILIDAD	IC 95%	ESPECIFICIDAD	IC 95%	LR +	LR -
> 0.6835	93.33	77.93%	90	73.47%	9.333	-1.025
		a		a		
		99.18%		97.89%		
> 0.7022	93.33	77.93%	93.33	77.93%	14	-0.98
		a		a		
		99.18%		99.18%		
> 0.7148	90	73.47%	93.33	77.93%	13.5	-0.95
		a		a		
		97.89%		99.18%		

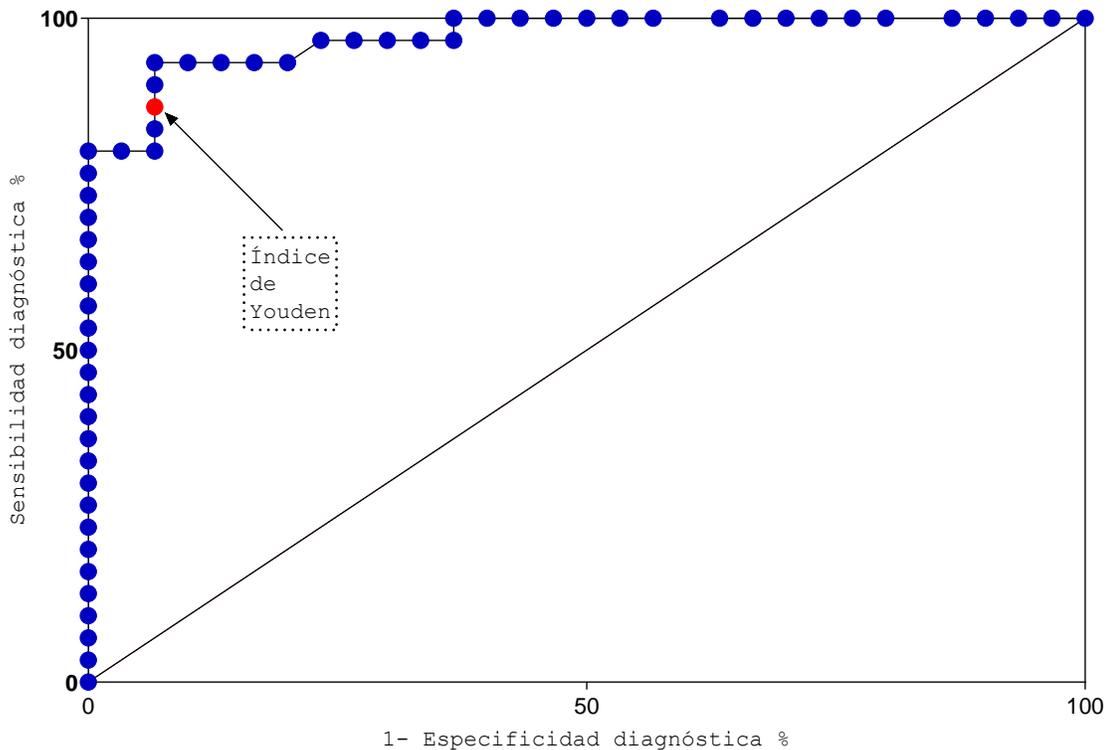
**Cuadro 3.** Distribución de los grupos PPD+ y PPD- (n=30) en un análisis de curva ROC con las muestras de suero de bovino retadas con el antígeno MCE2A, con su respectiva media ( $\bar{T}$ ), desviación estándar (SD), punto de corte en 0.7022 (DO  $\lambda_{450nm}$ ), Se 93.33% y Sp 93.33%.

**Gráfica 4.** Grupo de sueros de bovinos PPD+ y PPD- en una distribución normal analizados por curva ROC para el ELISA indirecto acoplado al antígeno MCE2A, con su respectivo punto de corte en 0.7022 (DO  $\lambda_{450nm}$ ).



**Gráfica 4.** Grupos de bovinos PPD+ y PPD- en una distribución normal evaluadas con el ELISA indirecto acoplado con el antígeno MCE2A. Los sueros PPD- (puntos rojos) (n=30) y PPD+ (puntos azules) (n=30), en una distribución de Normal con su media  $\bar{X}$ = 1.05, desviación estándar SD= 0.442 y punto de corte en 0.7022 (DO  $\lambda_{450nm}$ ) delimitado por la línea horizontal negra, con una significancia de  $P < 0.0001$ .

**Gráfica 5.** Curva ROC de los bovinos PPD+ (n=30) y PPD- (n=30), del ELISA indirecto acoplado con el antígeno MCE2A.



**Gráfica 5.** Curva ROC con la prueba de ELISA indirecta acoplada con el antígeno HBHA. La prueba presenta una Se de 96.67% y Sp 96.67% con una significancia de  $P < 0.0001$ . Así como la línea de discriminación que va desde el  $Y=0$   $X=0$ , hasta el  $Y=100$   $X=100$  (Se y Sp respectivamente). Con el índice de Youden (IY) y su línea de discriminación.

## VII. II. II. Precisión del ELISA indirecto

Se considera que un ensayo es preciso en términos de repetibilidad (r) y reproducibilidad (R), cuando el porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV) no es mayor a 20% en tres ensayos realizados consecutivamente, en el presente ensayo los %CV no superaron el 20% del coeficiente de variación intraensayo (r), en cuanto a la característica de desempeño interensayo (R) tampoco superó el 20% del coeficiente de

variación, lo que significa que el ensayo es repetible y reproducible sensibilizando el ELISA indirecto con los antígenos HBHA y MCE2A retado con los controles de calidad positivo y negativos CCPb y CCE SFB. Los resultados de precisión para los ensayos que utilizan como antígeno de captura las proteínas recombinantes HBHA o MCE2A se muestran en el [Cuadro 4](#).

**Cuadro 4.** Coeficientes de Variación intraensayo e interensayo, repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) para el ELISA indirecto con los antígenos de captura proteínas recombinantes HBHA y MCE2A, individualmente.

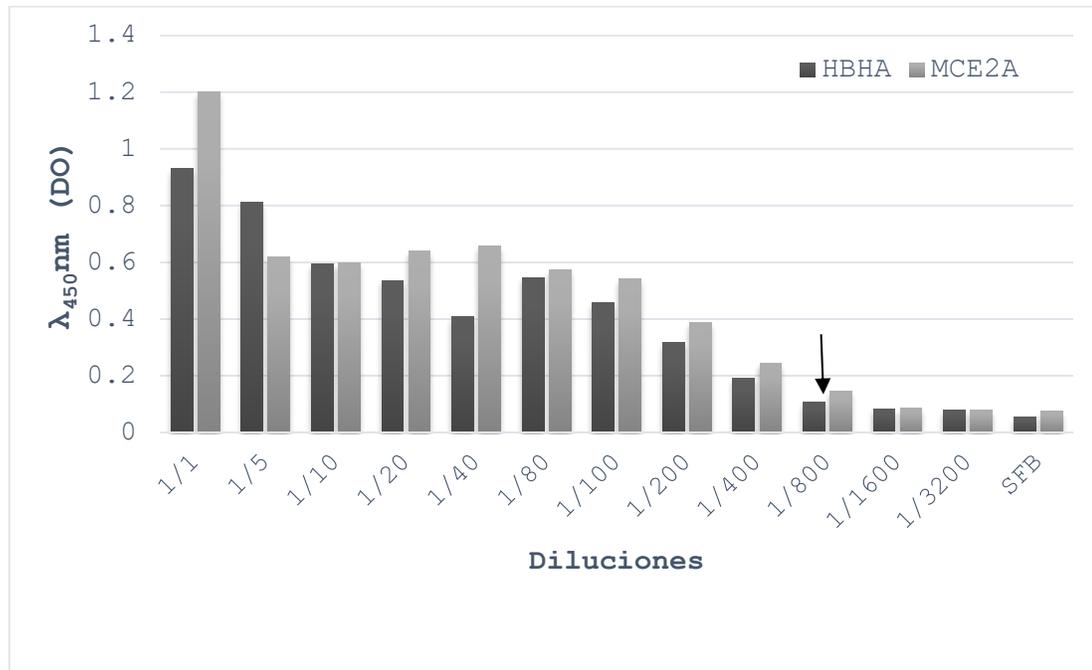
Repetibilidad (r)	HBHA		MCE2A	
	% CV CCP	% CV CCN	%CV CCP	%CV CCN
<b>Ensayo 1</b>	10.11	10.72	9.42	3.167
<b>Ensayo 2</b>	8.63	4.93	5.63	2.25
<b>Ensayo 3</b>	5.27	3.76	3.88	7.14
Reproducibilidad (R)	HBHA		MCE2A	
	%CV CCP	%CV CCN	%CV CCP	%CV CCN
<b>Interensayo</b>	15.08	21.85*	11.621	6.80

\*Se encontró que uno de los %CV superó el 20% que es el grupo de Controles de Calidad Negativo evaluado ante el antígeno HBHA.

### VII. II. III. Límite de detección del ELISA indirecto

El ensayo deja de detectar los anticuerpos presentes en la muestra a partir de una  $\lambda_{450nm} = 0.09$  DO. Las curvas de diluciones de los sueros CCPb para ambos antígenos se presentan en la [Gráfica 6](#).

**Gráfica 6.** Límite de detección de los CCPb, con el ELISA indirecto acoplado con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A, respectivamente.



**Gráfica 6.** Límite de detección del ensayo con el CCPb contra el antígeno HBHA (barras negras) y MCE2A (barras grises). Con los sueros CCPb  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A desde su estado crudo diluyendo el suero en PBS a diluciones dobles seriadas hasta la dilución 1/3200. Se utilizó suero fetal bovino (SFB) como control de calidad del ensayo. La flecha negra indica que a una  $\lambda_{450\text{nm}}=0.09$  (DO), es el límite de detección y se encuentra entre la dilución 1/800 y 1/1600, en otras palabras, ya no existe antígeno en la matriz líquida que el conjugado pueda marcar y/o el espectrofotómetro pueda detectar.

#### **VII. II. IV. Prueba de reacción antigénica cruzada en el ELISA indirecto (Selectividad)**

La prueba mostró porcentajes de unión menores al 60%, es decir, no se detectó unión significativa de los anticuerpos presentes en los sueros CCPb y CCNb (también conocido como matriz líquida), hacía el lisado de un cultivo de *Staphylococcus*

*aureus* ni el antígeno proteico P35 de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*.

Los porcentajes de unión medidos hacia los antígenos de prueba fueron menores del 60%, lo que indica la capacidad de la prueba para reconocer el anticuerpo en presencia de compuestos similares. El sistema de diagnóstico propuesto permite diferenciar los antígenos propuestos como de captura HBHA y MCE2A, de antígenos de otros microorganismos tanto similares al MTBC como es *M. avium* subsp *paratuberculosis* (MAP), así como de diferentes como *S. aureus* ([Cuadro 5](#)).

**Cuadro 5.** Selectividad del ensayo.

Suero Control	Antígeno	$\lambda_{450nm}$ (DO)	Unión (%)
CCPb $\alpha$ HBHA	HBHA	0.704	100
	<i>S. aureus</i>	0.249	35
	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0.366	52
CCPb $\alpha$ MCE2A	MCE2A	1.159	100
	<i>S. aureus</i>	0.249	21
	<i>M. avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i>	0.366	32

**Cuadro 5.** La evaluación se realizó de forma independiente, utilizando sueros CCPb contra los antígenos HBHA y MCE2A, comparando el % de unión contra antígenos de *Staphylococcus aureus* y la proteína P35 de *M. avium* subsp *paratuberculosis*.

## VII. II. V. Robustez del ELISA indirecto

El ensayo de ELISA indirecto sensibilizado con las proteínas HBHA y MCE2A, es robusto ya que los %CV no son superaron el 20% de CV, a excepción de ciertas combinaciones al momento de realizar el cálculo de las mismas (estas marcadas con un \*).

La robustez del ensayo se determinó con base a los porcentajes de coeficientes de variación, realizando combinaciones distintas entre temperatura de incubación, analista/ensayista y lector de placa (leyendo el resultado con la misma  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO).

El sistema de diagnóstico propuesto en este estudio es robusto, lo que significa que puede ser realizado por personal capacitado, también puede ser transportado entre laboratorios y cuantificado por un instrumento de espectrofotometría a una  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO. Los resultados de la evaluación intraensayo e interensayo se esquematizan en el [Cuadro 7](#) y [Cuadro 8](#).

**Cuadro 7.** Robustez del ensayo. Evaluación intraensayo (r).

Repetibilidad (r)	HBHA		MCE2A	
	%CV CCPb	%CV CCE	%CV CCPb	%CV CCE
<i>Lector de placa 1</i> Analista 1	3.334	9.411	3.766	4.283
<i>Lector de placa 2</i> Analista1	4.035	14.760	5.115	5.031
<i>Lector de placa 1</i> Analista 2	1.641	15.230	1.612	16.508
<i>Lector de placa 1</i> Analista 2	1.185	1.513	4.897	2.647
<i>Lector de placa 1</i> Analista 1 RT	2.508	7.103	3.381	5.836
<i>Lector de placa 2</i> Analista 1 RT	1.419	5.380	4.382	5.847
<i>Lector de placa 1</i> Analista 2 RT	3.240	11.186	1.693	12.692
<i>Lector de placa 1</i> Analista 2 RT	3.683	1.495	3.138	2.712

**Cuadro 8.** Robustez del ensayo. Evaluación interensayo (R).

<b>Reproducibilidad (R)</b>	<b>HBHA</b>	<b>MCE2A</b>
<b>Interensayo</b>	<i>%CV CCPb Analista 1 Lector de placa 1 22.86</i>	<i>%CV CCPb Analista 1 Lector de placa 1 21.10</i>
	<i>%CV CCPb Analista 1 Lector de placa 2 20.94</i>	<i>%CV CCPb Analista 1 Lector de placa 2 23.53</i>
	<i>%CV CCE Analista 1 Lector de placa 1 21.85</i>	<i>%CV CCE Analista 1 Lector de placa 1 20.86</i>
	<i>%CV CCE Analista 1 Lector de placa 2 21.64</i>	<i>%CV CCE Analista 1 Lector de placa 2 21.27</i>
	<i>%CV CCPb Analista 2 Lector de placa 1 19.88</i>	<i>%CV CCPb Analista 2 Lector de placa 1 17.91</i>
	<i>%CV CCPb Analista 2 Lector de placa 2 22.91</i>	<i>%CV CCPb Analista 2 Lector de placa 2 18.24</i>
	<i>%CV CCE Analista 2 Lector de placa 1 22.87</i>	<i>%CV CCE Analista 2 Lector de placa 1 14.09</i>
	<i>%CV CCE Analista 2 Lector de placa 2 23.02</i>	<i>%CV CCE Analista 2 Lector de placa 2 14.46</i>

Los resultados con %CV >del20%CV, se encuentran remarcado con verde. Y aquellos que son reproducibles (R) en amarillo.

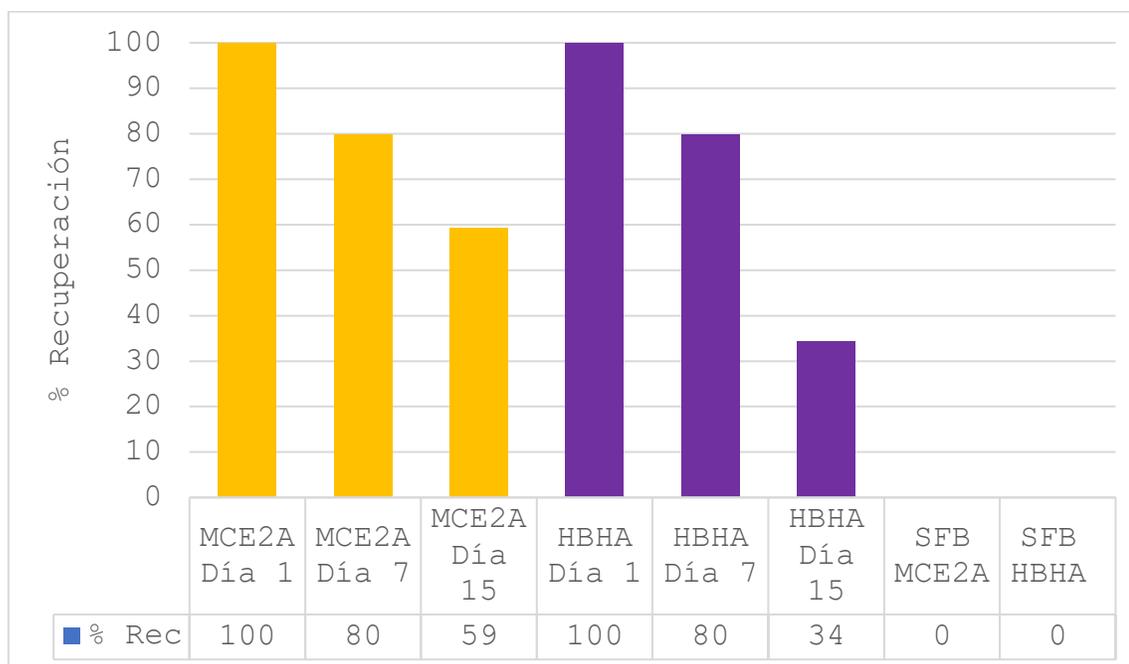
---

## VII. II. VI. Estabilidad de la muestra

En porcentaje de recuperación se observa que la muestra (el suero de bovino) presenta un decrecimiento conforme van pasando los días, así como los cambios bruscos en temperatura (de ir de una temperatura ambiente a congelación a -20) se va perdiendo afinidad de los anticuerpos hacia los antígenos, posiblemente por la degradación de las proteínas o por la presencia de otros compuestos en la matriz líquida que no permiten la unión del anticuerpo en cuestión con el antígeno en el fondo de la placa.

Como Control de Calidad de Ensayo (CCE) del ensayo se utilizó el Suero Fetal Bovino. La medida del porcentaje de recuperación decrece tanto para los antígenos MCE2A y HBHA, los controles SFB del ensayo para ambos casos se observan del lado derecho de la [Gráfica 7](#).

**Gráfica 7.** Porcentaje de recuperación en tres distintos días (1, 7 y 15 días, tanto para el antígeno proteico recombinante MCE2A como para HBHA). Las muestras de sueros de bovinos positivos a la prueba de intradermorreacción- (tuberculinización), se sometieron a ciclos de congelación-descongelación de -20°C a 23°C (o temperatura ambiente).



**VII. III. Estimulación para la producción de sueros policlonales  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A del MTBC, en becerras de seis meses sin la prueba de tuberculinización, procedentes de un hato certificado por SADER como libre de tuberculosis**

Siguiendo el [Protocolo Número Uno](#) de inmunización de terneras de seis meses de edad durante 225 días, se obtuvieron muestras de sangre periférica para la posterior obtención de suero y evaluación de la seroconversión inmunogénica montada por bovinos de seis meses de edad hacia los antígenos proteicos HBHA y MCE2A.

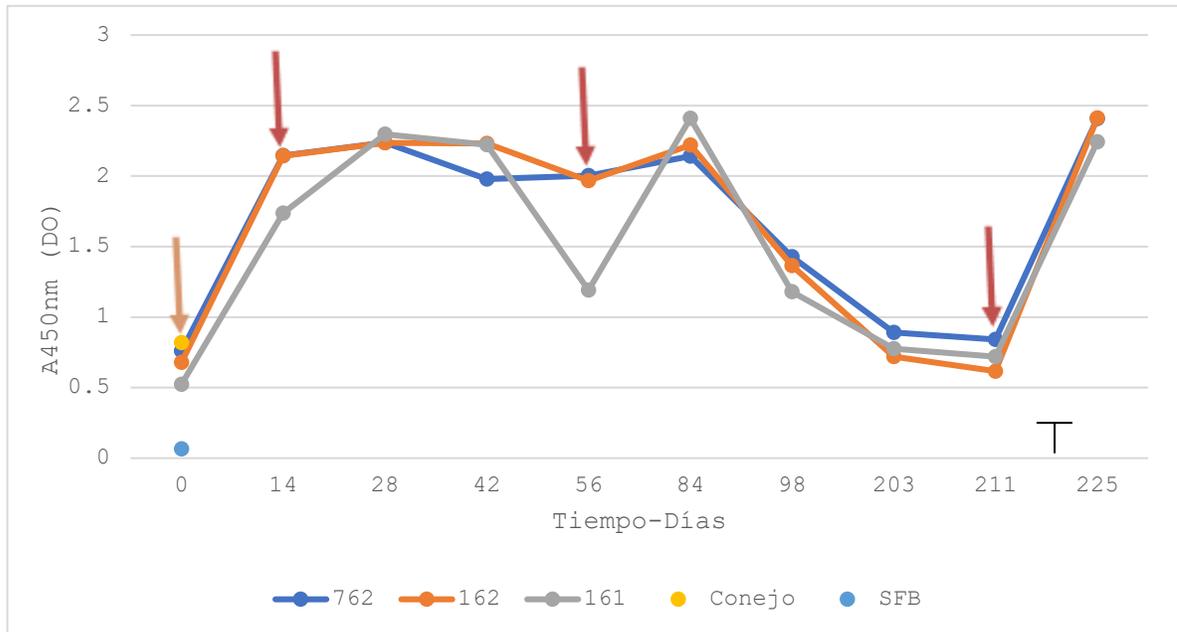
Los grupos de terneras inmunizadas con los antígenos HBHA y MCE2A desarrollaron una respuesta inmunización-dependiente de la concentración de anticuerpos en suero, respecto a cada inmunización realizada. Y en ambos grupos se observó que existe un efecto prolongado de las primeras tres inmunizaciones, hasta la cuarta inmunización, donde hay una caída súbita en la concentración de anticuerpos en suero, esto representado en la [Gráfica 8](#) para el grupo inmunizado con el antígeno HBHA y para el antígeno MCE2A se encuentra en la [Gráfica 9](#).

**Gráfica 8.** Seroconversión en sueros de becerros de seis meses de edad con anticuerpos policlonales  $\alpha$ HBHA.



**Gráfica 8.** Cada inmunización se señala con la flecha roja, la flecha naranja indica el muestreo basal, previo a la primera inmunización. El punto amarillo es el control de calidad positivo de conejo (CCPc), el punto azul es el control de ensayo negativo (SFB), mientras que la **T** es el momento de la tuberculinización correspondiente al día 222.

**Gráfica 9.** Seroconversión inmunogénica en sueros de becerras de seis meses de edad con anticuerpos policlonales  $\alpha$ MCE2A.



**Gráfica 9.** Cada inmunización se señala con la flecha roja, la flecha naranja indica el muestreo basal, previo a la primera inmunización. El punto amarillo es el CCPC, el punto azul es el CCE (SFB), mientras que la **T** es el momento de la tuberculinización correspondiente al día 222.

**VII. IV. Aplicación de la prueba de intradermorreacción a la tuberculina según la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 (*Mycobacterium bovis*), Campaña Nacional de erradicación contra la tuberculosis bovina**

Con el fin de determinar si las inmunizaciones de becerras con las proteínas micobacterianas HBHA y MCE2A interferían con la prueba de intradermorreacción a la tuberculina, se aplicó PPD bovino en el pliegue caudal y todos los animales resultaron negativos. Para determinar si las proteínas micobacterianas HBHA y MCE2A generaban una respuesta celular, se realizó una prueba intradérmica con los antígenos proteicos HBHA (10 $\mu$ g) y MCE2A (15 $\mu$ g) en la tabla del cuello. Todos los animales de

ambos grupos resultaron negativos a la prueba cutánea, los resultados se presentan en el [Cuadro 9](#).

**Cuadro 9.** Prueba de tuberculinización en el pliegue ano caudal e intradérmica en la región de la tabla del cuello con los antígenos proteicos recombinantes  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A. La medición de la turgencia de la piel se realizó con un vernier, antes y después de la aplicación intradérmica de cada antígeno.

Grupo	ID de animal	Tabla del cuello pre-inoculación (mm)	Tabla del cuello post-inoculación (mm)	Prueba intradérmica en tabla de cuello	Prueba de tuberculina en pliegue caudal
HBHA	765	0.5	0.7	Negativo	Negativo
	764	0.5	0.75	Negativo	Negativo
	163	0.5	0.75	Negativo	Negativo
MCE2A	161	0.4	0.5	Negativo	Negativo
	162	0.4	0.6	Negativo	Negativo
	762	0.6	0.7	Negativo	Negativo

## VIII. Discusión

El diseño de nuevas herramientas de diagnóstico que sean accesibles, de fácil manejo, baratos y con alta confiabilidad es un reto no solamente en el sector agropecuario, más aún cuando se trata de enfermedades que se encuentran dentro de campañas nacionales de control y erradicación como la tuberculosis bovina, donde existan alternativas

---

complementarias que ayuden a cumplir los objetivos propuestos. Se deben considerar múltiples factores que puedan ser causantes de dificultades o distorsiones al momento de interpretar los resultados, coadyuvar metodologías existentes y facilitar la toma de decisiones tanto en poblaciones con infecciones ya establecidas o con estado zoonosario desconocido y por supuesto, en poblaciones declaradas libres de tuberculosis bovina ([52](#), [69](#), [73](#)).

La inmunidad humoral tiene un papel importante en cualquier enfermedad, en este estudio se desarrolló un sistema de captura de anticuerpos circulantes dirigidos hacia los antígenos  $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A producidos durante la infección por *Mycobacterium bovis*. Estos antígenos, además del ELISA indirecto propuesto, se pueden acoplar a nuevos diseños de diagnósticos conocidos como Multiplex diagnosis diseases system's, tanto para su uso en programas de salud animal como en programas de prevención en la salud humana. Otra posible alternativa, es su uso como candidatos vacunales a partir de la evaluación de sus características inmunogénicas ([63](#), [65](#), [67](#), [68](#)).

Una de las limitantes en la estandarización de la prueba diagnóstica ELISA indirecta fue que el tapizado antigénico proteico con los antes mencionados antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33, durante el experimento se saturó la fase inorgánica o también conocida como plato de acoplamiento, que con la proteína PGRS33 no tuvo afinidad ninguna de las dos. Sin descartar el antígeno PGRS33 en otros diseños de diagnóstico de la tuberculosis, o como posible candidato vacunal para inducir la respuesta inmunogénica y como antígeno inmunodominante.

Con la proteína HBHA y MCE2A se encontró un punto de sobresaturación tanto en la fase sólida como en la fase líquida

---

por lo que se ajustaron las concentraciones de antígeno-anticuerpo y conjugado para llegar a la estandarización del tapizado en placas con los antígenos proteicos HBHA y MCE2A.

Este posible incremento en la concentración de anticuerpos policlonales en suero de bovinos durante las inmunizaciones para estimular la producción de sueros policlonales con los antígenos HBHA y MCE2A se debió posiblemente a un fenómeno conocido como efecto anamnésico, este efecto se ha documentado como reacción posterior a la prueba de tuberculinización, caracterizado por un incremento exponencial de anticuerpos en sangre, aunque no hay registros donde se cuantifiquen ni identifiquen las citocinas, anticuerpos o células de la respuesta humoral que se producen después de la tuberculinización.

El efecto anamnésico es un fenómeno inmunológico poco estudiado pero similar con la prueba de intradermoreacción a la tuberculina, el incremento en la turgencia de la piel se debe a un proceso de hipersensibilidad tipo IV cuantificable 72 horas después de la tuberculinización por medición de la turgencia de la piel con un vernier (en sus tres zonas de aplicación la ano-caudal, cervical simple y doble comparativa, se observa un incremento de la  $\lambda$  (DO) del día 211 al día 225) (Gráficas [8](#) y [9](#)), aunque no se pudo tener el muestreo del día 15 después de la tuberculinización donde se ha observado la máxima expresión inmunogénica ya sea por el efecto anamnésico o por la inmunización *per se* de los antígenos HBHA y MCE2A en la prueba doble comparativa, reportado en estudios previos. Este fenómeno inmunológico conocido como efecto anamnésico observado al día 225 con la prueba de ELISA indirecto propuesta en este proyecto, que se hubiese comprobado con un muestreo al día 237 ([7](#), [22](#), [27](#), [31](#), [32](#), [34](#), [52](#), [62](#), [73](#))

---

Por lo tanto, los inmunógenos bajo el esquema de inmunización realizada en este proyecto cumplen con su objetivo de estimular e incrementar la concentración de anticuerpos en suero, fenómeno observado en las tres terneras del grupo inmunizado con el antígeno proteico recombinante HBHA.

El grupo de animales inmunizados con MCE2A se observa homogeneidad en dos de los tres sujetos inmunizados, uno de ellos tiene un decremento en la absorbancia  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO. Al momento posterior de la tercera inmunización coincidente con el brote viral que se observa con notoriedad en el grupo de terneras inmunizadas con el antígeno recombinante proteico HBHA. Del grupo de terneras inmunizadas con el antígeno MCE2A, el individuo 161 baja su absorbancia  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO por ende la concentración de anticuerpos séricos policlonales en suero, que posterior a la tercera inmunización aumenta su absorbancia  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO, coincidente con los muestreos realizados el día 98, 203 y 211, donde los tres individuos van disminuyendo su absorbancia hasta el último muestreo posterior a la cuarta inmunización y tuberculinización, donde se ve el aumento de la absorbancia  $\lambda_{450\text{nm}}$  DO, igualándose la concentración de anticuerpos policlonales en suero al muestreo del día 84, por ende, se ve que hay una relación inmunológicamente dependiente de cada inmunización con respecto a la concentración de anticuerpos en suero.

Las sensibilidades (96.67% HBHA & 93.33 MCE2A) y especificidades (96.67% HBHA & 93.33% MCE2A) determinado en  $\lambda_{450\text{nm}}$  (DO) por un ELISA indirecto acoplado con los antígenos HBHA y MCE2A, son los deseables por cualquier equipo científico que esté desarrollando y evaluando nuevos sistemas de diagnóstico enfocado hacia la medición ya sea cuantificable y/o cualitativa (en este proyecto por medio de la

---

estandarización y validación), especialmente cuando se trata de diagnosticar enfermedades causadas por el MTBC como la tuberculosis humana, bovina, síndromes como el de Johne's o Chrones, lepra, o meningitis tuberculosa, entre otras (76).

## **IX. Conclusiones**

Los bovinos expuestos de forma natural al microorganismo (en hatos libres como en hatos con prevalencia de la enfermedad) desarrollaron anticuerpos contra los antígenos HBHA y [MCE2A.] PGRS33 no presentó cualidades ni características para ser utilizado como antígeno de diagnóstico debido a que no se acopló a la base inorgánica ni el sustrato orgánico, se podría evaluar *in vitro* y de ahí traslaparlo a ensayos *in vivo*, en cuanto a su afinidad para acoplarse a la fase inorgánica se deberían buscar nuevos sistemas de acoplamiento o moldes que adsorban y mantengan en soporte al antígeno. Contrario con los antígenos HBHA y MCE2A que tienen una alta sensibilidad y especificidad para ser herramientas de diagnóstico en la captura de anticuerpos circulantes en sueros de bovinos expuestos naturalmente a *Mycobacterium bovis*, mostrando un alto desempeño en las pruebas para la validación y estandarización del ELISA indirecta.

Desarrollar pruebas serológicas para la complementación de programas de control, prevención y erradicación de tuberculosis bovina en el país es fundamental para el buen manejo de la salud animal. El diseño propuesto de sistema de captura de anticuerpos circulantes con los antígenos HBHA, MCE2A y PGRS33 es una alternativa que puede apoyar con los programas de control de la tuberculosis bovina en México.

Sería interesante hacer una evaluación del uso de las proteínas HBHA y MCE2A como posibles candidatos para ser utilizados como

---

vacunas contra la TBb ya que mostraron evocar una respuesta tipo TH2 en bovinos menores de 6 meses y no interferir con las pruebas rutinarias aplicadas en el hato bovino para la detección de individuos infectados.

## **X. Recomendaciones**

Sobre su aplicación en el campo profesional, el desarrolló experimental de un sistema de diagnóstico dirigido hacia la captura de anticuerpos circulantes en suero de bovinos específicos hacia los antígenos proteicos recombinantes HBHA, MCE2A y PGRS33, tendría una destacada importancia en los sectores:

- + De la ganadería bovina, principalmente en producciones lecheras y cárnicas.
- + La medicina preventiva en hatos con desarrollo productivo holístico, así como de producciones ganaderas tradicionales.
- + Este mismo sistema puede ser aplicado en el diagnóstico de la tuberculosis (Tb) en humanos, y otras especies afectadas por el MTBC.
- + La innovación como antígenos vacunales, empleando HBHA, MCE2A y PGRS33. Esta tiente de uso como posibles antígenos inmunoestimulantes, abre un esquema de combinación para el desarrollo de esquemas vacunales multi-antigénicas en humanos, bovinos, pequeños rumiantes y animales de compañía.

---

## XI. Bibliografía

1. OMS. Global Tuberculosis Programme. [INTERNET] [Actualizado 2022; Consultado 04 de Marzo del 2022] Disponible en: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports> .
2. Conrad A. Patricia, Meel A. Laura, Dumit Joe. Operationalizing a One Health approach to global health challenges. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2013; 36: 211-216.
3. Stephen Craig, Stemshorn Baryy. Leadership governance and partnerships are essential One Health competencies. *One Health*. 2016. 2: Pages 161-163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.10.002>
4. OIE. Tuberculosis Zoonótica: Mapa de hoja de ruta para la tuberculosis zoonótica. [INTERNET] [Actualizado el 2017] [Consultado 04 de Marzo del 2022] Disponible en: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/roadmap-zoonotic-tb.pdf>
5. Dean S. Anna, Forcella Simona, Popelka-Olea Francisco, Idrissi EL. Ahmed, Glaziou Phillippe, Benyahia Amina, et'al. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018. 18(2). 137-138. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30013-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30013-6)
6. Choan M. Frederick. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiology*. 2002. 56; 457-87. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160634>
7. Maggioli F. Mayara, Palmer V. Mitchell, Thacker C. Tyler, Vordermeier Martin H., Waters Ray W. Characterization of Effector and Memory T Cell Subsets in the Immune Response to Bovine Tuberculosis in Cattle. *PLoS One*. 2015. 10(4): e01122571 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122571>
8. Alexander A. Kathleen, Laver N. Peter, Michael L. Anita, Williams Mark, Helden van D. Paul, Warren M. Robin, Pittus van C. Gey Nicolaas. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious Diseases*. 2010. 16(8):1296-9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
9. Rodríguez-Campos Sabrina, Smith H. Noel, Boniotti B. María, Aranaz Alicia. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics

---

and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014; Vol. 9: Page S5-s19.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>

10. Miller Michele, Olea-Popelka Francisco. One Health in the livestock-wildlife interface. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2013. Vol. 36. Issue 3. Pages 236-268.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.07.005>

11. O. Cosivi, J. M. Grange, Daborn C. J., Raviglione M.C., Fujikura, Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., de Kantor I., Meslin F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg Infect Dis. 1998. Vol. 4. Issue 1. Pages 56-70.

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0401.980108>

12. ONU. General Assembly. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. Seventieth. Geneva. 2015. [INTERNET] [Actualizado 25 de septiembre de 2015] [Consultado 04 de Marzo del 2022] Disponible en: [https://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E](https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E)

13. OMS. Una Salud. [INTERNET] [Actualizado el 2021] [Consultado el 04 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>

14. CDC. One Health. [INTERNET] [ Actualizado el 21 de Septiembre del 2017] [Consultado el 04 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>

15. OIE. One Health [INTERNET] [Actualizado el 2021] [Consultado el 04 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>

16. Lebov J., Grieger K., Womack D., Zacarro D., Whitehead N., Kowalczyk B., MacDonald P.D.M. A framework for One Health research. One Health. 2017. Vol. 3: Pages 44-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.03.004>

17. ONU. Sustainable Development 3 Ensure Healthy lives and promote well-being for all ages. [INTERNET] [Actualizado 2021] [Consultado 04 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <https://sustainabledevelopment.un.org/sdg3>

- 
18. CDC. Una Salud. [INTERNET] [Actualizado 2021] [Consultado 04 de Marzo 2022] Disponible en: <https://sustainabledevelopment.un.org/sdg3>
19. OIE. Bovine Tuberculosis. [INTERNET] [Actualizado el 2021] [Consultado 04 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <https://www.oie.int/en/disease/bovine-tuberculosis/>
20. Miller Michele, Olea-Popelka Francisco. One Health in the shirinking world Experinces with tuberculosis at the human-livestock-wildlife interference. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2013; 36(3): 236-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.07.005>
21. Pérez-Guerrero Laura MC, Millán-Suauzo Feliciano MVZ MSc PhD, Arriaga-Díaz Camila Q MSc PhD, Romero-Torres Cecilia MVZ, Escartín- Chávez Minerva MC. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en la zona endémica de Querétaro, México. Salud Pública de México. 2008; 50 286-291.
22. SADER. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). [INTERNET] [Actualizado el 27 de Agosto de 1998] [Consultado el 09 de Julio de 2022] Disponible en línea en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4891270&fecha=27/08/1998#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4891270&fecha=27/08/1998#gsc.tab=0)
23. De Kantor Isabel, Ritacco Viviana. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. Veterinary Microbiology. 2006; 112. 111-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.033>
24. Domingo M., Vidal, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. Reseach in Veterinary Science. 2014. Vol. 97: S20-S29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>
25. Delogu Giovanni, Sali Michela, Fadda Giovanni. The biology of *Mycobacterium tuberculosis*. Mediterranean Journal Hematology Infection. 2013. 5(1). e24363885. DOI: <https://doi.org/10.4084/mjhid.2013.070>
26. Ma Yan, Han Fei, Liang Jinping, Shi Juan, Xue Jing, Li Yong, Li Yong, et'al. A species-specific activation of Toll-like receptor signaling in bovine and sheep bronchial epithelial cells triggered by Mycobacterial infections. Molecular immunology. 2016. 71: 23-33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.01.004>

- 
27. Totte Philippe, Yaya Aboubakar, Sery Amadou, Wesonga Hezron, Wade Abel, Naessens, Niang Mamadou, Thiaccourt Francois. Characterization of Anamnestic T-Cell Responses Induced by Convventional Vaccines Against Contagious Bovine Pleuroneumonia. Plos One. 2013. Vol. (8). Issue 2: e57509. Page1-6. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057509>
28. Olea-Popelka Francisco, Muwonge Adrian, Perera Alejandro, Dean Anna S., Mumford Elizabeth, Erlacher-Vindel Elisabeth, et'al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. Lancet Infect Dis. 2017. 17 e21-5. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(16)30139-6)
29. Ramachandran Anupama. Das J. Chandan & Razik Abdul. Male genital trac tuberculosis: A comprenhensive review of imaging findings and differential diagnosis. Abdominal Radiology. Springer Link. 2013; 46. 1677-1686. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00261-020-02811-0>
30. Wirth Thierry, Hildebran Falk, Allix-Béguec Caroline, Wölbelling Florian, Kubica Tanja, Kremer Kristin, et'ál. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PLoS Pathogens. 2008. 4(9): e1000160. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160>
31. Buddle B.M, Wilson Tania, Lou Dongwen, Voges Hinrich, Linscott Richard, Martel Edmond, Lawrence John C. Evaluation of a comercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine Tuberculosis from Milk Samples from Dairy Cows. Clinical and Vaccine Immunology. 2013. Vol. 20 Issue 12: Pages p1812-1816. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00538-13>
32. Waters W. R., Buddle B. M., Vordermeir H. M., Gormely E., Palmer M. V., Thacker T.C., Bannantine J.P., Stabel J.C., Linscott R., Martel E., Milian F., Foshaung W. & Lawrence J.C., Development and Evaluation o fan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for use in the Detection of Bovine Tuberculosis in Cattle. Clinical and Vaccine Immunology. 2011; 18: 1882-1888. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FCVI.05343-11>
33. McMurray N. David, Kimball M. Scott, Tetzlaff L. Christine, Mintzer L. Carole. Effects of protein Deprivation and BCG Vaccination on Alveolar Macropaghe Function in Pulmonary Tuberculosis. American Review of Respiratory Disease. 1985. Vol. 133 Issue 6:1081-5. DOI: <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.133.6.1081>

- 
34. Casal Carmen, Díez-Guerrier Alberto, Álvarez Julio, Rodríguez-Campos Sabrina, Mateos Ana, Linscott Richard, et'al. Strategic Use of Serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testint. 2014. Vet Microbiol. 4;1703-4:342-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>
35. Houben N. G. Edith, Korotkov V. Konstantin, Bitter Wilbert. Take Five-Type VII secretion systems of Mycobacteria. Biochimia et Biophysica Acta. 2014. Acta 1834(8):1707-17016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.003>
36. Quian Jianing, Run Chen, Wang Honghai & Zhang Xuelian. Role of the PE/PPE Family in Host Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Desing. Frontiers Cellullar Infection Microbiology. 2022.10.1-8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.594288>
37. Menozzi Franco D., Rouse Julie H., Mohammad Alavi, Laude-Sharp Marilyn, Müller Jacqueline, Bischoff Rainer, Brennan Micheal J., Loch Camile. Identification of Heparin-binding Hemagglutinin Present in Mycobacteria. The Journal of Experimental Medicine. 1996. 184(3): 993-1001. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.993>
38. Shin A-Rum, Lee Kil-Sook, Kim Su-Young, Song Chang-Hwa, Jung Saet-Byel, Jo Eun-Kyeong, et'al. *Mycobacterium tuberculosis* HBHA Protein Reacts Strongly with the Serum Immunoglobulin M of Tuberculosis Patients. Clinical and Vaccine Immunology 2006; 13(8): 869-875. DOI: <https://doi.org/10.1128/cvi.00103-06>
39. Veyron-Churlet Romain, Dupres Vicent, Saliou Jean.Michel, Lafont Frank, Raze Dominique & Loch Camile. Rv06613c/MSMEG\_1285 Interacts with HBHA and Mediates Its Proper Cell-Surface Exposure in Mycobacteria. International Journal of Molecular Sciences. 2018. 19(6):1673. 1-16. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19061673>
40. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley L. W. Cloning an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survivial inside cells. Science. Sep 1993. 10;261(5127):1454-7. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.8367727>
41. Gioffré Andrea, Infante Eduardo, Aguilar Diana, De la Paz Santangelo, Klepp Laura, Amadio Ariel, Meikle Virginia,

- 
- Etchoury Ignacio Romano María Isabel, Cataldi Ángel, Pando Hernández Rogelio. Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes and Infection*. 2005; 7: 325-334. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.11.007>
42. Fenn Katherine, Wong Tung Chi & Darbari Chandran. *Mycobacterium tuberculosis* Uses Mce Proteins to Interfere With Host Cell Signaling. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020; Vol. 6:149. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00149>
43. Singh Pratibha, Katoch V.M., Mohanty K.K. & Chauhan Singh Devendra. Analysis of expression profile of *mce* operon genes (*mce1*, *mce2*, *mce3* operon) in different *Mycobacterium tuberculosis* isolates at different growth phases. *Indian J. Med. Rev.* 2016. Vol. 143: pp 487-494. DOI: <https://doi.org/10.4103/0971-59-16.184305>
44. Cohen Ingrid, Parada Cristina, Acosta-Gio Enrique & Espitia Clara. The PGRS domain from PE\_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is target of humoral immune response in mice and humans. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00236>
45. Brennan J. Michael. The Enigmatic PE/PPE Multigene Family of Mycobacteria and Tuberculosis Vaccination. *Infection and Immunity*. 2017. Vol. 85. Issue:6: e:00969-16. Pages 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00969-16>
46. De la Rúa-Domenech Ricardo. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risk, control measures and review of zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2006. 86(2):77-109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>
47. Michel Luise Anita, Müller Borna, Helden Van Paul David. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? 2010. 140(3):37-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.029>
48. Müller Borna, Dürr Salome, Alonso Silvia, Hattendorf Jan, Laisse J.M. Cláudio, Parsons D.C. Sven, Helden van D. Paul, & Zinssatag Jacob. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced Tuberculosis in Humans. *Emerg Infect Dis*. 2013. 19(6):899-908. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1906.120543>
49. Pérez-Lago Laura, Navarro Yurena, García-de-Viedma Darío. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by

- 
- Mycobacterium bovis*: A review. Reseaserch in Veterinary Science 97. 2014. S94-S100.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.008>
50. Thoen O. Charles, Kaplan Bruce, Thoen C. Tyler, Gildsdorf J. Micheal, Shere A. Jack. Zoonotic tuberculosis. A comprehensive One Health approach. Medicina (B. Aires). 2016. 76. N°3:159-65. ISSN 1669-9106.
51. SADER. SIAP. Panorama de la lechería en México [INTERNET] [Actualizado en Mayo del 2020] [Consultado el 28 de Marzo del 2022] Disponible en línea en: <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20Cuarto%20Trimestre%202019.pdf>
52. Waters Ray W., Maggioli Mayara F., Macgill Jodi L., Lyaschenko Konstantin P., Palmer Mitchell V. Relevance of Bovine Tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanism. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2014; 159: 113-132.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.009>
53. National Geographic Society. Fertile Crescent. [INTERNET] [Actualizado el 2021] [Consultado el 04 de Marzo del 2022] disponible en: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/fertile-crescent/>
54. Diamond Jared. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature. 2002. 8;418(6898):700-7.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature01019>
55. Troy S. Christopher, MacHugh E. David, Bailey F. Jilian, Magee A. David, Loftus T. Ronan, Cunningham Patrick, et'al. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature. 2001. 410; 1088-1091.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/35074088>
56. Hershkovitz Israel, Donoghue, Minnikin E. David, May Hila, Lee Y-C Oona, Feldman Michal, Galili Ehud, et'al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. Tuberculosis (Edinb). 2015. Vol. 95(1): S122-6.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.021>
57. Rothschild M. Bruce, Martin D. Larry. Did ice-age bovids spread tuberculosis? Naturwissenschaften. 2006. 93(11):565-9.  
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0145-7>

- 
58. SADER. Tuberculosis Bovina. 2020. [INTERNET] [Consultado el 09 de Julio de 2022] Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-contra-la-tuberculosis-bovina-49517>
59. SENASICA. Situación actual de Tuberculosis bovina. 2021. [INTERNET] [Consultado el 09 de Julio del 2022] [Actualizado el 16 de Febrero de 2022] Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-de-tuberculosis-bovina?state=published>
60. Diario Oficial de la Federación (DOF). Norma Oficial Mexicana NOM-183-SCFI-2012, "Producto lácteo y producto lácteo combinado-denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. [INTERNET] [Consultado el 09 de Julio de 2022] Disponible en línea en: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4693/seecol/seecol.htm>
61. Diario Oficial de la Federación (DOF). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de Higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. [INTERNET] [Consultado el 09 de Julio de 2022] Disponible en línea en: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/3980/salud/salud.htm>
62. Hunter L. Robert MD., PhD. Pathology o POST PRIMARY TUBERCULOSIS of the LUNG: AN ILLUSTRATED CRITICAL REVIEW. *Tuberculosis* (Edinb). 2011. Vol. 91. Issue 6. Pages 497-509. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.03.007>
63. Achkar M. Jacqueline, Chan John & Cassadevall Arturo. B cells and Antibodies in the Defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. 2015. *Immunol. Rev.* 264. (1).: Pages 167-181. DOI: <https://doi.org.10.1111/imr.12276>
64. Smiley J. Donald, § vM.D., Heard G. John & Ziff Morris, M.D. Effector Actinomycin D. on RNA synthesis and anitbody formation in the anamnestic response *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine.* 1964. 119 (6). 881.-893. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.119.6.881>
65. Chan John, Mehta Simren, Bharrhan Sushma, Chen Young, Achkar M. Jacqueline, Casadevall Arturo & Flynn JoAnne. The Role of B cells and humoral immunity *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev.* 2015. 264(1): Pages 167-81. DOI: <https://doi.org/10.1111/imr.12276>

- 
66. Kamath B. Arati, & Behar M. Samuel. Anamnestic Responses of mice Following *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 2005. 73(9). 6110-6118. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.9.6110-6118.2005>
67. Krocova Zuzana, Plzakova Lenka, Pavkova Ivona, Kubelkova Klara, Macela Ales, Ozanic Mateja, Marecic Valentina, Mihelcic Mirna & Santic Marina. The role of B cells in an early immune response to *Mycobacterium bovis*. *Microbial Pathogenesis*. 2020. Vol. 140. Issue 103937. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103937>
68. Kozakiewicz Lee, Phuah Jiayao, Flynn JoAnne & Chan John. The Role of B Cells and Humoral Immunity in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 783: Pages 225-50. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_12)
69. Ramos D.F., Silva P.E.A., Dellagostin O.A. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. 2015. *Braz J. Biol.* 74(4):830-7. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>
70. Hong Weiling, Deng Wanyan, Xie Jianping. Structure, function, and Regulation of *Mycobacterium FtsZ*. *Cell Biochem Biophys*, Springer, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9415-5>
71. Pereira Marcos, Paixão Enny, Trajman Anete, de Souza Andrade Ramón, da Natividade Marcio Santos, Pescarini M. Julia, Pereira Martins Susan, et'al. The need for fast-track, high-quality and low-cost studies about the role of the BCG vaccine in the fight against COVID-19. *Respiratory Research*, 2020. 21:178. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01439-4>
72. Thyssen M. Sanne, S. Byberg, JSD. Martins, P. Kallestrup, U.K. Griffiths, A.B. Fisker. Household costs of seeking BCG vaccination in rural Guinea-Bissau. *Vaccine*. 2019. Vol. 37. Issue 37. Pages 5505-5508.
73. Fontana Stefania, Pacciarini María, Boifava Mery Pellesi Roberta, Castro Barbara, Gastaldelli Michele, et'al. Development and evaluation of two multi-antigen serological assays for the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Journal of Microbiological Methods*. 2018; 153: 118-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.013>

- 
74. Andreasson Ulf, Peeret- Liadudet Armand, Van Doorn J.C. van Waalwijk Linda, Blenow Kaj, Chiasserini Davide, Engelborghs, et'al. A practical guide to Immunoassay Method Validation. *Frontiers in Neurology*. 2015; 6:179. 1-8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>
75. Magnusson Bertil, Örnemark Ulf, Sibbensen P. Lorens, Vercruyse Isabelle, Robouch Piotr, Barwick Vicki, KGaA Merck, et'al. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods Eurachem- A Laboratory Guide o Method Validation and Related Topics. 2014. ed. 2<sup>nd</sup>. [Internet] [Consultado el 06 de Julio del 2022] Disponible en: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd ed EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)
76. Lavers J. Carrie, Dohoo R. Ian, McKenna L.B. Shawn Sensivity and specificity of repeated test results from a comercial milk enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *American Veterinary Journal Association*. 2015. Vol. 246. Issue. 2. Pages 236-44. DOI: <https://doi.org/10.2460/javma.246.2.236>

---

## **XII. Protocolos**

**XIII. I. Protocolo número uno.** ELISA indirecto acoplado con los Ag HBHA, MCE2A: Proteína G-HRP, TMB-DMOSO.

Material:

- Placas de 96 pozos Maxisorp Nunc® (Thermo scientific, 439454®) o Polisorp Nunc® (Thermo scientific, 439454)
- PBS al 1% de Albumina Sérica BSA (Sigma, A2153).
- Albumina Sérica BSA (Sigma, A2153).
- Incubadora.
- Bandeja y cubeta para desechar la solución de lavado.
- Amortiguador de carbonatos.
- Papel plástico.
- Papel aluminio.
- Solución de lavado 10x y 1x.
- Agua desionizada.
- Solución de parado.
- Solución de citratos.
- Tubos de 5 ml.
- Tubos de 1 ml.
- Antígenos.
- Placa reservorio.
- Pipeta multicanal.
- Pipeta de 50, 100, 200, 300 µl.
- Puntas de 50, 100, 200, 300 µl.
- Canaleta receptora.
- Jeringas de 60ml.
- Canaleta de 8 pozos con adaptador de jeringa.
- Toalla de tela.

- 
- Sanitas.
  - Guantes.
  - Gafas de protección ocular.

Procedimiento:

1. Los reactivos se tienen que atemperar previo a ser utilizados, así como el material que se encuentre en congelación.
2. Se debe sensibilizar una placa de 96 pozos Maxisorp®, utilizando el antígeno deseado. Recordar que la placa no debe de ser manejada por la parte inferior.
3. Colocar en la canaleta receptora el buffer de carbonatos y a partir de aquí tomar el volumen necesario para preparar el antígeno a su concentración correspondiente. Una vez realizado esto debemos de colocar 50 µl de buffer de carbonatos con el antígeno a cada pozo. Los controles de UNE y Blanco no llevarán antígeno, solo amortiguador de carbonatos.
4. Tratar de no manejar o dejar en temperatura ambiente los antígenos que se utilizarán, realizar alícuotas. Una vez realizada la dilución y preparado el volumen, con una pipeta multicanal tomar el volumen de 50 µl y depositarlo en los pozos correspondientes.
5. Cubrir con papel plástico y envolver en papel aluminio.
6. Dejarla incubar a 4°C durante 18 horas.
7. Una vez transcurrido este tiempo se procederá a realizar lavados con solución de lavado 1x. Se realizarán 4 lavados enérgicamente. El procedimiento es mediante un movimiento desechar el contenido de los pozos. Con las jeringas y la canaleta adaptada se debe de llenar o al menos sobrepasar el volumen anterior; de un movimiento desechar esto en la bandeja y así durante los 4 lavados; en el último lavado

---

sobre una toalla con una sanita se procederá a golpear enérgicamente el lado superior de la placa para retirar el exceso de humedad. Verificar que los pozos se encuentren secos.

8. Una vez lavado y seco el siguiente paso es el bloqueo con PBS al 1% de BSA. Se agregará 100 µl por pozo, ósea, 10ml por placa y pesar 0.1gr de BSA (recordar que se tiene que hacer la conversión de ml a gr). Colocar en la canaleta receptora y con la pipeta multicanal medir 100 µl y agregar a toda la placa por igual, a UNE's, B0's, blancos y sueros a desafiar. Cerrar con el plástico y tapar con papel aluminio.
9. Dejar incubar a 30°C durante 1 hora.
10. Se repetirá el paso 7.
11. El siguiente paso es agregar el suero problema, controles y/o muestras. Se recomienda que al ser un número de sueros mayor a diez se debe de realizar la dilución en PBS en una placa reservorio y/o tubo. Esto se debe de hacer una noche o varias horas antes y almacenar esto en refrigeración.
12. Con la pipeta multicanal tomar 50 µl de la dilución de anticuerpos o sueros que vamos a utilizar y agregarlos a los pozos de acuerdo al esquema de trabajo. Tapar con el plástico la parte de arriba de la placa y cubrirla con papel aluminio.
13. Dejar incubar durante 2 horas a 30°C.
14. Durante este periodo de incubación vamos a preparar el conjugado con la proteína G diluyéndola en PBS. La relación dependerá de la titulación que se haya determinado del conjugado, por ejemplo: si en una placa se va a utilizar a una concentración de 1/10000 el conjugado y tenemos al conjugado en una dilución 1/100

---

entonces: 100 pozos x 50  $\mu$ l=5000  $\mu$ l por placa.  
(1/10000x5000)  $\div$  1/100= 50  $\mu$ l de PG 1/100 en C.B.P 4950  
 $\mu$ l de PBS.

15. Repetir el paso 7.
16. Con una pipeta multicanal medir 50  $\mu$ l y tomar el conjugado agregando a toda la placa o a los pozos que sean necesarios. Tapar con el plástico la tapa de la placa y cubrirla con papel aluminio.
17. Incubar durante 2 horas a 30°C.
18. Durante la incubación vamos a preparar el sustrato (como en este protocolo se utiliza una proteína G conjugada a una peroxidasa entonces nuestro sustrato debe de ser H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en el cual utilizamos: Solución de citratos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TMB (DMOSO). Para una placa la relación es 12.5ml de solución de citratos+ 2.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 125  $\mu$ l de TMB (DMOSO) y se agregará 100  $\mu$ l por pozo. Solamente podemos preparar la solución de citratos + agua oxigenada, veinte minutos antes de que termine el periodo de incubación debemos sacar el TMB (DMOSO) para que se descongele.
19. Repetir el paso 7.
20. Este paso es muy importante, ya que la principal variable es el contacto con la luz del sustrato, así que debe de ser muy rápida la agregación del sustrato con la pipeta multicanal, colocar 100  $\mu$ l por pozo. Cubrir rápidamente con el plástico y con el papel aluminio y meter a incubar.
21. Incubar durante 30 minutos o menos.
22. En la canaleta receptora colocar la solución de parado (ácido sulfúrico).
23. Pasado los 30 minutos de incubación con el sustrato preparar una pipeta multicanal y ponerla a 50  $\mu$ l por pozo, se deberá de agregar de manera inmediata y proteger de la

luz con el papel aluminio. Los pozos se tornarán de un color amarillo.

24. Una vez agregado la solución de parado tenemos 15 minutos para medir en el lector de placas a una longitud de onda de 450nm.

25. Interpretar los resultados.

Los controles utilizados en el ensayo fueron UNE o unión no específica, siendo sensibilizado el pozo con el antígeno pero sin el anticuerpo primario; Blanco en el cual no se sensibilizó el pozo con el antígeno y se seguía con el protocolo a partir del bloqueo con BSA al 1%; como control negativo se utilizó el suero fetal bovino a una dilución 1/50; y como control positivo de ensayo se utilizó el suero de conejo a una dilución previamente establecida de 1/500, diluido en PBS (la preparación de las soluciones se encuentra descrita en la sección de protocolos soluciones para ELISA). La evaluación de los controles se realizó por triplicado en cada ensayo del trabajo.

### *XIII. I. I. Soluciones de ensayo para el ELISA indirecto*

Solución 1:

Amortiguador de carbonatos

0.05M, pH 9.6

		1 lt	500ml
A	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (J.T. Baker, 3602)	1.59 g	0.795 g
B	NaHCO <sub>3</sub> (J.T. Baker, 3506)	2.93 g	1.46 g
	NaN <sub>3</sub> (Sigma, S2002)	0.2 g	0.1 g

	H <sub>2</sub> O desionizada	1 l	500 ml
--	---------------------------------	-----	--------

Una vez mezclado todo medir el pH 9.6 y ajustar con NaOH.  
Almacenamiento a 4°C.

### Solución 2

Amortiguador de fosfatos salinos (PBS)

0.1M, pH7

		1 litro	500 ml
A	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.2M) (J.T. Baker, 3818-01)	10.842 g	5.421 g
B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.2M) (J.T. Baker, 3828-01)	17.324 g	8.662 g
	NaCl (J.T. Baker, 3624-05)	8.7 g	4.35 g
	BSA	1 g	0.5 g
	H <sub>2</sub> O desionizada	1 l	500 ml

Antes de agregar el BSA, medir el pH (7.0) y ajustar con NaOH.  
Almacenamiento a 4°C.

### Solución 3

Solución de lavado Stock 10X

	2 litros	1 litro	500 ml
NaCl 1-5 M	175.32 g	87.66 g	43.83 g
Tween 20 al 0.5% (Sigma, P1379)	10 ml	5 ml	2.5 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	2 l	1 l	500 ml

A partir de aquí se prepara a 1x cuando se vaya a utilizar.

Almacenamiento a temperatura ambiente.

---

#### Solución 4

Solución de citrato. (0.05M, pH 4)

Cantidad	Ácido cítrico (Sigma, C0759)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
1 litro	9.605 g	1 l
500 ml	4.8 g	500 ml

Ajustar pH 4 con NaOH. Almacenamiento a 4°C

**XIII. II. Protocolo número dos.** Inmunización en becerras libres de tuberculosis para la estimulación de producción de anticuerpos en contra de dos proteínas ( $\alpha$ HBHA y  $\alpha$ MCE2A) de *Mycobacterium tuberculosis*, detección de IFN- $\gamma$  y la evaluación de anticuerpos en los animales inmunizados por medio de un ensayo ELISA indirecto.

#### Material

- Tubos con tapa roja (sin anticoagulante).
- Tubos con anticoagulante (ADC y/o heparina)
- Guantes de nitrilo.
- Lentes de seguridad.
- Torundas con alcohol al 70%.
- Desinfectante micobactericida.
- Cloro.
- Vacutainer con aguja.
- Sanitas.
- Manga de manejo.
- Cuerdas.
- Contenedor para transportar los tubos.
- Plumón negro indeleble.
- Centrifuga.

- Gradilla para tubos de 2 ml.
- Gradilla para tubos de 10 ml.
- Micropipetas.
- Pipetas de transferencia.
- Contenedor para material punzocortante.
- Bolsa roja.
- Navaja para rasurar.
- Bolsa transparente para desecho de material no expuesto a residuos biológicos.
- Animales: 6 terneras de 6 meses de edad.

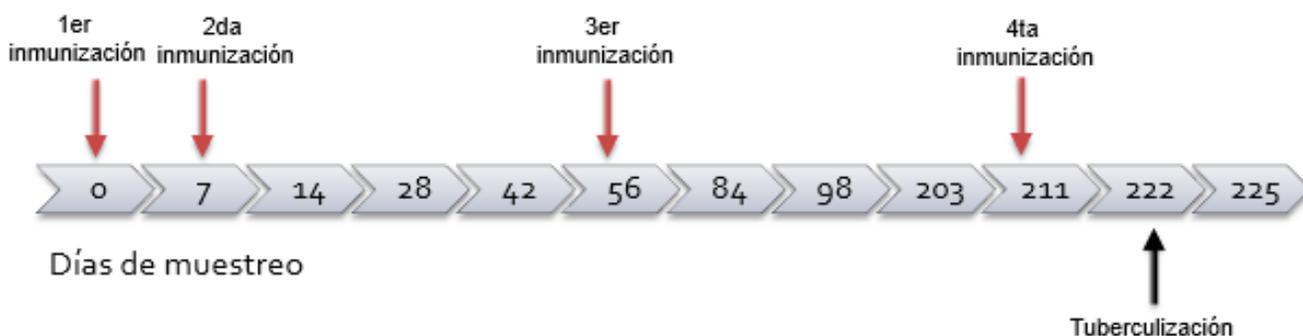
Distribución de animales.

Identificación	Antígeno	Adyuvante
Tenera 765	HBHA	Hidróxido de aluminio
Tenera 764		
Tenera 163		
Tenera 161	MCE2A	
Tenera 762		
Tenera 162		

Se distribuyeron las becerras de seis meses de edad en dos grupos de tres animales por grupo. El grupo uno inmunizado con el Ag HBHA y el grupo dos con el Ag MCE2A.

XIII. II. I. Plan de trabajo.

Línea de tiempo de muestreos realizados, inmunizaciones y prueba de tuberculina



Se realizó un plan de trabajo donde se realizarían las inmunizaciones en cuatro períodos distintos, las dos primeras inmunizaciones con quince días entre cada una y la tercera con un espacio de tiempo de treinta días.

XIII. II. II. Relación para inmunizar becerras, respecto a la concentración antígeno/adyuvante

Identificación de antígeno.	Concentración del Stock.	Concentración para inmunizar.	Cantidad para inmunizar del Stock (µl)	µl para realizar cuatro inmunizaciones
HBHA	200µg/ml	100µg	500 µl	2 ml
MCE2a	120µg/ml	100µg	833.33 µl	3.33 ml

\*Varía dependiendo la concentración que venga el vial con el antígeno, la relación de inmunización es 1:1 antígeno con respecto al adyuvante, HBHA y MCE2A.

X. III. IV. Procedimiento de inmunizaciones y muestreos de sangre para la posterior separación de suero y colecta de células para la estimulación con Pookedweed® para la medición de IFN-γ

- 
1. Se deberá realizar la identificación previa de los tubos con y sin anticoagulante, también realizar la identificación individual de cada ternera, recabar la historia clínica y anamnesis de los bovinos a los cuales se van a inmunizar.
  2. Una vez los bovinos en la manga de manejo realizar la toma y obtención de sangre en tubos con y sin anticoagulante, realizar la venopunción en la vena caudal con un sistema de vacío en tubos rojos y tubos morados. Homogeneizar de manera gentil el tubo con EDTA, y el tubo sin anticoagulante.
  3. A nivel de la región pre-escapular rasurar el pelo aproximadamente una zona de 10 x 15 cm. Asegurarse que se encuentre seca la zona.
  4. Desinfectar con alcohol al 70%
  5. Realizar la inmunización intradérmica en la región pre-escapular.  

Nota: el inmunógeno se debe preparar en el laboratorio homogeneizado con el coadyuvante hidróxido de aluminio en relación 1:1 para realizar la aplicación una vez en con el animal a inmunizar.
  6. Evaluar si existe algún tipo de inflamación local en la zona posterior a la aplicación el antígeno (72 horas posterior a la aplicación).  

Nota: Se deberá dejar un registro y/o aviso al encargado del hato o de los animales para que notifique por cualquier anomalía suscitada.
  7. Realizar la siguiente inmunización siguiendo los pasos anteriores de acuerdo al calendario de inmunización.
  8. Una vez obtenida la muestra de sangre en tubos sin anticoagulante, se deberá transportar en refrigeración sin contacto directo con calor o exposición al sol.

---

9. Ya en el laboratorio las muestras colectadas se centrifugarán a 3500-4000rpm por minuto durante 15 minutos para separar las fases de la sangre, solo se colecto el suero. Si es posible realizar este paso el mismo día de colecta de sangre.

*Nota: las muestras de sangre colectadas en tubos con EDTA para la cosecha de células para la estimulación con Pookedweed® para determinar la concentración de IFN- $\gamma$ , se realizó por el tutor principal.*

10. En el laboratorio con las muestras obtenidas de suero realizará la siguiente actividad: realizar una prueba de ELISA indirecto para medir los anticuerpos presentes en el animal y valorar la producción de anticuerpos en contra del antígeno utilizado (revisar [Protocolo Número Uno](#) para la prueba de ELISA con los antígenos HBHA y MCE2A).

### **XIII. Anexos**

**XIV. I. Anexo 1.** *Objetivos de Desarrollo Sostenible (ONU: ODS's) & La Medicina Veterinaria y Zootecnia como herramienta para su cumplimiento.*

Los objetivos de desarrollo sostenibles son una agenda de planes de acción para el planeta, su gente y la prosperidad. En septiembre del 2015 se creó "The High -level Political Forum on Sustainable Development" como plataforma para darle seguimiento y revisión a la agenda adoptada para 2030 por los países que conforman la ONU. En este plan se encuentra enmarcados 17 objetivos de desarrollo sostenible y 169 metas, cada una para lograrse sin dejar de paso al otro. "We are determined to take the bold and transformative steps which are urgently needed to shift the world onto sustainable and resilient path" ([3](#), [12](#), [17](#)). La medicina veterinaria y

---

zootecnia puede fortalecer las acciones y estrategias empleadas la agenda de SDG's dentro de su universo de aplicación práctica, like a stakeholders. En al menos 8 de los 17 ODS's se encuentran estrechamente relacionado con el ejercicio de la veterinaria, y en los restantes se abordan desde otras perspectivas y campos de acción para el cumplimiento de los 17 ODS's. Esto hace que exista una demanda de conocimiento y actualización en el perfil de las próximas generaciones MVZ's para enfrentar estos desafíos y encaminar sus acciones para el logro de los ODS's ([3](#), [12](#), [17](#)).

El ODS 3 trata de englobar y abordar los problemas de la salud como un conjunto de acciones y estrategias que incluya una visión holística. En lo particular la tuberculosis toma un papel importante como meta de erradicación en todas sus formas, la cual como se trata en el presente trabajo es de suma importancia que la medicina veterinaria ponga sus mayores esfuerzos al uso de las herramientas para crear soluciones ante esta meta del ODS3. "Goal 3. Ensure Healthy lives and promote the well-being for all at all ages" a cumplirse en el 2030 ([17](#)).

#### **XIV. II. Anexo 2. Enfoque Una Sola Salud**

El enfoque de Una Sola Salud es un esfuerzo para realizar trabajos multisectoriales e interdisciplinarios en el que se atienden los problemas de la salud existentes o nuevas amenazas en la red de animales-plantas-humanos y el medio ambiente en el que interactúan. Las principales instituciones involucradas son la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de la Salud Animal OMSA (fundada como OIE) y la Organización de las Naciones Unidas (ONU). Una de las áreas de trabajo del enfoque de una sola salud es atender las enfermedades zoonóticas que hasta ahora se estima que un 60%

---

de las enfermedades infecciosas en humanos son zoonosis ([2](#), [3](#), [10](#)).

Desde que nació este concepto en el 2000, se ha analizado y conceptualizado los diseños y estrategias de acción para la implementación de una investigación con un enfoque en una sola salud, en donde los equipos interdisciplinarios propongan retos y alternativas para optimizar e integrar de una forma holística los componentes del caso a estudiar (animales, humanos y su impacto) así como los retos en el futuro en el medio ambiente en donde se desenvuelven) ([13-16](#), [18](#), [20](#)).

La necesidad de Médicos Veterinarios preparados para atender de una manera holística la integración de la salud animal con el medio ambiente con los humanos es fundamental en el ejercicio diario del veterinario. Como pieza clave en el enfoque de una sola salud, el médico veterinario debe de cumplir con aptitudes inherentes de los agentes aplicantes del enfoque una sola salud, también debe de innovar en su práctica diaria incluyendo a todos los niveles posibles interesados en los beneficios de una sola salud, distintos niveles de gobierno, productores, médicos, etc. ([13-16](#)).

La tuberculosis zoonótica es una forma de tuberculosis en humanos principalmente propagada por cepas relacionadas cercanamente al complejo de *M. tuberculosis* (MTBC) ([28](#), [47-50](#)).

En 2017 la OMSA en conjunto con otras organizaciones internacionales lanzaron la hoja de ruta para combatir la tuberculosis zoonótica, basada en el enfoque de Una Sola Salud incidiendo el problema desde tres ejes centrales ([4](#)):

- ❖ Mejorar las bases de la evidencia científica.
- ❖ Reducir la transmisión en la interfaz hombre-animal.

- 
- ❖ Fortalecer los enfoques intersectoriales y de colaborativos

El término de Una Sola Salud fue empleado para describir la colaboración multidisciplinaria/interdisciplinaria necesaria entre la medicina y la medicina veterinaria para combatir las enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes o descuidadas, como el caso de la tuberculosis bovina y la tuberculosis zoonótica ([13-16](#), [47-50](#)).