

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA VACUNA ADN HSP65
EN BOVINOS INFECTADOS CON *MYCOBACTERIUM BOVIS*.**

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:
MVZ. JOSÉ CARLOMÁN HERRERA RAMÍREZ

MEXICALI, B.C. MÉXICO.

JUNIO DEL 2008

Evaluación del Efecto Terapéutico de la Vacuna ADN Hsp65 en Bovinos Infectados con *Mycobacterium bovis*. Tesis presentada por José Carlomán Herrera Ramírez como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista
Director Principal

MC. Gilberto López Valencia
CoDirector

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

MC. Alfonso De la Mora Valle
Asesor

M.C. Rosa María Bermúdez Hurtado
Revisor Invitado

Mexicali, Baja California a Junio de 2008.
Lugar y Fecha

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE FIGURAS	li
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	3
Objetivo	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Etiología	4
Epidemiología	4
Formas de Contagio	7
<i>Transmisión Respiratoria</i>	7
<i>Transmisión Oral</i>	7
<i>Transmisión Cutánea</i>	8
<i>Transmisión Congénita</i>	8
<i>Transmisión Iatrogénica de las Glándulas Mamarias</i>	8
Patogenia	8
Inmunología	10
Macrófagos	11
<i>Evasión de las Funciones Antimicrobiales de los</i> <i>Macrófagos</i>	13
Células Dendríticas (CD)	13
Linfocitos T CD8 ⁺	13
Linfocitos CD1 Restrictivos	14
Acción Inmunológica de las Vacunas ADN	15
Signos Clínicos	16
Métodos de Diagnóstico	17
Normatividad Mexicana para el Diagnóstico de la TBB	17
<i>Diagnóstico bacteriológico</i>	17
<i>Diagnóstico histopatológico</i>	18

<i>Forma de envío de muestras para el aislamiento bacteriológico</i>	18
<i>Forma de envío para el estudio histopatológico</i>	18
Examen Físico	18
Patología	19
Bacteriología	19
Tuberculina	19
Serología	20
Técnicas Moleculares	20
Estudios sobre Sensibilidad y Especificidad	22
Prevención	23
Zoonosis	23
Tratamiento	25
Isoniazida	25
Métodos de Control y Erradicación	26
Vacunación contra TBB	27
BCG	27
Vacunas BCG recombinantes	30
Vacunas Proteica	31
Vacunas ADN	32
MATERIALES y MÉTODOS	36
Localización	36
Criterios de Inclusión	36
Selección de Animales	36
Prueba de Tuberculina (PPD)	37
Recolección de sangre para los ensayos de Gamma Interferón (IFN- γ)	37
Antígenos utilizados para IFN- γ	37
Vacuna ADN Hsp65	38
Prueba IFN- γ	38
Prueba de Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	39

Inmuno Blot	39
Vacunación	40
Análisis Estadístico	40
RESULTADOS	41
Producción de Gamma Interferón	41
Presencia de Anticuerpos Anti-Hsp65	41
Excreción de <i>M. bovis</i> en Secreción Nasal	42
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	44
LITERATURA CITADA	45

LISTA DE CUADROS

Revisión de Literatura

	Pág.
Cuadro 1. Criterio de Diagnóstico utilizado para interpretar las reacciones de piel debido a la prueba de tuberculina intradérmica	21
Cuadro 2. Reporte de casos, revisiones y reportes epidemiológicos concernientes a casos de tuberculosis humana debido a <i>Mycobacterium bovis</i> entre 1966 – 2005, distribuidos por década, región o país de origen	24
Cuadro 3. Células productoras de IFN- γ o IL-4 en respuesta a PMA plus anti CD3 entre células T CD4 y CD8 de ratones inmunizados	34

Experimento

	Pág.
Cuadro 4. Excreción de <i>M. bovis</i> en secreción nasal	42

LISTA DE FIGURAS

Revisión de Literatura

Figura 1. Filogenia de <i>Mycobacterium</i> según velocidad de crecimiento ..	Pág. 5
---	-----------

Experimento

Figura 2. Media IFN- γ , muestreos 0, 3, 6 y 9 meses	Pág. 41
---	------------

RESUMEN

La Tuberculosis Bovina es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, *Mycobacterium bovis* es el microorganismo causal, perteneciente al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*; ocasiona enormes pérdidas económicas en la industria ganadera, y es de suma importancia en salud pública. A través de los años múltiples programas de control y erradicación, así como vacunas han sido empleados con la finalidad de eliminar este problema, con resultados variables y poco prometedores. En este estudio se analizó la vacuna ADN Hsp65 la cual podría ser una herramienta de control y prevención eficaz contra esta enfermedad. Luego de un periodo de estudio de un año, con tres aplicaciones de vacuna, donde el grupo vacunado presenta una disminución significativa en la producción de gamma interferón respecto al grupo no vacunado, con respecto a la prueba de PCR no existe una diferencia estadística en la prueba de comparación de proporciones entre los grupos vacunados y no vacunados con un $p=0.2051$ con un nivel de confianza del 95%.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis Bovina (TBB), es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), la cual es miembro del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). La TBB representa un problema serio para la industria ganadera mundial, ya que genera pérdidas económicas por decomiso y reducción en la producción de leche hasta en un 17% (NOM-EM-017-ZOO-2005); además constituye un riesgo de salud pública en un gran número de países en desarrollo. Existen mundialmente más de 50 millones de bovinos infectados con *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2004). En humanos reportes epidemiológicos hablan de alrededor de 2.9 millones de muertes anuales desde 1990 debido al complejo *M. tuberculosis*, colocando a esta enfermedad como la más distribuida en el mundo (Kochi, 1991). Por otra parte Raviglione, et al., (1995) menciona que se detectan 8 millones de casos

nuevos de tuberculosis humana y 3 millones mueren por esta causa. Durante los años 30's y 40's *M. bovis* fue la causa de muerte de alrededor de 2000 humanos por año en Inglaterra y Gales (Vordermeier et al., 1999). En países en desarrollo *M. bovis* es el agente causal en el 10% de casos de TBB en humanos. En México, el 28% de la leche se comercializa sin pasteurizar para la preparación de quesos y derivados (NOM-EM-017-ZOO-2005), lo que genera un alto riesgo para la salud pública. En Baja California la Tuberculosis pulmonar en humanos ocupa el primer lugar con respecto a los estados fronterizos con una tasa de 58 casos/100,000 habitantes (Boletín Epidemiológico-OPS, 2000). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), mediante la campaña de control nacional permanente de carácter oficial, basada en la detección y sacrificio de los animales positivos a la prueba de tuberculina utilizando el Derivado Proteico Purificado (PPD), bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-017-ZOO-2005), no ha logrado reducir ni erradicar la Tuberculosis en ganado de nuestro país. Una de las razones por las que esta campaña no ha tenido éxito en su propósito es que no existe un programa de indemnización que permita disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por el sacrificio de animales positivos. En Gran Bretaña durante una reunión científica donde se analizó el incremento de la TBB se concluyó que el desarrollo de una vacuna en el ganado sería la mejor opción para el control de la TBB a largo plazo (Buddle, et al., 1999). La vacunación de animales domésticos en países en desarrollo es la opción más factible tanto por razones económicas como de mejoras a la salud pública. En hatos de ganado lechero en Baja California, como la cuenca lechera de Tijuana, la TBB es un gran problema por su alta prevalencia lo que genera la necesidad de iniciar un programa de vacunación y que se empleen y desarrollen nuevas vacunas para reducir esta epidemia. La vacunación en conjunto a un buen diagnóstico y manejo de los hatos, son las piezas fundamentales en los programas de control epidemiológico de la TBB. La vacuna de ADN Hsp65 ofrece la posibilidad de no solo prevenir la TBB sino también tratar los casos

positivos de TBB, utilizando varias dosis de refuerzo, sin ocasionar respuestas de intradermorreacción (Vordermeier, et al., 2003), y a un costo considerablemente bajo. Si se reduce la infección de TBB en animales seguramente la presencia de TB en humanos se reducirá, también aumentaría la producción láctea, y el bienestar general del hato por lo que el presente estudio es de gran importancia.

Hipótesis

Los animales infectados y vacunados con vacuna ADN-Hsp65 (*M. leprae*) presentan una respuesta mayor a la prueba de gamma interferón que los animales infectados no vacunados.

Para responder lo anterior, se estableció el siguiente objetivo:
Evaluar el Efecto Terapéutico de la Vacuna de ADN Hsp65 en Bovinos Infectados con *Mycobacterium bovis*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

La TBB es causada por la bacteria *M. bovis*, la cual es un bacilo no fotocromogénico ácido resistente de lento crecimiento. La TBB puede ser transmitida del ganado bovino a los humanos y, por esto, es considerada una zoonosis. Este microorganismo es miembro del Complejo *M. tuberculosis*, una designación que, aunque sin estatus taxonómico, incluye importantes patógenos animales y humanos. Adicionalmente a *M. bovis*, otros miembros del complejo incluyen *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium microti*. Otros hospedadores adaptados a la variante de *M. bovis* ha sido designado como *Mycobacterium pinnipeddi* (adaptado a focas) y *M. caprae* en ovinos (Thoen et al., 2006¹). *M. bovis* puede ser aislado de ganado doméstico y salvaje, así como de, cerdos, ovejas, borregos, tejones, liebres, humanos, primates no humanos, entre otros (Howard y Smith, 1999). En la Figura 1 se puede observar el árbol filogénico de las micobacterias basado en la secuencia 16S rARN, y clasificados en su crecimiento.

Epidemiología

M. bovis es un patógeno obligado pero puede sobrevivir por periodos substanciales en el medio ambiente bajo condiciones favorables. Esta habilidad ha sido demostrada en estudios observacionales sobre la sobrevivencia del organismo seguido en ambientes contaminados naturales o artificiales (Morris et al., 1994).

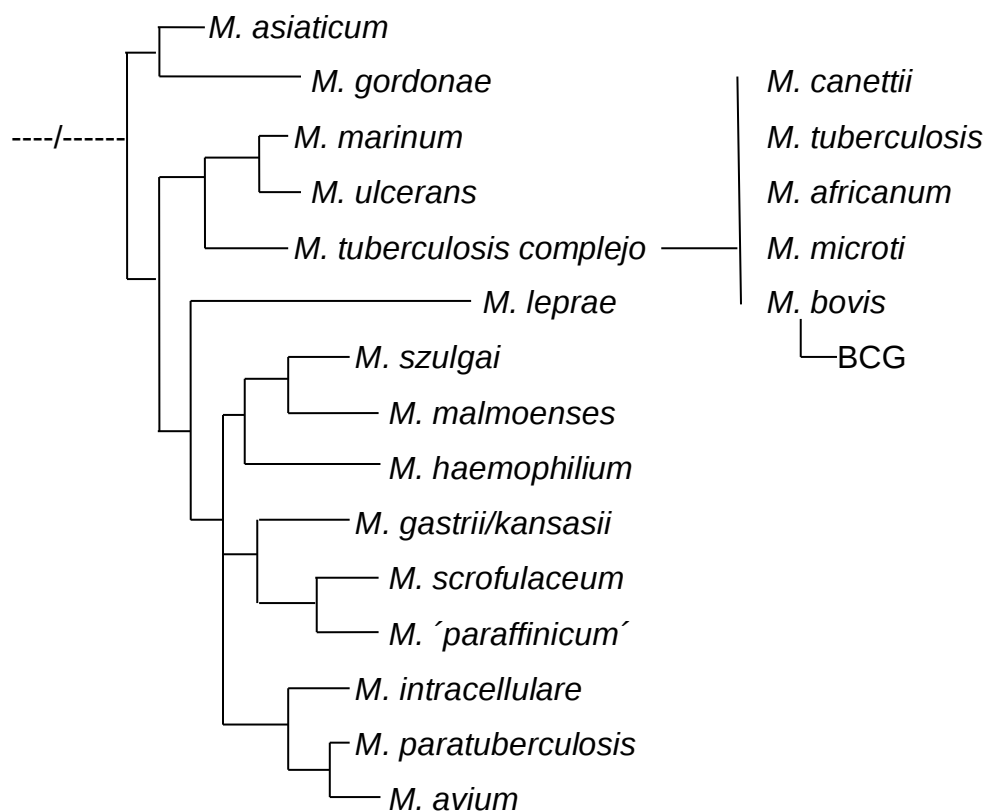
Aunque la tuberculosis en ganado se ha reconocido por mucho tiempo, muchos aspectos de su epidemiología no han sido aún elucidados. La falta de conocimiento, ha generado que aún en países desarrollados, como Reino Unido e Irlanda no haya sido posible su erradicación. El factor determinante más

Figura 1. Filogenia de *Mycobacterium* según velocidad de crecimiento.

Rápido crecimiento

----/----- *M. Smegmatis*

Lento crecimiento



Adaptado de Biet et al., 2005.

importante para la ocurrencia y diseminación de TBB en hatos ganaderos, es la cantidad de animales expuestos a animales infectados, el número de animales infectados en el hato, el número de animales jóvenes expuestos, las prácticas de hato actuales y las medidas tomadas para prevenir la diseminación de la enfermedad (Coetzer y Tustin, 2004). Un obstáculo potencial en el control de la TBB en el Reino Unido es la existencia de tejones (*Meles meles*) como un reservorio silvestre, y la presencia de *M. bovis* en el medio ambiente donde el organismo puede sobrevivir por meses (Courtenay et al., 2006). La incidencia de TBB en el ganado Británico se ha incrementado exponencialmente desde 1984 y tiene un costo anual que se proyecta a alcanzar 1 billón de libras esterlinas para el 2011. En 2004, el 5% de las granjas lecheras en el Sureste de Inglaterra, y el 1.8% nacionalmente, ha confirmado el problema (breakdown) (Mathews et al., 2006).

Poco se conoce acerca de los factores que gobiernan la prevalencia de la TBB, como es el caso de Tanzania donde por ejemplo, altas prevalencias han sido reportadas en el sureste, en grandes hatos pero no en la zona este. Este país posee una abundante y variada diversidad de vida silvestre, aún no existe información disponible del rol de la vida silvestre como una fuente potencial de infección para el ganado y/o humanos (Cleaveland et al., 2007). Un estudio para medir factores de riesgo en Inglaterra, encontraron que el movimiento de ganado hacia mercados o granjas de ventas incrementan el riesgo de TBB con un odds ratio (OR) de 3.26 y 1.93, respectivamente. Mientras que el esparcimiento de fertilizantes artificiales y abono de corral en la tierra de pastoreo, se asocian ambos con la disminución del riesgo de TBB con un OR de 0.21 y 0.42 respectivamente (Johnston et al., 2005). La presencia de reservorios silvestres, como es el caso de los tejones en Inglaterra, donde en un estudio realizado por 32 meses analizando tejones localizados en 16 de los 22 territorios, se encontró que el 11.5% excretaban *M. bovis*. Por lo que en la evaluación el ambiente como un potencial reservorio de *M. bovis* es un importante paso para entender la transmisión (Courtenay et al., 2006).

Formas de Contagio: Existen varias rutas de contagio para *M. bovis*, pero las primarias son la vía tracto respiratoria y gastrointestinal. Estudios experimentales involucran la exposición de animales a *M. bovis* vía diferentes rutas, tales como, intratraqueal, oral, intravenosa e intraperitoneal; que demuestran que la naturaleza y extensión de las lesiones tuberculosas varían según la ruta de infección; la cual se ve afectada según la forma en como *M. bovis* se disemina en el huésped infectado (Thoen et al., 2006¹).

Transmisión Respiratoria: Vía inhalación de aerosoles contaminados o fómites son las formas más eficientes de transmisión, requiriendo un mínimo de organismos como dosis infectiva. La transmisión de *M. bovis* vía inhalación es efectiva en animales que se mantienen en confinamiento y en animales silvestres libres que mantienen grupos sociales o familiares con alta densidad poblacional (Coetzer y Tustin, 2004). La transmisión vía respiratoria ha sido demostrada experimentalmente en una gran variedad de especies, y los nódulos linfáticos asociados con el tracto respiratorio, particularmente los bronquiales y mediastínicos, son los mayormente afectados por inhalación de *M. bovis* (Thoen et al., 2006¹).

Trasmisión Oral: Se debe al consumo de alimento o agua contaminada con moco o secreciones nasales, heces u orina que contienen el bacilo de la TBB, por parte de animales no infectados vía respiratoria, o que reciben leche de un animal infectado; son lesiones raras, pero pueden presentarse en las tonsilas y faringe, así como nódulos linfáticos mesentéricos, mediastínicos o bronquiales. Lesiones adicionales pueden diseminarse de áreas primarias hacia otras áreas (Howard y Smith, 1999). La leche se ha mantenido con el principal modo de transmisión del bacilo tuberculoso del bovino hacia el humano. No cabe la menor duda de que el consumo de leche contaminada es la principal causa de tuberculosis abdominal y otras manifestaciones no pulmonares de la enfermedad. La tuberculosis es una enfermedad principalmente de tipo pulmonar, solamente el 1% de la tuberculosis en vacas el bacilo tuberculoso es

eliminado por leche, y las vacas probablemente transmitan la enfermedad a través de una ruta aérea (Grange y Yates, 1994).

Transmisión Cutánea: Requiere la contaminación de lesiones primarias con el bacilo tuberculoso (Neil et al., 1994).

Transmisión Congénita: La vía son los vasos sanguíneos umbilicales del feto durante una infección presente en el útero de la vaca. En raras ocasiones, la transmisión genital ocurre cuando los órganos sexuales se encuentran tuberculosos o el prepucio está contaminado (Neil et al., 1994). Es de importante consideración en hatos con infecciones crónicas con alta prevalencia de tuberculosis debido a la relativa alta prevalencia de tuberculosis endometrial (Coetzer and Tustin, 2004).

Transmisión Iatrogénica de las Glándulas Mamarias: Ocurre como resultado de aplicar infusiones contaminadas (Neil et al., 1994).

Patogenia

La exposición del ganado a aerosoles de *M. bovis* es considerada la ruta más frecuente de infección; las lesiones al macro usualmente involucran los pulmones y los nódulos linfáticos torácicos. El ganado expuesto vía ingestión de comida o agua contaminada con *M. bovis* casi siempre desarrolla focos primarios en tejidos linfáticos asociado con el tracto intestinal. Otras micobacterias incluidas *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* y *M. tuberculosis* pueden inducir sensibilidad a la prueba dérmica de tuberculina, pero no producen una enfermedad progresiva pulmonar en el ganado. La limpieza mucociliar por moco y epitelio ciliar en los pasajes respiratorios superiores proveen una defensa contra la infección por inhalación de micobacterias. Sin embargo, microorganismos en pequeñas partículas como

polvo o gotas de agua que no se afectan contra la capa mucociliar y pueden pasar a través de los bronquiolos terminales, y así tienen acceso a los espacios alveolares. El tamaño estimado de la terminación de los bronquiolos terminales es aproximadamente de 20µm comparado con 1-4 µm del bacilo ácido resistente. Seguida la exposición por aerosoles, *M. bovis* es transportado a los pasajes pequeños de aire donde son ingeridos por fagocitos. Los fagocitos pasan a través del revestimiento de los bronquiolos, entran a la circulación y son transportados a los nódulos linfáticos, parénquima de pulmones y otros sitios. Después de la ingestión de los bacilos, los macrófagos mononucleares intentan matar el organismo; sin embargo, el bacilo tuberculoso virulento posee la habilidad de escapar de la destrucción. La ingestión del bacilo tuberculoso por los fagocitos en fagosomas o vacuolas intracitoplasmáticas protege a los organismos de los componentes bactericidas en el suero. Seguido de la ingestión por los fagocitos, la micobacteria efectivamente previene la fusión del fagolisosoma y la acidificación. La respuesta celular intenta controlar la enfermedad resultando en la acumulación de un gran número de fagocitos, y finalmente la formación de lesiones macroscópicas, denominados tubérculos. Después de 10-14 días, en modelos murinos, las respuestas desarrolladas por la inmunidad mediada por células (IMC) y los macrófagos del huésped tienen un decremento en la capacidad de destruir al bacilo intracelular. Las respuestas IMC son mediadas por los Linfocitos T, los cuales liberan linfocinas que atraen, inmovilizan y activan adicionalmente las células mononucleares de la sangre y médula ósea a los sitios donde la micobacteria virulenta o sus productos están. La hipersensibilidad celular contribuye al desarrollo de muerte celular y destrucción tisular (necrosis caseosa). En algunos casos licuefacción y formación de cavidades ocurren como resultado de acción enzimática en proteínas y lípidos. La ruptura de estas cavidades dentro de los bronquios permite la diseminación del bacilo por aerosoles. Macrófagos activados migran a las terminaciones de los nódulos linfáticos, tanto bronquial como mediastínico. Los nódulos linfáticos son más comúnmente infectados que otros tejidos debido a que los fluidos en un animal eventualmente pasan a través de

los nódulos, donde la red de trabéculas atrapa al microorganismo. Las lesiones primarias casi siempre están localizadas en un nódulo o nódulos y pueden ser extensas y firmes. La fibrosis del tejido conectivo se desenvuelve en la formación dinámica de un granuloma que probablemente contribuye a la localización de las lesiones. La formación del granuloma es un intento del huésped de localizar el proceso de la enfermedad y permite que los mecanismos inflamatorios e inmunes destruyan al bacilo. Pocas lesiones pueden aparecer como en estado de regresión mientras comienzan a encapsularse por un bien organizado tejido conectivo, mientras que, algunas lesiones pueden contener al bacilo viable. Típicamente, la apariencia microscópica de un granuloma (tubérculo) es focal y tiene algunas áreas de necrosis caseosa en la región central encerrada por una zona de células epiteloideas, linfocitos y algunos granulocitos. La mineralización puede estar presente en los centros necróticos; en lesiones avanzadas, algunos focos de mineralización pueden estar unidos. Células multinucleares gigantes, con núcleos en forma de herradura o anillo cerca del borde citoplásmico, son casi siempre vistos en la zona cercana del área necrótica. Un límite externo de tejido conectivo fibroso está usualmente presente entre las lesiones y el tejido normal (Thoen et al., 2006¹). Los mecanismos de respuesta inmune natural y adquirida de los bovinos son casi siempre efectivos en limitar la proliferación del bacilo tuberculoso y el desarrollo de la enfermedad progresiva. La eliminación de *M. bovis* del tejido del huésped depende, en parte, en la destrucción del bacilo en los macrófagos mononucleares que han sido activados por linfocinas. La evidencia que apoya este concepto está principalmente basada en información obtenida de estudios de animales pequeños de laboratorio utilizando cepas de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* (Chan et al., 1992).

Inmunología

La virulencia del bacilo tuberculoso produce un número de los llamados “factores y/o antígenos virulentos” algunos de los cuales antagonizan con las

defensas normales del huésped, permitiéndole al organismo multiplicarse en el sitio de implantación primario, para una posterior diseminación hacia otros tejidos u órganos no infectados. Algunos de estos factores pueden ser asociados con el complejo de lípidos de la pared celular, los cuales protegen a la micobacteria de los efectos bactericidas de derivados activados del oxígeno dentro del fagolisosoma, o pueden atacar la pared de la membrana fagosomal liberando al organismo dentro del citoplasma. Los antígenos polisacáridos tienden a inducir fuertes respuestas humorales lo que es de gran importancia taxonómica y diagnóstica, pero proveen poca o nula protección hacia el huésped. Por otra parte, antígenos proteicos tienden a inducir respuestas celulares, algunas de las cuales pueden ser protectoras. Algunas de estas proteínas muestran una homología cercana y son llamadas proteínas de choque, y se liberan tanto en células eucariotas como procariotas ante la exposición a un insulto medioambiental (Collins, 1994).

El procesamiento de los antígenos micobacteriales por los macrófagos y la presentación a los linfocitos T juega un papel fundamental en la liberación de las linfocinas apropiadas para la activación completa de los mecanismos bactericidas de las células fagocíticas (Thoen et al., 2006)¹.

Macrófagos: El macrófago es la célula huésped primaria para el crecimiento intracelular de *M. bovis*; luego de la deposición del bacilo en la superficie respiratoria, la fagocitosis asegura su interacción con las células de la respuesta innata y adquirida (Pollock et al., 2006). La micobacteria es fagocitada por múltiples vías incluyendo receptores del complemento y receptores de manosa. La activación inicial y la respuesta de citocinas de macrófagos a la micobacteria pueden estar mediadas por la interacción de receptores tipo Toll (RT). Estos son miembros de la familia de receptores de Interleucina 1 (IL-1), una molécula involucrada en la resistencia innata a microbios. Las endotoxinas activan las células por la interacción con CD14 y RT, y por el componente de la pared celular lipoarabinomanosa (LAM)

micobacterial. La infección con *M. tuberculosis* virulento disminuye la viabilidad de los macrófagos alveolares, y la inhibición del Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) puede parcialmente revertir esto. En el caso de *M. tuberculosis* H37Ra, y *M. bovis* BCG, aproximadamente el 85% de las bacterias se encontraban en el fagolisosoma a las 6 horas post-infección, mientras que para la cepa *M. tuberculosis* H37Rv cerca de las 2hr (McDonough et al., 1993).

La muerte de macrófagos infectados puede ser asociada con la muerte de la micobacteria contenida. Aunque, se sugiere que la reducción del número de bacilos se debe a la apoptosis de monocitos infectados, y no por la muerte en el tejido necrótico. La apoptosis inducida por adenosín trifosfato (ATP) promueve la destrucción de *M. tuberculosis* virulento dentro de los macrófagos, así como ocurre por la inducción con el Ligando Fas y el peróxido de hidrógeno (Rook et al., 2001). Macrófagos infectados también son conocidos por secretar citocinas incluyendo IL-8, RANTES y MCP-1 las cuales ayudan en el reclutamiento de linfocitos y a la formación del granuloma, lo que conduce al confinamiento de la micobacteria. *M. tuberculosis* infecta macrófagos que secretan más IL-10 que IL-12, lo que puede actuar como supresor de la respuesta Th1. Un patrón similar de secreción se observa en monocitos bovinos derivados de macrófagos que preferentemente secretan IL-10 que IL-12. IL-10 puede también inhibir la exportación de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) tipo II a la superficie celular, lo cual puede regular la respuesta de los Linfocitos T hacia una disminución de su actividad. La habilidad reducida de estas células a la activación de los linfocitos T combinado con el reclutamiento de células para la formación del granuloma puede ayudar a la persistencia de la micobacteria dentro del huésped. Sin embargo, se conoce bien que la estimulación de los macrófagos por otros componentes de la respuesta inmune, como IFN γ o TNF α , puede incrementar la actividad microbicida del macrófago lo que está asociado a la reducción de la secreción de Interleucina 10 (IL-10) (Hope y Villarreal, 2008).

Evasión de las Funciones Antimicrobiales de los Macrófagos: La micobacteria evade mediante varias estrategias su destrucción por los macrófagos. Cuando es fagocitada vía receptores de manosa falla al disparar los eventos de destrucción. También inhibe la señalización de los receptores del complemento mediados por Ca^{2+} . Asimismo puede inhibir la acidificación del fagosoma y modificar el tráfico intracelular de vacuolas, de esta forma parece que son parte del compartimento de reciclaje endosomal, más que parte tóxica del fagolisosoma. Estas vacuolas liberan cantidades de LAM la cual se inserta dentro de los dominios ricos en glicosilfosfatidilinositol (GPI) en la membrana celular. Entonces, el patrón de citocinas liberadas de los macrófagos cambia, así la activación de macrófagos es disminuida y el reclutamiento de células T de igual forma (Rook et al., 2001).

Células Dendríticas (CD): Son las más potentes Células Presentadoras de Antígenos (CPA) y son el inicio de las respuestas inmunes en animales (naive). Además de su capacidad como CPA, las CD también pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune y ser un punto de unión con las respuestas inmunes innatas y adaptativas. La respuesta innata de las CD a los antígenos microbiales puede polarizar la respuesta de las células T. Esto está ligado a su capacidad de producir citocinas como IL-12 e $\text{IFN-}\gamma$ que puede regular ascendentemente la secreción de $\text{IFN-}\gamma$ por los linfocitos T y las células NK. La interacción de las CD y la micobacteria aumenta su expresión de moléculas de superficie que están involucradas con las células T, de notar CMH tipo II y moléculas coestimuladoras CD40 y CD80. CD muestran para una infección con *M. bovis* pero no BCG, resultando en un alto nivel de regulación ascendente de CD40 y CD80 (Hope y Villarreal, 2008).

Linfocitos T CD8^{+} : Un importante rol de las células T CD8^{+} en la infección micobacteriana ha sido sugerido por diversos experimentos en modelos murinos y humanos, la inmunización de ratones con plásmidos que expresan antígenos micobacteriales, como hsp65, 85A o 38-kDa resultan en la generación de

antígenos específicos CD8⁺ citotóxicos asociados con protección ante un desafío con *M. tuberculosis* (Liébana et al., 1999). Estas células han mostrado ser citotóxicas, aunque el mecanismo de éstas es controversial. La mayoría de los Linfocitos T Citotóxicos (LTC's) actúan lisando células infectadas y permitiendo la liberación de la micobacteria para ser fagocitada por macrófagos activados y no infectados que pueden llegar a destruirla. Sin embargo, actualmente parece ser que algunos LTC's destruyen *M. tuberculosis* directamente vía proteínas granulares asociadas, como la enzima granulysin (granulicina), actuando como perforinas. Por otra parte, los LTC CD4⁺, no reducen la viabilidad de la bacteria contenida. El principal rol de las células CD8⁺ en este punto es la producción de IFN- γ . Existen células CD8⁺ que reconocen células infectadas con TBB y secretan IFN- γ en la sangre, pero esto no parece contribuir con el control de la proliferación intracelular de *M. tuberculosis*. La mayoría de las células CD8⁺ específicos a TBB reconocen sus antígenos en asociación con CPH Tipo I, sin embargo se sabe ahora que están restringidas por otra molécula, como es el caso de los Linfocitos CD1 Restrictivos (Rook et al., 2001).

Linfocitos CD1 Restrictivos: El exacto rol de CD1, y las células CD1 restrictivas, tanto en la protección como en la patología de tuberculosis, ha sido muy difícil de evaluar, debido a que en ratones, donde se ha desarrollado este estudio, posee una molécula homóloga CD1d pero no es homóloga en el humano CD1a, b o c. Los receptores de las células T (CD4⁺, CD8⁺ y $\alpha\beta$), pueden reconocer los lípidos de la micobacteria en el contexto de CD1. El mecanismo efector predominante parece ser la secreción de IFN- γ y la interacción de CD95/CD95L, y rara vez causa la muerte de la micobacteria. Esto sugiere que su papel es la regulación río abajo de la respuesta inflamatoria local dada la remoción de antígenos adheridos a la células que presentan antígenos (Rook et al., 2001). Los factores de virulencia del LAM de *M. tuberculosis* y fosfatidil inositol manosa (PIM), son antígenos glicolípidos que se unen a CD1b y CD1d, permitiendo la activación de CD1b restrictor de las células Th $\alpha\beta$ y CD1d

restricor de células natural killer (NKT), respectivamente. Otros antígenos de (*M. tuberculosis*) como ácido micólico, también estimula CD1d restricor de células T. Todas las CPA's, incluyendo células B, presentan antígenos a CD1d. Las células NKT estimuladas por α -galactosilceramida produce Interleucina 4 (IL-4), consistente con crear una citocina envolvente necesaria para la producción de anticuerpos. Los efectos en las células NKT en las células B también se conoce son dependientes de IL-4 (Lang and Glatman-Freedman, 2006).

Acción Inmunológica de Vacunas ADN: Una vacuna ADN consiste en un gen ajeno de interés clonado dentro de un plásmido bacterial. Contiene el origen de replicación lo que permite el crecimiento en la bacteria. El exacto mecanismo por el que las vacunas ADN inducen una respuesta inmune en el huésped aún no se entiende completamente. Después de la generación in vivo, los péptidos antigénicos son procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, ya sea a través de una transfección directa o por la obtención de proteínas de miocitos vía presentación cruzada, para posteriormente vía CPH tipo I y II, y así inducir una respuesta de tipo celular y humoral (Dhama et al., 2008).

El tipo y la fuerza de la respuesta inmune son afectadas no solo por el antígeno vacunal sino también por el sitio y mecanismo de liberación. La vacunación con ADN vía intramuscular tiende a promover una respuesta inmune que está caracterizado por la producción de IFN- γ por los Th e inmunoglobulinas IgG2a (Dunham, 2002). La inmunización genética induce anticuerpos y la respuesta de tipo celular que incluyen a CD4⁺ y CD8⁺ que son producto de las células T. Las vacunas ADN han inducido protección inmune contra una gran cantidad de patógenos y tumores, más recientemente contra micobacteria (Kamath et al., 1999). La inmunización con el plásmido de ADN puede inducir una fuerte respuesta de anticuerpos contra una gran variedad de proteínas en especies animales, incluyendo ratones, primates no humanos, y

más recientemente humanos. La respuesta humoral generada por vacunas ADN ha mostrado ser protectora en varios modelos animales *in vivo* (Gurunathan et al., 2000).

Infecciones experimentales con *M. bovis* han demostrado que de todos los subtipos de células T, las principales involucradas en el progreso de la infección son ($\gamma\delta$, CD4 y CD8 células T). De particular importancia en la respuesta a *M. bovis* es el desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1 tipo IFN- γ . En ganado infectado experimentalmente con *M. bovis*, las células de memoria T CD4 presentan una población predominantemente productora de IFN- γ . Las células de memoria T CD8 también han sido identificadas como productoras importantes de IFN- γ . En el control del crecimiento micobacterial, las células CD4 contribuyen a la inhibición intracelular del crecimiento de los bacilos, mientras que las células T CD8 lisan macrófagos infectados con *M. bovis* (Pollock et al., 2006).

Signos Clínicos

La TBB es generalmente de curso crónico, variable y en algunos casos de forma sub-clínica. Usualmente toma muchos meses incluso años para el desarrollo de signos clínicos. En la mayoría del ganado infectado la enfermedad es inaparente, y su presencia se hace evidente por medio de la aplicación de la prueba de tuberculina, pero si los signos clínicos aparecen, su naturaleza dependerá del órgano o sistema involucrado y la severidad de la infección. Debido a la complejidad de la enfermedad, las manifestaciones clínicas y patológicas pueden variar substancialmente. Animales con lesiones diseminadas gradualmente presentan anorexia y manifiestan temperatura fluctuante, el pelo se torna hirsuto y pueden eventualmente presentar emaciación, pero sus ojos permanecen claros. Los signos se tornan aún más evidentes durante el estrés tal como ocurre en el periodo posparto o como resultado de malnutrición (Coetzer y Tustin, 2004).

Métodos de Diagnóstico

Normatividad Mexicana para el Diagnóstico de TBB: La toma de muestras para estudios histopatológico y bacteriológico se realizará de la siguiente forma: Se seleccionarán y tomarán muestras de los siguientes órganos que presenten lesiones compatibles con tuberculosis o secreciones sugestivas: a) Nódulos linfáticos. Tomando muestras preferentemente de los nódulos de la cabeza, preescapulares, mediastínicos anteriores y posteriores y bronquiales derecho e izquierdo. En el caso de tuberculosis miliar tomar muestras de nódulos mesentéricos. b) Pulmones. La lesión tuberculosa puede ser caseosa o calcificada o una cavidad franca. De este órgano se tomarán muestras de 2 cm por lado de las lesiones presentes. c) Útero en caso de metritis tuberculosa. Se caracteriza por secreción continua de grandes cantidades de pus amarilla teniendo el aspecto de leche cuajada. Se tomarán las muestras del órgano y de este exudado. d) Otros órganos. También se tomarán muestras de los siguientes órganos cuando presenten lesiones sugestivas de tuberculosis: bazo, hígado, riñón, médula ósea, ovarios, testículos y glándula mamaria. Si el animal es positivo a la prueba de tuberculina y en la necropsia no presenta cambios que sugieran la infección del animal, entonces se deberán enviar al laboratorio nódulos de la cabeza como los retrofaríngeos, mandibulares, parotídeos y las tonsilas faríngeas, así como los mediastínicos y mesentéricos. Todas las muestras deberán estar perfectamente identificadas, anotando: Nombre del propietario, ubicación de la explotación de origen, dónde se obtuvo la muestra, órgano, descripción del animal: especie, raza, sexo y edad; identificación precisa del animal como arete, marca, u otro; nombre, registro y domicilio del Médico Veterinario oficial o aprobado que remite la muestra; destino del canal y vísceras, ya sea decomiso parcial o total (NOM-031-ZOO-1995).

Diagnóstico bacteriológico: a) Examen directo: Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina para microorganismos ácido alcohol

resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante. b) Examen indirecto: Cultivo, aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-031-ZOO-1995).

Diagnóstico histopatológico: Se deberá utilizar la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y nueva fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso (NOM-031-ZOO-1995).

Forma de envío de muestras para el aislamiento bacteriológico: Es necesario sumergir los tejidos en solución saturada de borato de sodio, si se trata de nódulos aparentemente afectados se deberán enviar completos sin grasa; si se trata de otro tejido, se deberá seleccionar la posible lesión y enviar muestras no mayores de 2 cm por lado. El tiempo máximo en que debe permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 10 semanas, si el tiempo es mayor la muestra se deshidrata (NOM-031-ZOO-1995).

Forma de envío de muestras para estudio histopatológico: Las muestras con lesiones sugestivas a tuberculosis deberán fijarse con formol amortiguado al 10%, el tamaño de las mismas deberá ser de aproximadamente de 2 cm por lado y en una proporción de una parte de tejido y nueve de fijador (formol) (NOM-031-ZOO-1995).

Examen Físico: Requiere palpación de todos los nódulos linfáticos superficiales y ubres, percusión y auscultación del área pulmonar. El

diagnóstico clínico de tuberculosis debe confirmarse con pruebas de laboratorio. La confirmación final es dependiente del cultivo e identificación del organismo causal. El bacilo tuberculoso puede tentativamente identificarse por microscopio de luz, preparando el contenido de las lesiones y tiñéndolas bajo el método de Ziehl-Neelsen (Coetzer y Tustin, 2004).

Patología: El examen de lesiones macroscópicas durante la necropsia, debido a que la TBB es una enfermedad que afecta el sistema retículo endotelial, las lesiones pueden ocurrir en los nódulos linfáticos (NL) en virtualmente cualquier parte del cuerpo. El grado de sensibilidad para detectar las lesiones depende del tiempo y diligencia de la persona a cargo del examen. Cuando se encuentran lesiones granulomatosas sospechosas a TBB deben ser remitidas para confirmación bacteriológica e histopatológica (Corner, 1994).

Bacteriología: Los principales factores que influyen en el éxito del aislamiento de *M. bovis* de especímenes clínicos son: el medio de cultivo, el procedimiento de descontaminación y las condiciones de incubación. Las cepas de *M. bovis* requieren medios enriquecidos para crecer. El medio utilizado es a base de huevo (Stonebrink y Lowensteins-Jensen con piruvato), o agar basado y enriquecido con suero y/o sangre, también llamado B83. La descontaminación de especímenes es frecuentemente necesaria ya que permite el aislamiento de *M. bovis* sin la contaminación por otros microorganismos. Se utiliza para esto, generalmente, hexadecylpyridinium chloride (HPC) al 0.075%, Benzalkonium chloride al 0.25%, ácido oxálico al 5.0% e hidróxido de sodio al 2%. La identificación de aislamientos de *M. bovis* requiere tradicionalmente de conocer las características de la morfología y tinción de las colonias, junto con pruebas bioquímicas (Corner, 1994).

Tuberculina: Dado que la respuesta IMC es dominante en la inmunidad anti-micobacterial temprana (48 – 72hrs post inoculación del Derivado Proteico Purificado (PPD) (De la Rúa-Domenech et al., 2006), la estimulación de las

células T de memoria con antígenos micobacteriales proveen un medio para el diagnóstico temprano de la infección por *M. bovis*. La Prueba de Tuberculina es la más frecuentemente utilizada, provee una medición de la IMC dependiente de la hipersensibilidad de tipo retardado reaccionando a la tuberculina (Cuadro 1). Preocupaciones sobre la especificidad y sensibilidad de la prueba dérmica, junto con la necesidad de una detección temprana de la infección por *M. bovis*, ha conducido a la búsqueda de pruebas alternas (Pollock et al., 2006). En el estándar internacional del diagnóstico antemortem de TBB, la aplicación de un pequeño volumen de tuberculina bovina dentro de la piel, se conoce como prueba intradérmica simple, la cual puede aplicarse en la región media cervical o en la base de la cola. La prueba intradérmica simple comparativa, implica la aplicación simultánea de tuberculina bovina y aviar lado a lado dentro de la piel en el cuello del animal (De la Rúa-Domenech et al., 2006).

Serología: La prueba Gamma Interferón (IFN- γ) de laboratorio para detectar respuestas IMC ha sido utilizada para determinar la respuesta de linfocitos de animales infectados con *M. bovis*. En esta prueba se estimula *in vitro* con antígenos micobacteriales. El desarrollo de la prueba IFN- γ ha contribuido significativamente al diagnóstico de la tuberculosis bovina, y puede detectar animales infectados antes del inicio de la respuesta dérmica de la hipersensibilidad de tipo retardado (Pollock et al., 2006). Esta prueba evalúa la IMC mediante la detección de IFN- γ en respuesta a un antígeno específico bajo un sistema de cultivo con sangre completa, ante antígenos *M. bovis* PPD, ya que estos antígenos están presentes en los linfocitos en el cultivo de sangre. La producción de IFN- γ de las células es detectada con base a un anticuerpo monoclonal mediante un Ensayo de Unión Inmunoabsorbente de Enzima (ELISA) (Díaz et al., 2003).

Técnicas Moleculares: La biología molecular ha desarrollado herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento.

Cuadro 1. Criterio de Diagnóstico utilizado para interpretar las reacciones de piel debido a la prueba de tuberculina intradérmica.

Prueba Realizada	Reacción Mayor	Mediana	Reacción Menor
Hato Negativo			
Tuberculina sola	Sospechoso	>6mm<	Negativo
Prueba comparativa	Sospechoso (4mm o más de reacción a tuberculina)	>+3mm< [tuberculina bovina menos aviar]	Negativo
Hato Positivo			
Tuberculina sola	Positivo	>4mm<	Negativo o Sospechoso
	Positivo (4mm o más de reacción a tuberculina)	>+3mm< [tuberculina bovina menos aviar]	Negativo o Sospechoso

Adaptado de Coetzer and Tustin, 2004.

Una región repetitiva (DR) presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*, que flanquea la secuencia IS6110. Esta región consiste en una serie de secuencias idénticas de 36 pares de bases (pb). Separadas entre sí por regiones variables de 34 o 41 pb. Esta región es detectada en aquellas muestras procesadas bajo esta técnica (Díaz et al., 2003).

Existen dos pasos claves en el desarrollo de los análisis basados en PCR. El primero es la selección de un elemento amplificador de ADN que sea específico a *M. bovis* o a *M. bovis* y a otras especies del complejo tuberculoso y el segundo es el desarrollo de un método confiable que extraiga muy pocos organismos del tejido lesionado o muestra, de forma tal que su ADN puede ser amplificado por PCR (Collins et al., 1999).

Estudios sobre Sensibilidad y Especificidad: Para el caso de ambas pruebas, los valores de sensibilidad y especificidad, varían, de forma tal que, Monaghan et al., 1994, estimó que la sensibilidad de la prueba de tuberculina variaba entre 68-95% y la especificidad entre el 96 y 99%, mientras que, Lilenbaum et al., 1999 después de realizar una comparación entre la prueba de tuberculina e IFN- γ , determinó que la sensibilidad relativa para la primera es de 88.3% y la sensibilidad relativa para IFN- γ fue del 100%. González et al., 1999 luego de realizar una evaluación de las pruebas de tuberculina e IFN- γ comparadas con la prueba de oro para tuberculosis (aislamiento de *M. bovis*) obteniendo una sensibilidad de 80.2 y 84.9% respectivamente. Mientras que un estudio realizado por Ryan et al., 2000, muestra que la prueba de IFN- γ presenta una sensibilidad y especificidad de 85 y 93% respectivamente. Recientemente Gormley et al., 2006, los valores de IFN- γ (88% sensibilidad y 95% de especificidad) y prueba de tuberculina (74% de sensibilidad y 99.9% de especificidad). Cagiola et al., 2004, en un estudio sobre el análisis de los posibles factores que afectan la especificidad de IFN- γ y prueba de tuberculina, en el que obtuvo los siguientes resultados, la especificidad para IFN- γ fue de 97.3% y de 96.8% para la prueba de tuberculina. Luego de la revisión y análisis

de diversos experimentos, es claro que, aún existe una variación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR entre laboratorios (Zumarraga et al., 2005).

Prevención

El principal propósito en el control de la tuberculosis es eliminar el riesgo de infección hacia los humanos, y en países desarrollados el propósito de la vacunación del ganado es lo ideal para prevenir el establecimiento de la infección. Mientras que la vacunación no sea completamente efectiva, el diagnóstico mediante pruebas debe realizarse en asociación con la vacunación, donde animales vacunados no deban reaccionar a la prueba de tuberculina o pruebas diagnósticas alternas. BCG es actualmente la vacuna comercialmente disponible contra tuberculosis, su eficacia en humanos varía desde 80 a 0%, gran cantidad de estudios se han hecho respecto a esta vacuna, por otra parte estudios sobre otras alternativas, tal como, vacunas ADN realizados en modelos de pequeños animales, no han mostrado resultados sobresalientes, ejemplos de algunas proteínas micobacteriales expresadas en estas vacunas son: MPB70, MPB83, Hsp65, Hsp70 y Apa. Una excepción en los resultados de las vacunas ADN, fue cuando se combinaron con la proteína coestimuladora ESAT-6, mostrando un efecto en la reducción de lesiones tuberculosas y en el conteo bacteriológico (Buddle et al., 2006).

Zoonosis

Históricamente *M. bovis* ha sido asociado con tuberculosis extrapulmonar en niños, usualmente ocurre debido al consumo de leche que no ha sido pasteurizada o hervida, proveniente de ganado infectado. A lo largo del tiempo se ha recopilado información sobre los casos de tuberculosis bovina en humanos en algunos países (Cuadro 2). En los años 90's y 2000's las principales causas de TB debido a *M. bovis* en países industrializados han sido:

Cuadro 2. Reporte de casos, revisiones y reportes epidemiológicos concernientes a casos de tuberculosis humana debido a *Mycobacterium bovis* entre 1966 – 2005, distribuidos por década, región o país de origen.

Regiones/Países	1966-1975	1976-1985	1986-1995	1995-2005
Oeste Europa	37	10	11	36
Este Europa	13	9	4	0
Estados Unidos				
/ Canadá	7	7	16	10
Latino América	3	1	5	3
Australia /				
Nueva Zelanda	0	1	6	2
África	5	1	2	11
India, Israel,				
Taiwan, Turquía	0	0	3	3
WHO / OIE / FAO				
/ IUATLD	2	0	3	3
Total	67	29	70	68

Cifras según el número de casos publicados.

Adaptado de Thoen et al., 2006

- La reaparición de la tuberculosis debido a la inmigración.
- La presentación de la enfermedad debido a *M. bovis*, debido a una reactivación o por infección primaria en pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
 - ✓ Casos en animales domésticos o mamíferos silvestres que pudieron transmitir la enfermedad al humano.
- Contagio vía aérea de *M. bovis* en cuidadores de animales o trabajadores de la industria de la carne. (Thoen et al., 2006²).

La infección al humano puede ocurrir al inhalar aerosoles o a través de leche contaminada. Los aerosoles son el resultado de las excreciones de los animales. Esta ruta conduce a una tuberculosis respiratoria (Biet et al., 2005).

Tratamiento

Existen diversas drogas para combatir la TBB, tal como, Rifampicina, Isoniazida y Estreptomina, *M. tuberculosis* tiene la habilidad de mutar los genes que son el objetivo de estas drogas y crear resistencia a ellos (Sechi et al., 2001). El tratamiento de la TBB no se sigue usualmente en los Estados Unidos y otros países debido a la naturaleza crónica de la enfermedad, su potencial efecto zoonótico y el costo del tratamiento.

Isoniazida: Ha sido utilizado profilácticamente para el control de la tuberculosis en zoológicos y parques con variables resultados. Las desventajas de utilizar isoniazida incluyen un pobre rango de éxito (superior al 25% en casos refractarios), el tratamiento de emergencia de cepas resistentes a drogas, secreción de isoniazida en la leche y el peligro de recaída cuando el tratamiento con drogas es suspendido. *M. bovis* es sensible a isoniazida, estreptomina, ácido para aminosalicílico, rifampicina y tiacetazona (Howard y Smith, 1999). Isoniazida es la droga antituberculosa de mayor uso que se prescribe diariamente en millones de dosis a nivel mundial. El bacilo tuberculoso es

excepcionalmente sensible a isoniazida, que es activada peroxidativamente por la KatG catalasa-peroxidasa de *M. tuberculosis* para producir daño dentro de la bacteria (Timmins et al., 2004). La Isoniazida inhibe la síntesis del ácido micólico, el cual es parte de la pared celular de la micobacteria, provocando la acumulación de cadenas largas de ácidos grasos y muerte celular (Vilchèze y Jacobs, 2008).

Métodos de Control y Erradicación

La experiencia de Estados Unidos (EU) y Canadá sobre la erradicación de la TBB fue similar en muchos parámetros: prevalencia inicial de la enfermedad, programas iniciales y de progreso y filosofías subyacentes en las políticas del programa. En el caso de EU, en 1917 el programa inicio como un programa de erradicación con la aprobación de indemnización a propietarios que eliminaran sus animales enfermos y nunca desviaron su meta de la erradicación. Iniciaron proveyendo de “estatus de acreditación por área” basados en programas que median la prevalencia y “hatos acreditados libres” estableciendo fuentes para proveer animales libres de TBB. Durante 50 años se mantuvieron vigilando, tiempo durante el cual se redujo del 5% a menos del 0.3%. Utilizando la prueba de Tuberculina, probaron el 15% del ganado de cada estado por año. El estatus de Estado Acreditado Libre se proveía difícilmente debido a que se requerían de 5 años consecutivos confirmado como libre de TBB y de cumplir con las reglas del Métodos Uniformes de Erradicación de Tuberculosis Bovina (UMR). La importación de becerros desde México incrementa potencialmente la exposición del ganado residente. Canadá inició su programa de erradicación en 1923, encontraron una prevalencia del 0.11%. De las 10 provincias que constituyen Canadá, 8 son áreas libres (Essey y Koller, 1994).

Hay tres puntos cruciales a los que el control debe enfocarse: 1) Prevención: esta generalmente aplicada a aquellas medidas designadas a excluir la enfermedad de poblaciones no afectadas. 2) Control: describe los

esfuerzos directos seguidos para reducir la frecuencia de la enfermedad en niveles biológicamente y/o económicamente justificable o que generen las menores consecuencias. 3) Erradicación: describe los esfuerzos para eliminar organismos patógenos seleccionados de un área determinada y son usualmente dirigidos a interferir con la historia natural de un organismo infeccioso y no permitir su diseminación o provocar su eliminación (Collins, 2006).

En sitios donde la producción es predominantemente de tipo ganado vacuno de producción de carne y leche, donde todos los animales mayores de 6 semanas son testados anualmente con la prueba intradérmica comparativa cervical. De acuerdo a los estatutos normativos en cada país, pero como regla oficial, animal testado con resultado positivo, deberá ser sacrificado y el hato involucrado estará sometido a restricciones de movilidad. Los animales reactivos serán sometidos a una exhaustiva inspección sanitaria en rastro, tomando muestras de nódulos linfáticos y tejidos apropiados para confirmación histológica y bacteriológica (Abernethy et al., 2006).

Los programas basados en pruebas regulares de tuberculina y remoción de animales infectados han sido exitosos en erradicación o la marcada reducción de la tuberculosis bovina en hatos infectados en muchos países industrializados. Sin embargo, estos programas no son viables o aceptables en muchos países en vías de desarrollo debido al alto costo implicado en su implementación y a la falta de subsidios que permitan el reemplazo de los animales sacrificados y en estos países la tuberculosis bovina continua siendo un alto riesgo para la salud pública y la producción de leche (Buddle et al., 2006).

Vacunas contra TBB

BCG

La implementación de programas nacionales contra TB bovina, basados en la prueba de tuberculina y la erradicación de animales infectados, ha permitido la erradicación o al menos una mayor reducción en la incidencia de TB bovina. Sin embargo, estas medidas de control son solo parcialmente efectivas en países como Reino Unido, Irlanda y Nueva Zelanda, donde se tiene un reservorio de animales silvestres infectados. Recientes avances en el estudio inmunológico y molecular sobre la micobacteria han incrementado enormemente las opciones de vacunas contra TB bovina. Dentro de las cuales se encuentran principalmente las vacunas vivas atenuadas como la BCG y otras cepas atenuadas de *M. bovis*, aunque más recientemente ha surgido el desarrollo de vacunas basadas en proteínas de las micobacterias o su ADN (Buddle, 2003).

M. bovis Bacilo Calmette-Guerin (BCG) es la vacuna más utilizada en humanos en el mundo con un estimado de 3 billones de dosis que han sido administradas desde que se descubrió y se realizaron las primeras pruebas en los años 1920's. BCG es una cepa viva atenuada de *M. bovis* y fue originalmente derivada de vacas con mastitis tuberculosa. A pesar de su extensa utilización, la eficacia de BCG variaba enormemente en estudios en humanos y animales entre el 0 y 80% de protección (Aldwell et al., 2003).

La vacuna BCG ha sido utilizada por más de 70 años, muestra actualmente una eficacia variable, demostrado en varios experimentos cuidadosamente controlados, que sugieren que la capacidad de BCG para prevenir la Tuberculosis (TB) del tipo primaria adulta esta severamente limitada. En años recientes nuevas vacunas, incluyendo cepas BCG recombinantes, vacunas ADN y otras, han sido desarrolladas y evaluadas activamente en animales. Se reporta que en ratones se previene completamente la reactivación bacteriana de aquellos con infección tuberculosa latente al aplicarles una vacuna ADN que exprese la proteína Hsp60 (Repique et al., 2002).

Una vacuna para ganado debe inducir protección sin hacer reaccionar a los animales a la prueba intradérmica de tuberculina cuando se expone a *M. bovis*. La vacunación por sí misma no debe inducir una respuesta de la prueba de tuberculina a menos que otra prueba de diagnóstico se desarrolle para distinguir los animales vacunados de los infectados con *M. bovis*. La seguridad para los seres humanos y la mínima reacción en el sitio de vacunación en ganado son también consideraciones importantes (Buddle et al., 2002; Skinner et al., 2001). La forma en la cual un antígeno es entregado al sistema inmune puede desempeñar un papel crucial en su capacidad de inducir una respuesta protectora. Los genes que codifican los antígenos dominantes se pueden incorporar dentro de una bacteria heteróloga, viva, atenuada y vacunas virales para tomar ventaja de su capacidad de estimular caminos inmunes particulares. Por ejemplo, BCG por sí misma se ha utilizado como sistema de entrega para antígenos recombinados y, mientras que la mayor parte de los antígenos estudiados hasta la fecha se comparten entre BCG y *M. tuberculosis*, las estrategias podrían ser consideradas fácilmente por las cuales BCG es sobre producido en grandes cantidades para obtener un antígeno de interés particular. La importancia de defender diversos sistemas de entrega es ilustrada por el caso de Hsp65-kDa. La inmunización de ratones con la proteína Hsp65-kDa en coadyuvante dio lugar a una protección no significativa, la inmunización con la misma proteína expresada en a varias células transfectadas produjeron protección contra desafío subsecuente *in vivo* (Young y Duncan, 1995).

En el Reino Unido, el control de la TBB está basado en la estrategia de detección y sacrificio, por medio de la prueba de tuberculina para identificar animales infectados, esto ha generado la necesidad de la generación de nuevas vacunas, ya que en un experimento realizado en un grupo de bovinos la respuesta inmunológica generada en aquellos animales vacunados solamente con BCG, medida en el porcentaje medido de IFN- γ obtuvo una media de entre 0 a 0.12 células CD8+ IFN- γ , la cual fue menor que la otra vacuna utilizada en otro grupo (Vordermeier et al., 2004).

La vacuna viva de BCG está normalmente preparada como liofilizado, la muerte de BCG asociada con la deshidratación y rehidratación puede influir en su eficacia protectora, por lo que la BCG muerta tiene una pequeña eficacia protectora. Para determinar lo anterior se seleccionó un grupo de ciervos rojos (*Cervus elaphus*) saludables, posteriormente fueron infectados con una cepa de *M. bovis* en dosis de 1×10^4 Unidades Formadoras de Colonias (CFU), luego fueron vacunados con tres dosis con diferente concentración de CFU, a las 8 semanas, luego se extrajeron muestras sanguíneas y los resultados fueron los siguientes: los animales vacunados con una dosis baja de BCG (5×10^4 CFU), produjo una protección significativa contra la infección ($P < 0.05$), comparado con los no vacunados, la dosis media (5×10^7 cfu) produjo una protección significativa contra la infección ($P < 0.05$). Mientras que la vacunación con una dosis alta (5×10^8 cfu), no produjo una protección significativa contra la infección (Griffin et al., 1999).

Vacunas BCG recombinantes

Las vacunas recombinantes BCG (rBCG) pueden ser útiles para el desarrollo de más efectivas vacunas micobacteriales que las BCG actualmente utilizadas. Esto, a través de dos estrategias, una es produciendo una gran cantidad de antígenos protectores autólogos y dos, alterando la permeabilidad de las membranas de los fagosomas en las células hospedadoras (Ohara y Yamada, 2001).

Aunque la evolución divergió genómicamente a *M. bovis* de *M. tuberculosis*, la producción de proteínas de bajo peso molecular como ESAT-6 induce una potente respuesta inmune. El uso de vacunas recombinantes de BCG ha generado resultados tales como: inducción de la proliferación esplenocítica y producción de IFN- γ en respuesta a PPD, lo cual indica una vacunación satisfactoria (Pym et al., 2003).

La inmunización de ratones con vacunas rBCG, inducen las respuestas inmunes celulares y humorales contra una variedad de antígenos. La respuesta inmune ejercida por la aplicación de BCG puede interferir con la inmunogenicidad de futuras vacunas rBCG (Gheorghiu et al., 1994).

La vacuna BCG, cepa viva o atenuada, es actualmente la única vacuna disponible para la prevención de TB. En niños ha mostrado una buena eficacia contra TB, sin embargo, en la protección de TB pulmonar en adultos su rango de protección varía entre 0 a 80%; lo que ha generado la necesidad de nuevas vacunas que replacen a la BCG para prevenir efectivamente la TB. Actualmente existen nuevos tipos de preparados incluyendo rBCG y otras. Por lo que en un estudio construyeron una rBCG que expresa solo expresa ESAT-6 (rBCG-1) y otra fusionada con Hsp60 (rBCG-2), evaluando la virulencia, la respuesta inmunológica humoral y celular; se retaron ratones de entre 6 y 8 semanas de edad libres de TB e infectados posteriormente con 10^6 UFC de *M. bovis* BCG, rBCG-1, rBCG-2 y *M. tuberculosis* H37Rv. Las rBCG's no mostraron virulencia obvia en un modelo murino, los niveles de IFN- γ de rBCG-1 fueron estadísticamente mayores que BCG, mientras que no hubo diferencia estadísticamente significativa al compararse con rBCG-2 (Bao et al., 2003).

Recientemente, la vacunación con adenovirus recombinado de replicación-deficiente que expresa Ag85A protegió ratones de una infección con *M. tuberculosis*, esta vacuna fue probada en bovinos Holstein de seis meses de edad, e indujo una fuerte respuesta celular e inmune (Vordermeier et al., 2006).

Vacunas Proteicas

El concepto de usar vacunas proteicas contra TB es atractivo desde que la vacunación no puede inducir reactividad a la prueba dérmica de tuberculina y la eficacia de las vacunas no se puede influenciar por la sensibilización anterior de micobacterias ambientales. La vacuna proteica reduce la media de lesiones

pulmonares de TB en desafíos en bovinos e induce una no reactividad a la prueba dérmica de tuberculina. Sin embargo estos animales pueden presentar una alta prevalencia de extensión extra torácica de la enfermedad que los no vacunados o que los vacunados con BCG (Hewinson et al., 2003).

Un estudio realizado en 72 vacas Holstein Friesian de seis meses de edad, libres de TB. Fue puesto a prueba una vacuna con EPF (Extracto de Proteínas Filtradas) e Interleucina-2 (IL-2), para determinar la capacidad de estimular la respuesta inmune y la protección contra una infección intratraqueal de *M. bovis*, obteniéndose los siguientes resultados: después de cinco semanas del experimento se encontró que el grupo vacunado con un alto nivel de EPF – IL-2 presentó una mayor producción de IFN- γ y IL-2 que el grupo control y el vacunado con BCG (Wedlock et al., 2000).

Vacunas ADN

En las vacunas de ADN, el gen para el antígeno es insertado en una bacteria vector, el plásmido de ADN es amplificado en la bacteria transformada, posteriormente purificado e inyectado dentro de un huésped inmunocompetente. El uso de vacunas ADN para la inmunoterapia de TB es controversial (Huygen, 2003).

El plásmido de ADN que codifica la proteína de choque térmico 65 (Hsp65) ha mostrado que induce protección y respuesta inmune terapéutica contra infecciones por *M. tuberculosis* en modelos murinos cuando son inyectados repetidamente vía intramuscular (Johansen et al., 2003).

Los efectos terapéuticos de la vacuna ADN, muestra estadísticamente una reducción significativa en el número de bacterias, incremento específico en la respuesta de producción de Gamma Interferon (IFN- γ) y resistencia a re-infección en un ensayo en ratones hembras de 6 semanas de edad. En un

ELISA de un lavado de células alveolares, se encontró substancialmente más IL-12 en respuesta a la estimulación no específica después de la vacunación terapéutica con Hsp65 (Lowrie, 2006).

Un estudio realizado en ratones de entre 6 a 8 semanas de edad infectados con *M. tuberculosis* resistente a drogas, se midieron varios modelos de tratamiento contra TBB, de los cuales, el grupo no tratado con respecto a la variable Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por 10^5 , se obtuvieron los siguientes resultados (5.58 ± 1.98 ; 8.70 ± 2.14 y 13.45 ± 2.42) resultados tomados al mes, tres meses y seis meses respectivamente. Por otra parte el grupo tratado con $100\mu\text{g}$ vía intramuscular de la vacuna ADN-Hsp65 obtuvo los siguientes resultados (2.62 ± 0.72 ; 1.57 ± 0.11 y 0.09 ± 0.01) en el mismo periodo que los no tratados, demostrando con ($P < 0.001$), que la reducción en la cantidad de UFC fue significativa, por la utilización de la vacuna ADN (Silva et al., 2005).

Un grupo de ratones fueron inmunizados bajo el siguiente protocolo: Antígeno recombinante *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) hsp65 (rshsp65, $25\mu\text{g}$) emulsificado en FIA e inyectada subcutáneamente ($100\mu\text{l}$) dos veces semanalmente luego $25\mu\text{g}$ inyectados intravenosamente en solución salina. La dosis semanal fue de 10^5 células inyectadas intravenosamente por cuatro semanas, también fueron vacunados BCG con bacterias vivas a razón de 10^5 en $50\mu\text{l}$ de solución salina, así como también con vacuna ADN que contiene el gen hsp65, mostrando los siguientes resultados (Cuadro 3) Lima et al., 2001.

En un grupo de 48 vacas Holstein Friesian sanas de entre 5 y 6 meses de edad, vacunadas con: BCG, vacuna ADN que codifica Hsp65 y no vacunadas; se encontró que la cantidad de IFN- γ formado fue superior en el grupo vacunado con ADN, que en el grupo vacunado con BCG y no vacunado; con valores de 1.76 ± 0.17 , 1.27 ± 0.08 y 1.65 ± 0.15 Log₁₀ en el número de células formadoras de IFN- γ por 10^6 células mononucleares sanguíneas periféricas

Cuadro 3. Células productoras de IFN- γ o IL-4 en respuesta a PMA plus anti CD3 entre células T CD4 y CD8 de ratones inmunizados

Tipo de Inmunización	Número de células que produjeron citocinesis.							
	1 Mes				4 Meses			
	CD4		CD8		CD4		CD8	
	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4	IFN- γ	IL-4
RHsp65-FIA	98 $\pm$ 11 ^d	36 $\pm$ 6	79 $\pm$ 10 ^d	31 $\pm$ 5	74 $\pm$ 11	19 $\pm$ 8	84 $\pm$ 15	28 $\pm$ 7
Hsp65-ADN	2248$\pm$86^d	48 $\pm$ 6	1655$\pm$94	69 $\pm$ 5	1876$\pm$113^d	51 $\pm$ 9	968$\pm$156^d	44 $\pm$ 13
Plasmad ADN	94 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3	106 $\pm$ 7	26 $\pm$ 4	84 $\pm$ 8	72 $\pm$ 13	40 $\pm$ 9	28 $\pm$ 7
BCG	451 $\pm$ 28 ^d	288 $\pm$ 28 ^d	379 $\pm$ 38 ^d	195 $\pm$ 37 ^d	389 $\pm$ 38 ^d	156 $\pm$ 36 ^d	421 $\pm$ 57 ^d	195 $\pm$ 9

PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).

Adaptado Lima et al., 2001

respectivamente por grupo, respecto a las células específicas a Hsp65 con un $P < 0.01$ a las 10 semanas post vacunación (Skinner et al., 2003). La eficacia demostrada en un estudio realizado por Lima et al., 2003, muestran que la aplicación de la vacuna ADN Hsp65 vía intramuscular redujo de forma significativa $P < 0.01$, la cantidad de CFU de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en pulmones de ratones infectados experimentalmente con esta cepa.

La protección contra tuberculosis utilizando vacunas ADN ha sido demostrada en modelos de animales pequeños utilizando diferentes antígenos micobacteriales. Un estudio realizado en becerros de 6 meses de edad de raza Friesan, se inmunizó a un grupo intramuscular con 1mg de plásmido pCMV4.65-Hsp65, 3 dosis a intervalos de 3 semanas, otro grupo con *M. tuberculosis*-Hsp65 recombinante 2 dosis, la primera 1mg a la tercera semana y la segunda 0.5mg a la sexta semana por animal y el tercer grupo con 1mg intramuscular de pCMV4.65 1mg intramuscular más *M. tuberculosis*-Hsp65 recombinante subcutáneo 1mg a la tercera semana y 0.5mg a la sexta semana. Se evaluó la inducción de respuesta inmune celular en becerros vacunados con Hsp65 en la producción de IFN- γ del tercer grupo (media = 33.75 DO) se incrementó marcadamente con relación a los otros al grupo uno (2.88 DO) y dos (3.88 DO).

La vacuna de ADN induce una fuerte respuesta inmunomediada de CD4+ y CD8+ en ratones, por un lado los estudios con la vacuna ADN HSP65 sugieren que la protección celular es fuerte, es decir, ya que IFN- γ es producido predominantemente por células T CD4+ Th1, lo que viene de la activación bajo la influencia de IL-12. Mientras que las células T CD8+ son moléculas CPH tipo I son restringidas por los efectos de las citocinas como IFN- γ que también exhibe actividades citotóxicas, y dado que la inmunización con la vacuna ADN Ag85A sólo estimula fuertemente la respuesta por células CD8+, resulta deficiente en efecto antimicobacterial, debido a la no estimulación de las respuestas celulares (Buddle et al., 2002; Huygen, 2003).

MATERIALES y MÉTODOS

Localización.

El presente estudio prospectivo se realizó en un Establo en la Ciudad de Tijuana, Baja California, Latitud: 32° 31' 30" N, Longitud: 117° 0, durante el periodo comprendido de Diciembre 2006 a Diciembre 2007. El Hato cuenta con un promedio de 600 animales de la raza Holstein Friesian adultos (mayores de 24 meses) en producción. Además tiene historia de aislamiento bacteriológico de *M. bovis*, lo que garantiza la presencia de la bacteria en el hato. Las vacas son ordeñadas dos veces por día (producción promedio de 28 litros/día/vaca), tienen un promedio de 120 días abiertos y 2.5 servicios por concepción. La prevalencia de la TBB en el establo es del 40% (Dato no publicado, comunicación directa. Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista IICV-UABC).

Criterios de Inclusión.

Se consideró animal positivo a TBB aquel que resultó positivo tanto a la prueba de Tuberculina como a la prueba diagnóstica serológica de Gamma Interferón (IFN- γ) utilizando el kit *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test for Cattle (BOVIGAM, 2005).

Selección de Animales.

Al inicio del experimento el hato fue probado con la prueba de tuberculina, de la que se obtuvo un total de 120 animales positivos. Se colectó muestra sanguínea de los 120 para realizar la prueba de IFN- γ , obteniéndose un total de 67 animales positivos, los cuales fueron incluidos en el estudio acorde a los criterios de inclusión previamente descritos. Distribuidos aleatoriamente y bloqueando en base a lactación, los 67 animales fueron agrupados en dos grupos: Vacas Tuberculosas Vacunadas (VTV) n=35 y Vacas Tuberculosas No

Vacunadas (VTNV) n= 32. Para la conformación de grupos no se consideró el nivel de reacción a la prueba de tuberculina, ni el nivel de gamma interferón obtenido al inicio del estudio.

Prueba de Tuberculina (PPD).

Se realizó la prueba doble comparativa. El sitio de aplicación superior fue de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior fue aproximadamente de 13 cm debajo de la anterior, en esta prueba se inoculó a nivel intradérmico 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino, respectivamente. En el sitio de inoculación se rasuró y midió el grosor del pliegue de piel en el centro de inoculación utilizando el cutímetro y se procedió a la tuberculinización. La lectura de esta prueba se realizó 72 h (+ 6 h), midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones (NOM-EM-017-ZOO-2005). Considerando como positivo aquel animal con una reacción inflamatoria superior a los 4mm post-aplicación.

Recolección de sangre para los ensayos de Gamma Interferón (IFN- γ)

Se recolectaron 6 ml de sangre en animales post-tuberculinizados de la vena caudal, empleando tubos vacutainer con heparina de litio por muestreo. Estas muestras fueron colocadas en hielera conteniendo refrigerante para conservarse a una temperatura aproximada de 25°C y enviada al Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. La sangre de los 120 animales se analizaron con esta prueba al inicio del estudio para conocer su estado de enfermedad y posteriormente a los 3, 6 y 9 meses de iniciado el estudio con el propósito de evaluar el comportamiento del antígeno PPD bovino en los animales.

Antígenos utilizados para IFN- γ

Se emplearon 2 tipos de antígenos para detectar TB en los animales bajo

estudio. Los antígenos fueron: PPD bovino y PPD aviar. Solución salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7.2) fue empleada como blanco Negativo (Neu).

Vacuna ADN Hsp65.

La vacuna AND Hsp65, se elaboró en el Laboratorio de Biología Molecular, del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, utilizando el Plásmido pCDNA3-Hsp65 de *Mycobacterium leprae* (Lima et al., 2003), donado por el Dr. Alexei Licea Navarro del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) procesado con el Kit QIAGEN® Plasmid Giga Kit (5) For Purification of Ultrapure, Transfection Grade Plasmid DNA, bajo los lineamientos del Protocolo: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Mega and Giga Kits.

Prueba de IFN- γ

La prueba de IFN- γ fue utilizada para medir las respuestas *in vitro* de los linfocitos T. Los análisis se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Rothel, *et al.*, 1990; Wood, *et al.*, 1990; 1991; 1992; 1994), cada muestra en vacutainer con heparina de litio fue separada en 3 tubos de polipropileno de 10ml, adicionando 750 μ l de sangre por tubo que se estimuló con 50 μ l del antígeno, se incubó por 24hrs, posteriormente se colectó 170 μ l de plasma y congelados a -20°C para su posterior análisis. El plasma sensibilizado fue probado en placas de BOVIGAM que fueron medidas en un lector ELISA a 450 nanómetros, utilizando un control positivo y negativo para cada ensayo. Las densidades ópticas (DO) de las muestras se calcularon de la siguiente manera: El resultado de la DO del Neu menos el resultado de las DO del bovis $\geq$ a 0.100 es positivo a bovis y la DO de avium menos la DO de bovis $\geq$ 0.100 es considerado positivo a *M. bovis*.

Prueba de Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

Adicionalmente se recolectó moco nasal al final del estudio, con hisopo estéril, conservados en tubos vacutainer estériles. El procesamiento de las muestras consistió en colocar el primer hisopo en tubo eppendorf de 1.5ml y agregar 100µl solución buffer ATL del kit de extracción de DNA, DNeasy Tissue Kit (250) Qiagen (Qiagen, 2006), centrifugar a 8000rpm en centrífuga eppendorf modelo 6417 y en el mismo tubo colocar el siguiente hisopo y agregar 100µl solución buffer ATL y continuar con los lineamientos del protocolo: Purification of Total DNA from Animal Tissues, del cual se realizaron las siguientes modificaciones: se triplicó el tiempo de centrifugación debido a la residualidad de etanol y en el ultimo paso las muestras fueron almacenadas en agua destilada libre de ADN y ARN (Ultra Pure. Distilled Water DNase, RNase Free. 0.1 micron filtered (Molecular Biology Grade). Posteriormente las muestras fueron procesadas mediante la prueba PCR, bajo los lineamientos de Liébana et al., 1995, en el Equipo de PCR Hybaid Modelo Express, se utilizó una cepa control AN5 de campo, cepa que se encuentra en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (comunicación directa con Dr. Gerardo E. Medina Basulto), posteriormente se prepararon geles de agarosa al 1% en medio TAE1x, donde las muestras junto con el marcador de peso y la muestra control fueron corridas a 100V en cámara de electroforesis teñidas con bromuro de etidio 0.5µg/ml, luego leídas en lector ultravioleta BioRad UV Transilluminator 2000.

Inmuno Blot.

Una de las técnicas más importantes en el análisis y caracterización de fracciones antigénicas es la Electroinmunotransferencia (Western Blot o Inmuno Blot), que básicamente es un proceso cualitativo que combina la selectividad de la electroforesis en gel de poliacrilamida, que permite fraccionar al antígeno,

con la sensibilidad de la prueba inmunoenzimática, que pone en evidencia los complejos antígeno-anticuerpo formados (Chávez et al., 2007)

Los sueros de los grupos vacunados y no vacunados fueron analizados mediante la técnica molecular de inmuno blot, utilizando el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) en gel SDS al 10%. Carriles de Hsp65 pura (stressgen) fueron corridos por electroforesis y pasado a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada a 4°C con los sueros de animales de estudio, usando como control negativo BSA (Suero de Albúmina Bovina) 5mg, y como control positivo Hsp65 con anticuerpos monoclonales antihsp65 1:1000 (stressgen). Se utilizó como anticuerpo secundario Anti-IgG Bovino (Sigma) para los sueros y Anti-IgG de Ratón (Sigma) al marcador de pesos y controles negativos y positivo, y finalmente se procedió al revelado con ABTS® Peroxidase Substrate (Sambrook y Russell, 2001).

Vacunación.

Se aplicaron 3 dosis de 1mg con la vacuna ADN Hsp65 vía subcutánea a nivel de la articulación escapulo-humeral; revacunando a las 3 y 6 semanas posteriores a la primera vacunación.

Análisis Estadístico.

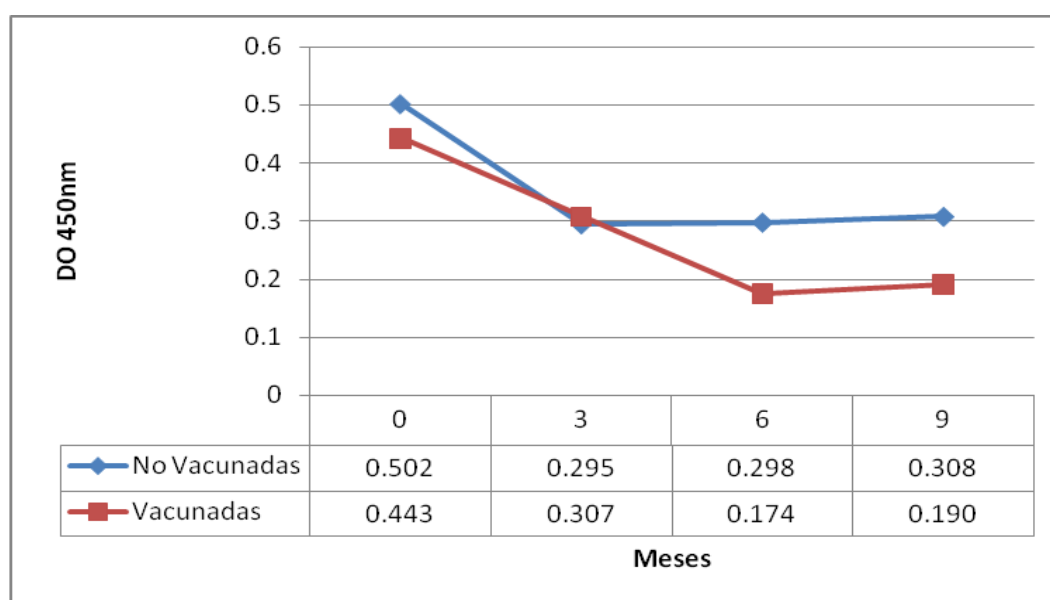
La información colectada fue almacenada en una Base de Datos en el Paquete Estadístico Excel, y analizada posteriormente en el paquete estadístico MedCalc®. Se utilizó una prueba de *t*-student para la comparación de medias grupales de las muestras de animales a los que se les aplicó la prueba de IFN- γ con un intervalo de confianza del 95%, además de la prueba chi cuadrada (χ^2) para comparar la proporción de animales positivos y negativos que se sometieron a la prueba de PCR, aplicando un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Producción de Gamma Interferón.

Los resultados como se muestran en la Fig. 2, muestran las diferencias de los niveles producidos de IFN- γ de los grupos vacunados y no vacunados sometidos al experimento, cabe mencionar que a los 9 meses de análisis, el grupo vacunado con una media de 0.190 OD $\pm$ 0.3789 SD muestra una diferencia significativa en la producción de IFN- γ respecto al grupo no vacunado con una media de 0.308 OD $\pm$ 0.4760 SD.

Figura 2. Media IFN- γ , muestreos 0, 3, 6 y 9 meses



Presencia de Anticuerpos Anti-Hsp65.

Los resultados de la prueba molecular inmunoblot en muestras de sueros del grupo vacunado colectados 3 meses post-vacunación con la vacuna ADN Hsp65 muestran positividad reaccionando a la proteína pura de Hsp65 a diferencia del grupo no vacunado que no mostró ninguna reacción a la prueba.

Determinando así la estimulación del sistema inmunológico de los animales vacunados debido a la vacunación. Imagen no mostrada.

Excreción de *M. bovis* en Exudado Nasal.

Las muestras analizadas con la técnica de PCR, mostraron que de un total de 68 muestras de secreción nasal fueron analizadas, 33 VTNV y 35 VTV. El 18% (6/33) de las VTNV presentaron la micobacteria, mientras que solo el 5% (2/35) de las VTV lo hicieron. Los resultados de nuestro estudio (18% detección de *M. bovis* VTNV) son consistentes con lo encontrado por (McIlroy et al., 1986) ya que el 19% de 55 animales de los cuales el 70% de ellos presentaba lesiones tuberculosas, se pudo aislar *M. bovis* en sus secreciones nasales. El valor de χ^2 en la prueba de comparación de proporciones revela que no hay diferencia estadística ($P=0.2051$) en el porcentaje de animales positivos a la prueba de PCR en el grupo VTNV que en el grupo VTV con un intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 4.- Excreción de *M. bovis* en secreción nasal.

Grupo	N	PCR +	PCR -	Excreción de <i>M. bovis</i> en secreción nasal (%)	χ^2 Comparación de Proporciones
VTNV	33	6	27	18.1	P=0.2051
VTV	35	2	33	5.7	
Total	68*	8	60	13.3	

* VTNV (Vacas Tuberculosas No Vacunadas), VTV (Vacas Tuberculosas Vacunadas).

DISCUSIÓN

Estudios relacionados, tal como, el efectuado por Lowrie et al., 1999, permiten hacer énfasis en que la vacuna ADN que codifica la secuencia Hsp65 de *M. leprae* tiene un efecto profiláctico y terapéutico en modelo murino, donde

el reto se realizó con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y la aplicación de isoniazida. Para efectos del presente experimento en el que se observó un efecto estadísticamente significativo con relación a la producción de IFN- γ en un modelo vacuno, la producción de otras citocinas y/o interleucinas no se evaluaron, y dado que en el estudio realizado por Lowrie et al., 1999 se realizaron pruebas adicionales como la medición de IL-10, IL-12 y la cantidad de CFU, sustenta dicho trabajo con base al cambio de inmunidad humoral a celular y el efecto de la vacuna en el valor de la cantidad de CFU, por lo que debido a la falta de dichas pruebas el presente estudio se encuentra limitado al no ser concluyente en sus resultados.

El modelo descrito por Lima et al., 2003, en el que se utilizaron ratones hembras y fueron inmunizados con el plásmido pDNA3-Hsp65, administrando vía intramuscular 50 μ g de DNA en 50 μ l de solución salina, muestra una proximidad en relación al tipo de vacuna empleada en el presente estudio. Cabe señalar que los ratones fueron retados con *M. tuberculosis* H37Rv vía intratraqueal, mostrando luego de tres inmunizaciones con intervalos de 2 semanas que únicamente los animales inmunizados vía intramuscular con la vacuna Hsp65 se protegían contra el reto de la micobacteria. La producción de IFN- γ de células pulmonares de los ratones retados mostró una producción estadísticamente significativa $P < 0.01$ con alrededor de 10,000 pg/g de pulmón en relación a IFN- γ comparados con el grupo control (ratones no inmunizados y retados) que mostraron una producción de alrededor de 30,000 pg/g de pulmón en relación a IFN- γ y además redujo la cantidad de UFC estadísticamente significativo $P < 0.001$ en relación al grupo control.

El protocolo de vacunación con ADN Hsp65 seguido de un refuerzo proteico de pCMV4 mostró una respuesta inmune celular más fuerte que aquellos vacunados únicamente con ADN Hsp65, donde estos últimos mostraron una respuesta inmune celular más homogénea (Vordermeier et al., 2003). Lo que puede sugerirnos que efectivamente la vacuna genera un efecto

sobre la estimulación del sistema inmune, haciéndolo más competente, aunque el estudio de comparación está realizado en un modelo profiláctico, en el presente experimento, podría considerarse su combinación con alguna proteína que potencialice su efecto.

La eliminación de *M. bovis* vía nasal no se suprimió debido a la vacunación ya que no se encontró diferencia estadística con relación a la reducción en la positividad a la prueba PCR entre los grupos vacunados y no vacunados.

Con relación a la información presentada con anterioridad, cabe señalar que aunque la vacuna ADN Hsp65 no tuvo el efecto esperado en nuestra hipótesis, el seguimiento y mejoramiento en el estudio de la misma, es de gran importancia. El presente estudio es el primero en su estilo y forma, por lo que considero que un nuevo protocolo en un ambiente con factores medio ambientales y de manejo, así como análisis de laboratorio más amplios y exhaustivos y controlados en su totalidad por los investigadores, pueda mostrarnos un nuevo camino, en la búsqueda del control y erradicación de la tuberculosis bovina.

CONCLUSIONES

La tuberculosis bovina tiene gran impacto en muchas áreas, tanto en aspectos de salud como de producción.

Por lo anterior, se puede concluir que efectivamente la vacuna Hsp65 tuvo un efecto con tendencia a la disminución en la producción de IFN- γ , y una eliminación vía nasal de micobacterias menor que aquellos no vacunados.

Con base a la información anterior nos permite hacer las siguientes observaciones:

1) La necesidad de un estudio a nivel experimental y posteriormente de campo en el que se controlen factores como la alimentación y el manejo es fundamental para generar información referente al comportamiento de la vacuna en modelo vacuno.

2) Además de las mediciones de IFN- γ , deberá realizarse una medición a la par de IL-2 e IL-10, entre otras, con la finalidad de determinar el momento en que ocurre el cambio de inmunidad de tipo humoral a tipo celular en un modelo vacuno, así como la medición de las CFU.

3) Realizar combinaciones con otros antígenos antimicobacteriales.

4) Realizar una evaluación de la cinética y efecto de la vacuna en diferentes concentraciones y retarla ante diferentes concentraciones de bacterias, con la finalidad de determinar el más efectivo en modelos vacunos.

Existen diversos protocolos que permiten alcanzar la erradicación, desafortunadamente en nuestro país es difícil de alcanzar debido a las limitantes económicas implicadas en dicho proceso.

LITERATURA CITADA

Abernethy D. A., G. O. Denny, F. D. Menzies, P. McGuckian, N. Honhold and A. R. Roberts. 2006. The Northern Ireland programme for the control and eradication of *Mycobacterium bovis*.

Aldwell F. E., L. Brandt, C. Fitzpatrick and I. M. Orme. 2005. Mice fed lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG are protected against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infection and Immunity. 73(3):1903-1905.

Andersen P. 2001. TB. vaccines: progress and problems. J. Trends in Immunology. 20(3):160-168.

- Bao L. W., C. H. Zhang and X. Wang. 2003. Virulence, immunogenicity and protective efficacy two recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin strains expressing the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infection and Immunity. 71(4):1656-1661.
- Biet F., M. L. Boschirolì, M. F. Thorel and L. A. Guilloteau. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). J. Vet. Res. 36:411-436.
- Boletín Epidemiológico Pan American Health Association. 2002-2005. <http://www.paho.org/hia/archivosvol2/paisesing/United%20States%20Mexico%20Border%20Area%20English.pdf>
- BOVIGAM, 2005. *Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle. Biocor Animal Health Inc. Omaha. U.S.A.
- Buddle B. M. 2003. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. J. Tuberculosis. 81(1/2):125-132.
- Buddle B. M., D. N. Wedlock and M. Denis. 2006. Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife. J. Veterinary Microbiology. 112:191-200.
- Buddle B. M., M. A. Skinner, D. N. Wedlock, D. M. Collins and G. W. De Lisle. 2002. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife. J. Veterinary Immunology and Immunopathology. 87:177-185.
- Buddle B. M., N. A. Parlane, D. L. Keen, F. E. Aldwell, J. M. Pollock, K. Lighbody and P. Andersen. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. J. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6(1):1-5.
- Cagiola M., F. Feliziani, G. Severi, P. Pasquali and D. Rutili. 2004. Analysis of Possible Factors Affecting the Specificity of the Gamma Interferon Test in Tuberculosis-Free Cattle Herds. J. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 11(5):952-956.
- Chan J., Y. Xing, R. S. Magliozzo and B. R. Bloo. 1992. Killing of virulent

- Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. J. Exp. Med. 175:1111-1122.
- Chávez S. F., O. Vásquez y H. Escalante. 2007. Evaluación de la técnica Western Blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis ana*. J. Rev. Peru Biol. 14(2):283-286.
- Coetzer J. A. W and R. C. Tustin. 2004. Infectious Diseases of Livestock. (3rd Ed.). Oxford University Press. South Africa, Cape Town.
- Collins F. M. 1994. The immune response to mycobacterial infection: Development of new vaccines. J. Veterinary Microbiology. 40:95-110.
- Collins J. D. 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. J. Veterinary Microbiology. 112:369-381.
- Corner L. A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Veterinary Microbiology. 40:53-63.
- Courtenay O., L. A. Reilly, F. P. Sweeney, V. Hibberd, S. Bryan, A. Ul-Hassan, C. Newman, D. W. Macdonald, R. J. Delahay, G. J. Wilson and E. M. H. Wellington. 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis?. J. Biology Letters. 2:460-462.
- Díaz O. F., R. V. Banda, L. M. Jaramillo, C. D. Arriaga, D. S. González y C. C. Estrada. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. J. Vet. Méx. 34(1):13-26.
- DNeasy Tissue Kit (250) Qiagen. Cat. No. 69506. Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues.
- Dunham S. P. 2002. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. J. Research in Veterinary Science. 73:9-16.
- Essey M. A and M. A. Koller. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. J. Veterinary Microbiology. 40:15-22.
- Fonseca D. M., V. L. D. Bonato, C. L. Silva and A. Sartori. 2007. Th1 polarized response induced by intramuscular DNA-HSP65 immunization is preserved in experimental atherosclerosis. Brazilian Journal of Medical and Biology Research. 40:1495-1504.

- Gheorghiu M., M. R. R. Lagranderie, B. M. E. Gicquel and C. D. Leclerc. 1994. *Mycobacterium bovis* BCG priming induces a strong potentiation of the antibody response induced by recombinant BCG expressing a foreign antigen. J. Infection and Immunity. 62(10):4287-4295.
- González O. R., C.B Gutiérrez, D. Alvarez, V. A De la Puente, L. Domínguez and E. F. Rodríguez. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. J. Veterinary Microbiology. 70:55-66.
- Gormley D., M. B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill and J. D. Collins. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. J. Veterinary Microbiology. 112:171-179.
- Grange J. M and Yates M. D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. J. Veterinary Microbiology. 40:137-151.
- Griffin J. F., T., C. G. Mackintosh, L. Slobbe, A. J. Thomson and G. S. Buchan. 1999. Vaccine protocols to optimize the protective efficacy of BCG. J. Tubercle and Lung Disease. 79(3):135-143.
- Gurunathan S., D. M. Klinman and R. A. Seder. 2000. DNA vaccines: immunology, application and optimization. J. Annu. Rev. Immunol. 18:927-974.
- Hewinson R. G., H. M. Vordermeier and B. M. Buddle. 2003. Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics. J. Tuberculosis. 83:119-130.
- Howard J, L and R. A. Smith. 1999. Current Veterinary Therapy 4. Food Animal Practice. Pp. 341-344. W. B. Saunders Company. United States of America.
- Hope J. P and B. R. Villareal. 2008. Bovine TB and the development of new vaccines. J. Comparative Immunology Microbiology And Infectious Diseases. 31:77-100.
- Huygen K. 2003. Minireview. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of Mycobacterial diseases. J. Infection and Immunity. 71(4):1613-1621.

- Johansen P., C. Raynaud, M. Yang, M. J. Colston, R. E. Tascon and D. B. Lowrie. 2003. Anti-mycobacterial immunity induced by a single injection of *M. leprae* HSP65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles. *J. Immunology Letters*. 90:81-85.
- Johnston W. T., G. Gettinby, D. R. Cox, C. A. Donnelly, J. Bourne, R. Clifton-Hadley, A. M. Le Fevre, J. P. McInerney, A. Mitchell, W. I. Morrison and R. Woodroffe. 2005. Herd-level risk factors associated with tuberculosis breakdowns among cattle herds in England before the 2001 foot-and-mouth disease epidemic. *J. Biology Letters*. 1:53-56.
- Kamath A. T., C. G. Feng, M. Macdonald, H. Briscoe and W. J. Britton. 1999. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infection and Immunity*. 67(4):1702-1707.
- Kochi A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *J. Tubercle*. 72: 1-6.
- Lang M. L and A. Glatman-Freedman. 2006. Do CD1-Restricted T Cells Contribute to Antibody-Mediated Immunity against *Mycobacterium tuberculosis*?. *J. Infection and Immunity*. 74(2):803-809.
- Liébana E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo and L. Dominguez. 1995. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. *J. Clinical Microbiology*. 33(1):33-36.
- Liébana E., R. M. Girvin, M. Welsh, S. D. Neil and J. M. Pollock. 1999. Generation of CD8+ T-Cell Responses to *Mycobacterium bovis* and Mycobacterial Antigen in Experimental Bovine Tuberculosis. *J. Infection and Immunity*. 67(3):1034-1044.
- Lilenbaum W., J. C. Schettini, G. N. Souza, E. R. Ribeiro, E.C. Moreira and L. S. Fonseca. 1999. Comparison between a γ -IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *J. Vet. Med*. 46:353-358.

- Lima K. M., S. A. Dos Santos, R. R. Santos Jr., I. T. Brandão, J. M. Rodrigues Jr. and C. L. Silva. 2003. Efficacy of DNA-hsp65 vaccination for tuberculosis varies with method of DNA introduction in vivo. *J. Vaccine*. 22:49-56.
- Lima K. M., V. L. D. Bonato, L. H. Faccioli, I. T. Brandão, S. A. dos Santos, A. A. M. Coelho-Castelo, S. C. Leão and C. L. Silva. 2001. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *J. Vaccine*. 19:3518-3525.
- Lowrie D. B. 2006. DNA vaccines for therapy of tuberculosis: Where are we now?. *J. Vaccine*. 24(12):1983-1989.
- Lowrie D.B., R. E. Tascon, L. D. Bonato, M. F. Lima, L. H. Faccioli, E. Stravropoulos, M. J. Colston, R. G. Hewinson, K. Moelling and C. L. Silva. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *J. Nature*. 400:269-271.
- Lyashchenko K., A. O. Whelan, R. Greenwald, J. M. Pollock, P. Andersen, R. G. Hewinson and H. M. Vordermeier. 2004. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Specific to Tuberculosis. *J. Infection and Immunity*. 72(5):2462-2467.
- Mathews F., L. Lovett, S. Rushton and D. W. Macdonald. 2006. Bovine tuberculosis in cattle: reduced risk on wildlife-friendly farms. *J. Biology Letters*. 2:271-274.
- McDonough K. A., Y. Kress and B. R. Bloom. 1993. Pathogenesis of Tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with Macrophages. *J. Infection and Immunity*. 61(7):2763-2773.
- McIlroy S.G., S. D. Neil and R. M. McCracken. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *J. Veterinary Research* [abstr.] Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3526702?ordinalpos=7&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Monaghan M. L., M. L. Doherty, J. D. Collins, J. F. Kazda and P. J. Quinn. 1994. The tuberculin test. *J. Veterinary Microbiology*. 40:111-124.

- Morris R. S., D. U. Pfeiffer and R. Jackson. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. J. Veterinary Microbiology. 40:153-177.
- Neil S. D., J. M. Pollock, D. B. Bryson and J. Hanna. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Veterinary Microbiology. 40:41-52.
- NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
- Ohara N. and T. Yamada. 2001. Recombinant BCG vaccines. J. Vaccine. 19:4089-4098.
- Pollock J. M., J. D. Rodgers, M. D. Welsh and J. McNair. 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. J. Veterinary Microbiology. 112:141-150.
- Pym A. S., P. Brodin, L. Majlessi, R. Brosch, C. Demangel, Ann Williams, K. E. Griffiths, G. Marchal, C. Leclerc and S. T. Cole. 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. J. Nature Medicine. 9(5):533-539.
- QIAGEN® Plasmid Giga Kit (5) For Purification of Ultrapure, Transfection Grade Plasmid DNA. Cat. No. 12191.
- Raviglione M. C., D. E. Jr. Snider and A. Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. [abstr.]. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7807661?ordinalpos=107&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
- Repique C. J., A. Li, F. M. Collins and S. L. Morris. 2002. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: Effect of DNA vaccination on reactivation of disease and reinfection with a secondary challenge. J. Infection and Immunity. 70(7):3318-3323.
- Rook G. A., G. Seah and A. Ustianowski. 2001. *M. tuberculosis*: Immunology and vaccination. J. Eur. Respir. 17:537-557.
- Rothel J.S., S. L. Jones, L. A. Corner, J. C. Cox and P. R. Wood. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use

- for the detection of tuberculosis in cattle. J. Aust. Vet. 67(4):14'137.
- Rua-Domenech R., A. T. Goodchild, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, K. H. Christiansen and R. S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnosis techniques. J. Res. Vet. Sci. xxx:xxx-xxx.
- Ryan T. J., B. M. Buddle and G. W De Lisle. 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. J. Research in Veterinary Science. 69:57-61.
- Sambrook J and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. EUA. 3era Ed. Vol. 3.
- Silva C. L., V. L. D. Bonato, A. A. M. Coelho-Castelo, A. O. De Souza, S. A. Santos, K. M. Lima, L. H. Faccioli and J. M. Rodrigues. 2005. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. J. Gene Therapy. Doi:10.1038/sj.gt.3302418:1-7.
- Skinner M. A., B. M. Buddle, D. N. Wedlock, D. Keen, G. W. de Lisle, R. E. Tascon, J. C. Ferraz, D. B. Lowrie, P. J. Cockle, H. M. Vordermeier and R. G. Hewinson. 2003. A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. J. Infection and Immunity. 71(9):4901-4907.
- Skinner M. A., D. N. Wedlock and B. M. Buddle. 2001. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. J. Rev. Sci. Tech. 20(1):112-132.
- Thoen¹ C., O., J. H. Steele and M. J. Gilsdorf. 2006. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. (2nd Ed.). Blackwell Publishing.
- Thoen² C., L. Philip and I. deKantor. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. J. Veterinary Microbiology. 112:339-345.
- Vordermeier H. M., S. G. Rhodes, G. Dean, N. Goonetilleke, K. Huygen, A. V. S. Hill, R. G. Hewinson and S. C. Gilbert. 2004. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacilli Calmette Guérin. J. Immunology. 112:461-

470.

- Vordermeier M. H., D. B. Lowrie and R. G. Hewinson. 2003. Improved immunogenicity of DNA vaccination with mycobacterial HSP65 against bovine tuberculosis by protein boosting. *J. Veterinary Microbiology*. 93:349-359.
- Vordermeier H. M., K. Huygen, M. Singh, R. G. Hewinson and Z. Xing. 2006. Immune responses induced in cattle by vaccination with a recombinant adenovirus expressing mycobacterial antigen 85A and *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Infection and Immunity*. 74(2):1416-1418.
- Vordermeier H. M., P. C. Cockle, A. Whelan, S. Rhodes, N. Palmer, D. Bakker and R. G. Hewinson. 1999. Development of Diagnosis Reagents To Differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination and *M. bovis* infection in Cattle. *J. Clinical and diagnostic Laboratory immunology*. 6(5):675-682.
- Wedlock D. N., B. Vesosky, M. A. Skinner, G. W. De Lisle, I. M. Orme and B. M. Buddle. 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and Interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *J. Infection and Immunity*. 68(10):5809-5815.
- Wood P. R., J. S. Rothel. 1994. In vitro immunodiagnosis assay for bovine tuberculosis. *J. Vet. Microbiol*. 40(1-2):125-135.
- Wood P. R., L. A. Corner and P. Plackett. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *J. Res. Vet. Sci*. 49(1):46-49.
- Wood P.R., L. A. Corner, J. S. Rothel, C. Baldock, S. L. Jones, D. B. Cousins, B. S. McCormick, B. R. Francis, J. Creeper and N. E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Aust. Vet*. 68(9):286-290.
- Wood P. R., L. A. Corner, J. S. Rothel, T. Fifis, B. S. McCormick, B. Francis, L. Melville, K. Small, K. de Witte, et al. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnosis test for bovine tuberculosis. *J. Vet. Microbiol*. 31(1):71-79.

- Young B. D. and K. Duncan. 1995. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. J. Annual Rev. Microbiol. 49:641-673.
- Zumarraga M. J., V. Meikle, A. Bernardelli, A. Abdala, H. Tarabla, M. I. Romano and A. Cataldi. 2005. Use of touch down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. J. Vet. Diagn. Invest. 17:232-238.

DEDICATORIA

A mi Familia...

A lo largo de mi vida, como todo el mundo he tenido tropiezos, dificultades y fracasos que he logrado superar uno a uno gracias a la fortaleza y valores que mi familia me ha brindado. Con su constante apoyo y palabras de aliento para seguir adelante, por su eterna motivación y orgullo para vencer todas las dificultades y siempre dar el máximo en cada aspecto de mi vida. Por todo ello...

Gracias... Mi Familia.

AGRADECIMIENTOS

Esta experiencia ha creado en mí la necesidad de continuar desarrollándome de forma personal, intelectual y profesional, necesidad que debo en gran parte a la inspiración que mi maestro y mentor el Dr. En C. Tomás Benjamín Rentería Evangelista ha forjado en mí, sus interminables ideas producto de tanto esfuerzo me motivan a seguir adelante. Apremiar la nobleza de la cordialidad, la amistad, la humildad, la inspiración que surge de un sueño, la belleza del trabajo de escritorio pero sobre todo el de campo, son atributos que hoy en día encuentro con gratitud en mi persona y que he aprendido de una maravillosa persona que en esta travesía fue mi conciencia y mi guía, el M.C. Gilberto López Valencia, a quien le estoy profundamente agradecido por transmitirme tan nobles sentimientos. Describir lo que el Dr. En C. Gerardo Enrique Medina Basulto representó para mí durante el desarrollo de este proyecto sería realmente difícil, ya que fue no solo un gran maestro o un genial tutor, sino que también aprendí de él que la dedicación y el trabajo en equipo pueden lograr grandes cosas en la vida. Las constantes críticas y exigencias que el M.C. Alfonso De la Mora Valle dirigió a mi persona, me llevaron a ser una persona más analítica y detallista, características que están bien definidas en su persona y que transmite a todos a su alrededor, lo que nos hace mejores día a día. Hay tantas otras personas que influyeron en mí durante esta etapa de mi vida: M.V.Z. Raquel Pío, M.C. Rosa María Bermúdez, solo por mencionar algunos, pero todos influyeron tan positivamente y con quienes estaré siempre agradecido, ya que no solo los considero compañeros de trabajo o colegas sino verdaderos amigos con los que he contado en buenos y malos momentos. Y mis grandes amigas que cursaron junto a mí durante la maestría la M.C. Dixie May, M.C. Alma Patricia Sotelo y la futura M.C. Silvia Hernández.