

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**COMPARACION DE LA EFICACIA PROTECTIVA DE LAS VACUNAS**  
***Mycobacterium bovis* -BCG Y DE  $\Delta$  mce-2 CONTRA LA TUBERCULOSIS**  
**EN GANADO BOVINO**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

M.V.Z SARAI ESTRELLA SANDOVAL AZUARA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MEXICO

MARZO 2011

**Comparación de la Eficacia Protectora de las Vacunas *Mycobacterium bovis*-BCG Y  $\Delta$ mce2 Contra la Tuberculosis en Ganado Bovino Como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias.**

---

Dr. Gilberto López Valencia

---

Dr. Tomas Rentería Evangelista

---

Dr. Gerardo Medina Basulto

Mexicali Baja California México. Marzo 2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en especial a mi tutor: Dr. Gilberto López Valencia, por su invaluable e incondicional apoyo que recibí de su parte en la realización de este trabajo, por sus revisiones y críticas constructivas a los avances del proyecto.

Al Dr. Eduardo Sánchez López ex director del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC, por permitirme iniciar este proyecto y apoyarme en todo momento durante el curso del mismo.

Al Dr. Tomas Rentería Evangelista director actual del Instituto en Ciencias Veterinarias de la UABC, por permitirme continuar este proyecto.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por aceptarme en este programa de maestría que sin lugar a duda me han ayudado a madurar, ser mejor profesionista y mejor persona.

A mis compañeras, porque siempre me apoyaron y me brindaron su amistad tanto en los momentos agradables como en los tiempos difíciles.

A mis maestros, por todas sus enseñanzas, sus experiencias compartidas, sus consejos e ideas que me brindaron para crecer y crear más ideas.

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar este trabajo a mi esposo Jorge Alvidrez, por su apoyo incondicional y constante que me brindo día tras día en este largo proyecto.

A mis padres, porque siempre me han motivado a cumplir con mi metas, respetado y apoyado mis decisiones.

## RESUMEN

### **Comparación de la Eficacia Protectora de las Vacunas *Mycobacterium bovis*-BCG Y $\Delta$ mce2 Contra la Tuberculosis en Ganado Bovino**

Se llevó a cabo un estudio de investigación para comparar la eficacia protectora de las vacunas *Mycobacterium bovis*-BCG y de  $\Delta$ mce-2 contra la tuberculosis en ganado bovino. En un total de 15 becerros negativos a tuberculosis de seis semanas de edad divididos en tres grupos. El primer grupo: formado por 5 animales no vacunados, El segundo grupo: formado por 5 becerros vacunados con Mb-BCG, El tercer grupo: formado por 5 becerros vacunados con  $\Delta$ mce-2, los becerros de los tres grupos compartieron el mismo corral y a los dos meses posteriores de la vacunación, se retaron con la cepa virulenta AN5 de *M. bovis* (dosis  $1 \times 10^3$ ), a los tres grupos vía intratraqueal según Buddle et al. (1995). Todos los animales fueron tuberculinizados con la prueba doble comparativa, misma que se aplicó a los animales en tres ocasiones (Antes de la vacunación, un mes antes del reto intratraqueal (IT), un mes después del reto IT). Los resultados muestran que la vacuna  $\Delta$  mce2 induce una respuesta positiva a la tuberculina 4 semanas post-vacunación y al final del experimento 2/5 del grupo control, 4/5 del grupo vacunado con BCG y 4/4 en los vacunados con  $\Delta$ mce- 2 fueron reactores positivos. A las 16 semanas posteriores al reto IT se sacrificaron y se realizó la necropsia en donde se observaron lesiones macroscópicas calcificación 1, según la clasificación de Vordermeier et al. (2002) en 4/5 del grupo control, 2/5 del grupo vacunado con BCG y 1/4 del grupo vacunado con  $\Delta$ mce-2. Se realizó el estudio histopatológico de los tejidos en donde no se observaron lesiones características de tuberculosis

encontrando que 4/5 del grupo control, 4/5 del grupo vacunado con BCG y 0/4 vacunados con  $\Delta mce-2$ , mostraron hiperplasia linfoide. Los resultados de la necropsia mostraron que la vacuna  $\Delta mce2$  tiene una eficacia protectora similar a BCG, mientras que por histopatología no se encontraron anormalidades en los animales vacunados con  $\Delta mce2$ , consideramos que es necesario continuar con más estudios que permitan evidenciar claramente la eficacia de la vacuna  $\Delta mce2$ , ya que en este estudio las lesiones en ganglios linfáticos y pulmón no fueron muy evidentes.

## ABSTRACT

### Comparison of the protective efficacy of vaccines *Mycobacterium bovis*- BCG and $\Delta$ mce-2 against tuberculosis in cattle

Are search was conducted to compare the protective efficacy of vaccines *Mycobacterium bovis*- BCG and  $\Delta$ mce-2 against tuberculosis en cattle. We used 15 calves negative for tuberculosis six weeks old, that were divided into three groups. The first group was composed of five non-vaccinated animals, the second group: composed of five animals with Mb-BCG, and the third group was consisting of five calves vaccine with  $\Delta$ mce-2. Calves of the three groups shared the same pen and two months later after vaccination, the three groups was challenged intratracheally with the virulent strain AN5 *M.bovis* (dose  $1 \times 10^3$ ). Buddle et al. (1995). All groups were tested with double tuberculin on three occasions (before vaccination, before and after challenge). The results show that the vaccine  $\Delta$ mce-2 induces a positive response to the tuberculin test 4 weeks post-vaccination and to the end of the study, in 3/5 of the control group, 4/5 of the vaccinated group with Mb-BCG and 4/4 of those vaccinated with  $\Delta$ mce-2. At 16 weeks after challenge the animals were euthanized and underwent necropsy of observing where classification 1 macroscopic lesion in 4/5 in the control group, 1/4 of the group vaccinated with Mb-BCG and 1/4 of the group vaccinated with  $\Delta$ mce-2. Histopathological study was conducted where no lesions characteristic of tuberculosis, however 4/5 of the control group, 4/5 of the Mb-BCG vaccine group and 0/5 vaccinated whit  $\Delta$ mce-2 only showed lymphoid hyperplasia. Necropsy results show that the vaccine  $\Delta$ mce-2 has protective

efficacy similar to Mb-BCG, histopathology while the animals vaccinated with the  $\Delta mce-2$  no abnormalities were found. Therefore was consider is necessary to continue with more studies to clearly demonstrated the effectiveness of the vaccine  $\Delta mce-2$ , since in this study the lesions in lymph nodes and lung were not very evident.



## CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| Lista de Cuadros .....  | X    |
| Introducción .....  | 1    |
| Revisión de Literatura .....  | 4    |
| <i>Historia de la tuberculosis</i> .....                                | 4    |
| <i>Etiología</i> .....  | 5    |
| <i>Patogénesis</i> .....  | 6    |
| <i>Epidemiología</i> .....  | 7    |
| <i>Infección por Mycobacterium bovis en animales</i> .....              | 8    |
| <i>Diagnóstico</i> .....  | 11   |
| <i>Cultivo bacteriológico</i> .....                                     | 11   |
| <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i> .....                        | 11   |
| <i>Prueba de campo tuberculina</i> .....                                | 12   |
| <i>Pruebas serológicas</i> .....  | 13   |
| <i>Control y erradicación</i> .....                                     | 14   |
| <i>Vacuna Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin (Mb-BCG...</i>   | 15   |
| <i>La vacuna BCG en Ganado bovino</i> .....                             | 17   |
| <i>Operones mce</i> .....   | 20   |
| Materiales y Métodos .....  | 26   |
| <i>Localización</i> .....   | 26   |
| <i>Diseño del estudio</i> .....   | 26   |
| <i>Pruebas de tuberculina</i> .....                                     | 26   |
| <i>Vacunación</i> .....   | 27   |
| <i>Recolección de sangre para los ensayos de interferon gamma</i> ..... | 28   |
| <i>Inspección post-mortem</i> .....                                     | 29   |
| <i>Estudios histopatológicos</i> .....                                  | 30   |
| Resultados .....  | 31   |
| <i>Inspección post-mortem</i> .....                                     | 32   |
| <i>Estudio histopatológico</i> .....                                    | 32   |
| Discusión .....   | 35   |
| Conclusiones .....  | 38   |
| Literatura Citada .....   | 39   |

## Lista De Cuadros

| Cuadro |   | Pág. |
|--------|---|------|
| 1      | Sistema semicuantitativo de clasificación de lesiones mediante la inspección post-mortem.....   | 29   |
| 2      | Resultados de la prueba tuberculina en 14 becerros a tres diferentes tiempos de estudio.....  | 30   |
| 3      | Resultados de la prueba diagnóstica de interferon gamma con la utilización de los antígenos PPD-Bovino y antígeno de secreción temprana 6 Esat-6, CFP1..... | 32   |
| 4      | Resultados de las pruebas aplicadas a los 14 becerros al final del estudio .....  | 33   |

## INTRODUCCION

La Tuberculosis (TB) humana es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la cual afecta anualmente a 8 millones de personas en todo el mundo, de estas 2 millones mueren (Young y Stewart, 2002). La tuberculosis en el ganado bovino es causada por *Mycobacterium bovis* (Mb) y afecta a más de 50 millones de animales en el mundo provocando pérdidas económicas de aproximadamente 3 mil millones de dólares al año (Steele, 1995). La TB en humanos y en animales continua siendo un problema de salud en el mundo (Cagiola et al., 2004) a pesar de los programas de control y erradicación que se han implementado en muchos países. En América Latina se estima que un 24 % de la población bovina no está bajo ningún sistema de control de la enfermedad (Abalos y Retmal, 2004). En México se pierde 40 millones de pesos diarios por concepto de detección de tuberculosis en el ganado (Millan et al., 2000), además la tuberculosis disminuye la producción de leche en un 17%, reduce la ganancia de peso hasta en un 15% y la fertilidad en un 6% (WHO, 1993).

Una de las principales estrategias que se ha utilizado para prevenir la TB es la aplicación de la única vacuna que ha sido aprobada para su uso en humanos: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin (Mb-BCG) que aunque no está aprobada para su uso en animales ha sido evaluada en el ganado bovino desde hace mas de 80 años en diversos países del mundo tales como Canadá, Estados Unidos, Reino Unido, México y algunos países de África. Los diferentes estudios sobre la

eficacia de la vacunación con Mb-BCG han sido inconsistentes ya que algunos han mostrado protección hasta en un 80% mientras que en otros no han mostrado ninguna protección (Chen et al., 2003). Debido a esto y a que en la actualidad no se cuenta con vacunas comerciales para prevenir la Tuberculosis bovina, es de carácter urgente contar con una vacuna que ayude en el control de la pandemia que representa la tuberculosis. Ciertamente es necesario el desarrollo de vacunas más eficientes y mejores estrategias de inmunización que faciliten el control de la tuberculosis a nivel mundial. El reto actual, está en la búsqueda de nuevos antígenos de micobacterias que puedan ser reconocidos por el sistema inmune de personas y animales infectados, las cuales puedan proveer de una buena protección en diferentes modelos de animales.

*Mycobacterium tuberculosis* tiene cuatro operones involucrados en la capacidad de la bacteria para entrar a las células de mamífero, denominados mce (mammalian cell entry). Se ha demostrado su presencia en diversas especies de micobacterias mediante PCR incluyendo a Mb. La expresión de estos operones mce es importante para la virulencia y patogenicidad de la micobacteria (Kumar et al., 2003). Experimentalmente están siendo analizados como vacunas en ratones y se ha comprobado que la vacuna  $\Delta$ mce-2 desarrollada a partir de las mutaciones en los operones mce de *Mycobacterium tuberculosis* disminuye la expresión de genes de virulencia y aumenta la inmunogenicidad favoreciendo su capacidad de proteger aun mas que Mb- BCG (Aguilar el al., 2006).

**Por lo anterior este proyecto de investigación se llevara a cabo para comparar la eficacia protectora de las vacunas Mb-BCG y  $\Delta$ mce-2 contra la tuberculosis en ganado bovino.**

## REVISION DE LITERATURA

### Historia de la tuberculosis

La historia de la tuberculosis es un tema apasionante. En pocas enfermedades es posible documentar su estrecha relación con la historia de la propia humanidad. Se ha determinado la existencia de esta enfermedad desde hace miles de años, encontrándose el agente incluso en momias egipcias; se estima que la tuberculosis se estableció con el desarrollo urbano de la Edad Media en Europa, para luego diseminarse al nuevo mundo con los viajes de los descubridores, aunque la enfermedad ya existía en personas en América por lo menos 700 años antes de nuestra era (Montali et.,al 2001; Ospina, 2001).

Descripciones anatómicas y patológicas exactas de la enfermedad aparecen en el siglo XVII. Sylvius fue el primero en identificar los tubérculos, los abscesos y las cavidades; Magnet describió la forma miliar en 1702; el médico inglés Benjamín Martin en 1720 hace la primera conjetura de que la tuberculosis podría ser causada por “criaturas vivientes diminutas”; el médico francés Jean-Antoine Villamin demostró que la enfermedad podría pasar de humanos al ganado y de estos a conejo, postuló un microorganismo específico como causa de la enfermedad (Sarrel, 2000).

En Berlín el 24 de marzo de 1882, el Dr. Robert Koch (1843-1910) anunció el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, posteriormente denominado *Mycobacterium tuberculosis*. En 1905 se hizo merecedor del premio nobel de medicina (Romero, 1999).

El inicio de la producción industrial de la leche con el establecimiento de grandes rebaños durante el siglo XX preparó el terreno para el aumento de la infección por *M. bovis*. en el ganado, lo que se reflejaría luego en la transmisión del agente a las personas, principalmente a través del consumo de leche, influyendo inicialmente en la epidemia de la tuberculosis humana (Collins, 2000).

Clamette, Bacteriólogo Francés, en colaboración con Guerin, utilizaron medio de cultivo específico para disminuir la virulencia de *M. bovis*, cuya primera aplicación se hizo en el año 1921(Sarrel, 2000), y la cual se sigue usando ampliamente hoy en día (Small, 1999).

En 1982 la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la unión internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades de Pulmón, proclamaron el 24 de marzo como primer día mundial de la tuberculosis, el cual se sigue celebrando cada año en el mundo (World TB Day, 2001).

## **Etiología**

La tuberculosis bovina es una, enfermedad infecto- contagiosa la cual no solo afecta a los bovinos si no también a un amplio rango hospederos entre ellos el humano. Es causada por *Mycobacterium bovis*, bacteria Gram- positiva, de crecimiento lento, acido resistente que mide 0.15 - 0.35 x 0.5 – 4.0 micras (Jaensen y Mackey, 1979).

El termino tuberculosis se utiliza para las enfermedades que son causadas exclusivamente por agentes del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*; *M.bovis*; *M. Africanum*; y *M. microti*) ( Thoen y Himes, 1986).

*M. bovis* es una bacteria con una pared celular sumamente peculiar, con claras diferencias respecto a las paredes celulares de otros microorganismos, una de las principales características es su alto contenido de lípidos, (hasta un 60% del peso seco de la bacteria) los cuales han sido considerados como factores de virulencia importantes (Kremer, 2005).

La supervivencia de *M.bovis* en el medio ambiente natural es variada pero no concluyente. Algunos datos están basados en la contaminación experimental de sustratos (Duffield y Young, 1985),pero se estima que debe considerar también la capacidad infectante que se disminuye considerablemente en condiciones adversas (O'Reilly y Daborn, 1995).Diversos factores ambientales, como la temperatura, humedad, luz solar y pH entre otros, determinan la supervivencia de las bacterias y por consiguiente, su capacidad de mantenerse en el ambiente y transmitirse a los animales susceptibles. Microgotas y partículas de polvo en suspensión son elementos que favorecen la vía aérea en la transmisión ya que constituyen los fómites ideales para el transporte del bacilo y su posterior llegada al espacio alveolar (Menzies y Neill, 2000; Morries et al., 1994).

### **Patogénesis**

No existen mayores diferencias en la patogenia de la infección por *M bovis* entre humanos y bovinos (Wedlock et.,al 2002).

Una vez que infecta al hospedero, la micobacteria genera una pequeña lesión granulomatosa en el sitio de ingreso y en el linfonodo regional, lo que en conjunto se conoce como complejo primario de la



infección. En el individuo inmunocompetente se genera una respuesta inmune protectora que elimina o encapsula al patógeno siendo este el curso habitual de la infección (Rook y Hernández – Pando, 1996). Luego se diseminan por vía linfática a la cadena ganglionar. Posteriormente la diseminación se da por vía hematológica a órganos parenquimatosos. La diseminación de la bacteria al resto del organismo puede generar granulomas en prácticamente cualquier tejido, estableciendo diversos cuadros patológicos, como la tuberculosis cavitaria, miliar y perlada (Gazquez, 1991). Una vez infectado el individuo puede permanecer como portador durante meses, años e incluso por el resto de su vida (Flynn y Chan, 2001).

### **Epidemiología**

La principal vía de ingreso de la infección en los rebaños es mediante la introducción de bovinos enfermos o portadores de *M. bovis*. Debido a que el sistema respiratorio es la principal ruta por la cual ocurre y se disemina la infección, el contacto directo de nariz con nariz y el uso compartido de bebederos y comederos, son factores de gran riesgo que aumentan proporcionalmente con el tamaño del hato y la concentración de los animales. Todos los bovinos infectados son una fuente potencial de diseminación y una alta proporción de ellos excretarán *M. bovis* en algún momento de su vida. La importancia de la vía aérea en la transmisión se explica por la baja dosis infectiva que requiere *M. bovis* en tejido pulmonar, con la posibilidad incluso de que una sola bacteria establezca una

infección efectiva en el bovino a través de esta ruta (Cousins, 2001; Menzies, 2000).

La infección en el bovino se ha detectado prácticamente en todos los países del mundo, sin embargo las prevalencias son variables según áreas geográficas, tipo de explotación y los programas de control utilizados según el nivel de desarrollo del país. Los países pueden agruparse según a la prevalencia de reactores a la tuberculina: 1) debajo de 0.1% o nada, 2) entre 0.1% y 1%, y 3) más alto de 1% o desconocido (Ritacco et al., 2006). En el grupo de baja o nula prevalencia en donde se estima que existe aproximadamente una población de ganado de 61.6 millones, se encuentran la mayoría de los países del Caribe (Antigua, Bahamas, Islas Vírgenes, Dominicana, Grenada, Guadalupe, Montserrat, Antillas Holandesas, Santa Lucía, San Vicente, Trinidad –Tobago, Cuba). En el grupo de prevalencia intermedia incluye México y algunas regiones de Brasil con el 1%, Paraguay, República Dominicana, Nicaragua, Costa Rica y El Salvador, En donde la población de ganado es de 47.4 millones. El grupo de alta prevalencia lo componen Argentina con una prevalencia del 2.2%, Chile con el 4% de prevalencia, y en Haití, Guatemala, Bolivia, Ecuador, Perú, en algunas regiones de Brasil y Guyana no existe información reportada representando el 70% del ganado en América latina (Gil y Samartino, 2000; De Kantor y Ritacco, 2006).

### **Infección por *Mycobacterium bovis* en los animales**

*Mycobacterium bovis* tiene un amplio rango de hospederos y aunque tradicionalmente la preocupación ha estado enfocada en la

infección en el ganado y en el humano, hoy en día la variedad y cambios de manejo de las explotaciones ganaderas y la certeza de la importancia en el mantenimiento de la enfermedad, ponen en manifiesto las limitaciones que puede tener el control de la infección, especialmente cuando los animales silvestres están involucrados (Gallagher y Clifton-Hadley, 2000).

En la infección por *M.bovis* se describen dos tipos de hospederos, los de manutención y los incidentales. Los primeros son capaces de infectarse, enfermar y diseminar la bacteria a otros individuos susceptibles, permitiendo el establecimiento de la infección en las poblaciones (Ashford et., al 2001). Los hospederos incidentales en cambio (conocidos como “*spillover host*”) son capaces de infectarse, cursar con la enfermedad; pero la diseminación a otros individuos es infrecuente, requiriendo una fuente externa de la infección para mantener la infección de la población. El ser humano se encuentra en este grupo. Del total de especies susceptibles a *M.bovis*, unas pocas corresponden a hospederos de manutención y la gran mayoría de clasifica como incidentales (Whipple y Palmer, 2000).

No se ha demostrado predisposición genética de determinados hospederos a la infección por *M.bovis* ni mayor susceptibilidad debido a la edad, sexo, o estado reproductivo (Morris et., al 1994).

La ocurrencia de la enfermedad en ovinos y caprinos es limitada por los sistemas productivos generalmente extensivos a la que son sometidas estas especies y a las diferencias en su comportamiento, lo cual impide que se den las condiciones favorables para su transmisión (Morris et al., 1994). Sin embargo, en España se han identificado cepas de *M.bovis*

aisladas desde caprinos que tienen características genotípicas particulares y que predominan en esta especie animal. Esto ha llevado a postular a los aislados de caprinos, como pertenecientes a una nueva subespecie del complejo *M. tuberculosis* denominada recientemente *M.bovis subsp caprae* (Aranaz et al., 1999).

La infección en cerdos ocurre principalmente por vía digestiva al consumir productos lácteos o desechos de mataderos contaminados con *M.bovis*, pero su importancia epidemiológica es limitada pues la transmisión entre cerdos es insignificante, sus lesiones localizadas y sus sistemas productivos hacen que sean sacrificados a edades tempranas. El caballo también puede infectarse pero ello tiene escasa significancia epidemiológica. Los perros y gatos, deben ser considerados como hospederos potenciales en la vigilancia de la enfermedad, en especial cuando viven en la proximidad de rebaños bovinos (Morris et al., 1994). Se ha demostrado que el gato puede infectarse por el consumo de leche bovina contaminada con el bacilo (Huitema, 1992).

La infección en especies de hospederos incidentales es probablemente una consecuencia de los sistemas de manejo y de la oportunidad que ofrecen estos para una transmisión más eficiente del patógeno y el desarrollo de la enfermedad. Los factores de riesgo están más asociados a las explotaciones lecheras que a los rebaños de carne, debido a las condiciones intensivas de manejo y las mayores exigencias reproductivas sobre los animales (Morris et al., 1994).

## **Diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico para la tuberculosis son directos e indirectos: los primeros son los que determinan la presencia del agente etiológico en el animal mediante técnicas bacteriológicas e histopatológicas (OPS y OMS, 1992). Los métodos indirectos determinan la respuesta del animal al agente etiológico (OPS y OMS, 1992), esta puede ser celular, tal como la reacción a la tuberculina y la liberación de interferón gamma por parte de los linfocitos en presencia de tuberculina (OPS y OMS, 1992).

### ***Cultivo bacteriológico***

La prueba confirmatoria de la tuberculosis bovina es el cultivo microbiológico, donde se puede aislar *M.bovis* de muestras provenientes de animales sacrificados. Sin embargo esta prueba tiene el inconveniente de ser muy tardía ya que el microorganismo demora entre 4 y 8 semanas para crecer en medios selectivos (Thomson, 2006).

### ***Reacción en cadena de la polimerasa***

Otra prueba que permite identificar al agente causal en una muestra clínica es la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* la cual amplifica por medio de la enzima Taq polimerasa una región del material genético específico para el microorganismo, el cual puede ser entonces visualizado por técnicas bioquímicas

### ***Prueba de campo tuberculina***

Para el diagnóstico de rutina de la tuberculosis bovina en un hato la prueba más utilizada es la prueba de la tuberculina. La prueba se basa en la respuesta inmunológica del animal a la inyección intradérmica de 0.1ml en la dermis del pliegue caudal derecho con un extracto proteínico purificado (PPD) de *M.bovis* AN5 (De la Rúa-Domenech et al.,). La prueba de la tuberculina tiene como ventaja que es una prueba barata, pero posee algunas desventajas. Por ejemplo: a los animales que son inoculados no se le puede repetir la prueba hasta después de 60 días por anergia inmunogenica inducida por la misma prueba; además, los animales se deberán inmovilizar en dos ocasiones una vez para la inoculación y otra vez para la lectura de la prueba la cual es máxima a las 48-72 hrs después de su aplicación. En esta prueba cualquier induración igual o mayor a 4 mm se considera como una reacción positiva.

En diferentes estudios de campo se ha determinado una sensibilidad de la prueba de entre 77 -95%. Falsos negativos ocurren en animales viejos, animales que han parido recientemente, animales en el estado inicial o final de la misma enfermedad, animales infectados con otros agentes patógenos o en animales en estado caquéxico. La especificidad de la prueba es alta, (alrededor del 98%) sin embargo se han reportado valores de entre el 75-99% (Monaghan et al., 1994).

En México las pruebas autorizadas por la Norma Oficial Mexicana para el diagnóstico de la tuberculosis son: 1) Prueba en el pliegue caudal, 2) Prueba cervical comparativa, 3) Prueba cervical simple (NOM-EM-017-Z00-2005).

### ***Pruebas serológicas***

Debido a los inconvenientes anteriormente mencionados con respecto a la prueba de tuberculina, se ha desarrollado una prueba comercial para medir el *interferon gamma* (INF-  $\gamma$ ) (Bovine Gamma Interferon Test-Bovigam<sup>TM</sup>). La prueba consiste en incubar sangre completa de bovinos sospechosos de tuberculosis diagnosticados con PPD bovina y PPD aviar. Bajo condiciones especiales, si el animal ha estado en contacto con el microorganismo, sus linfocitos liberaran interferon gamma, el cual será detectado a través de un sistema de ELISA sándwich, donde los anticuerpos anti- gamma interferon unidos a la placa de 96 pozos capturarán el gamma interferon bovino. La reacción se detecta por la adición de un anticuerpo específico anti-gamma interferon conjugado a una peroxidasa, la cual reacciona con un substrato produciendo color. La sensibilidad de la prueba ha variado entre un 81.8% y un 100% en ganado confirmado como cultivo positivo a TB y una especificidad entre 94% y 100%. La prueba del INF  $\gamma$  posee una serie de ventajas adicionales para el diagnóstico de la tuberculosis bovina: a) se manipula a los animales una sola vez, b) se puede repetir la prueba tantas veces como sea necesario, c) la prueba es comparativa y excluye aquellos animales que puedan reaccionar por infecciones con micobacterias atípicas no patógenas d) el plasma del animal puede ser utilizado para el diagnóstico de otras enfermedades. Las desventajas son que la prueba es relativamente cara y necesita un laboratorio para el procesamiento de las muestras. La prueba

de INF- $\gamma$  se utiliza como prueba de diagnóstico complementaria o confirmativa (Wood, 2001).

### **Control y erradicación**

El interés por luchar contra la tuberculosis bovina se justifica tradicionalmente por su riesgo para la salud pública, las posibles limitaciones al comercio internacional de productos pecuarios y la disminución de la productividad de los animales infectados. Pero también adquiere creciente importancia en el bienestar animal y el estigma social para los productores que mantienen la enfermedad en sus explotaciones, quienes pueden ver limitados el movimiento de sus animales y depreciación de productos (Cousins et al., 1998).

El control de la tuberculosis bovina está basado en un diagnóstico oportuno de la enfermedad y la eliminación de los animales infectados (prueba y sacrificio), junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los rebaños (Morrison et al., 2000). Sin embargo en los países en vías de desarrollo, que no cuentan con un programa de indemnización para apoyar a los productores que tienen TB en sus hatos, el método de prueba y sacrificio no es viable (Pérez et al., 2002).

Entre las principales herramientas que se proyectan como retos para los programas de control, se encuentra el desarrollo de nuevas técnicas para el diagnóstico de la infección en las poblaciones y la aplicación de técnicas de genotipificación para la investigación epidemiológica de los aislados (Kato-Maeda y Small, 2000).



En cuanto al diagnóstico, las técnicas tradicionales deben ser complementadas con alternativas de mayor eficiencia, especialmente cuando la prevalencia de la enfermedad ha llegado a valores mínimos. En este sentido se han desarrollado pruebas para la detección de la respuesta inmune contra diversos antígenos micobacteriales (ESAT-6, CFP-10, MPB70 entre otros), para la detección de interferon  $\gamma$  bovino y para la detección directa del ADN bacteriano (Buddle et al., 2003), que deben ser evaluadas para las condiciones epidemiológicas de las áreas de control y utilizarlas como complemento al esquema tradicional de control de la infección (Vordermeier et al., 2001).

Otra herramienta epidemiológica para el control de *M.bovis* en países donde la prevalencia de la enfermedad es alta y no existe bolsa de indemnización, es la vacunación por lo cual sean estado desarrollando y estudiando distintos productos inmunogenicos en diversas especies susceptibles (Smith et al., 2004). También es de suma importancia contar con un programa de buenas prácticas de manejo en donde se lleve a cabo la pasteurización del calostro, desinfección de corrales, separación de animales sanos y enfermos, entre otros, lo que puede contribuir a la disminución de la presencia de la enfermedad en los hatos (Pérez et al., 2002).

### **Vacuna de *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin (Mb-BCG)**

La vacuna Mb-BCG es una vacuna viva atenuada la cual proviene de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* y fue creada por Albert Calmette y Camille Guerin en el instituto Pasteur en 1921. Los

Investigadores franceses iniciaron un cultivo con una cepa de *Mycobacterim bovis* la cual después de 230 pases sucesivos perdió su virulencia (Orme, 2001).

En la actualidad Mb-BCG es la única vacuna que ha sido aceptada para la prevención de tuberculosis en humanos y se calcula que ha sido administrada a más de 2500 millones de personas, lo cual la convierte en la vacuna más utilizada en la población humana hasta el momento. La Organización mundial de la salud (OMS) recomienda la vacunación con BCG en lugares donde la incidencia y prevalencia de la tuberculosis es alta. Esta recomendación se sigue en 230 países (WHO, 1995). La vacuna Mb-BCG tiene la ventaja de ser barata y segura, debido a que son raras las complicaciones (Wadell et al., 2001). Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas, esta vacuna tiene la enorme desventaja de que el grado de protección que confiere es extremadamente variable (Fine, 1991). Por ejemplo en Inglaterra, la protección que ha proporcionado esta vacuna es de 50 a 80%, mientras que en Malawi, África, o el sur de la India la protección fue de cero (Black et al, 2002). Algunas de las causas definidas de esta gran variación en la protección que confiere la vacuna son:

- a) El amplio espectro de la virulencia que existe entre las cepas de *M. tuberculosis*.
- b) La pérdida progresiva de la capacidad de la vacuna para estimular una respuesta inmune protectora.
- c) El nivel de exposición a micobacterias saprofitas
- d) La diversidad genética entre las subcepas de Mb-BCG (Martin, 2005).

## La Vacuna BCG en ganado bovino

La vacunación tiene como objetivo proteger a los no infectados, especialmente en poblaciones donde el riesgo de transmisión es elevado. Su función es reemplazar una infección natural virulenta por otra con una cepa de bacilos Mb-BCG avirulentos, capaz de despertar las defensas del huésped frente a nuevas infecciones (Young y Dye, 2006). Además una de las metas importantes es que la vacuna no genere una respuesta positiva frente a la prueba de la tuberculina. La vacuna de Mb-BCG induce una respuesta positiva a la tuberculina y por lo tanto, es importante la utilización métodos de diagnóstico que permitan distinguir entre los animales vacunados y los infectados con *M. bovis*. Por lo anterior es necesario el desarrollo de vacunas que no induzcan una reacción positiva a tuberculina (Buddle, 2001). Desde el desarrollo de la vacuna Mb-BCG, está siendo evaluada en el ganado, sin embargo la protección ha sido de corta duración y en varias de las ocasiones se ha observado que Mb-BCG protege contra las infecciones experimentales pero no contra la infección natural (Skinner et al., 2002). Actualmente no se cuenta con ninguna vacuna comercial para su uso en animales, pero diferentes grupos están trabajando para encontrar la vacuna ideal.

Castañón y López (2004) afirman que es necesario un mayor esfuerzo para saber la diferencia que existe en la respuesta inmune que brindan las diferentes cepas de Mb-BCG, y por que en algunos casos la vacunación falla. Solo entonces se podrá realizar el desarrollo de la siguiente generación de vacunas en contra de la TB. (Wedlock et al., 2007). Existen numerosos estudios en los cuales se ha demostrado una

significante protección en el ganado con la cepa Pasteur de Mb-BCG, sin embargo no está bien definido si otras cepas de Mb-BCG son efectivas. Se realizó un estudio en donde se comparó la protección y la respuesta inmune a la tuberculosis bovina inducida en campo vacunando con Mb-BCG Danesa y Mb-BCG Pasteur. Se trabajó con cuatro grupos: el vacunado con cepa Pasteur cultivo fresco (dosis:  $1 \times 10^6$  UFC) , el vacunado con cepa Danesa cultivo fresco (dosis:  $1 \times 10^6$  UFC), el vacunado con cepa Pasteur liofilizada( dosis:  $4 \times 10^6$  y el grupo no vacunado, aplicándose de manera subcutánea (SC) en los cuatro grupos. La media de producción de Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) (ng/ml) fue de 0.154, 1.87, 3.26 para el grupo no vacunado, vacunado con cepa Danesa y vacunado con cepa Pasteur respectivamente. El resultado demostró que el 90% del grupo no vacunado presentó lesiones en pulmón, 50% en el grupo vacunado con cepa Danesa y 40% vacunado con cepa Pasteur (Wedlock et al., 2007).

Buddle et al. (1995) realizaron un estudio en donde utilizaron la vacuna Mb-BCG en becerros (vía subcutánea SC), utilizando una dosis baja de  $6 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y una dosis media de  $6 \times 10^6$  UFC (cepa Pasteur). Utilizando la dosis baja la presencia de lesiones en pulmón se redujo significativamente, ya que a los cinco meses posteriores a la inoculación de *Mb* por vía intratraqueal (IT), solo el 13.3% (2/15) de los animales vacunados con dosis baja presentó lesiones en pulmón. El 26.6% (4/5) de los animales vacunados con dosis media presentaron lesiones, mientras que el 62% (10/16) de los animales controles presentaron lesiones.

En otro trabajo se evaluó el efecto de la revacunación con la vacuna Mb-BCG (6 semanas después de la primera aplicación) sobre el nivel de protección contra el reto IT de *M.b.* siendo los animales sacrificados 4 meses después del reto. La proporción de animales con lesiones macroscópicas en pulmón por grupo fue: 0% en el grupo vacunado dentro de las primeras 8 horas de nacimiento, 11% en el grupo vacunado a las 6 semanas, 40% en el grupo revacunado y 100% en el grupo control. No se presentó diferencia significativa entre el nivel de protección entre los grupos vacunados al nacimiento y a las 6 semanas, mientras que los animales revacunados tuvieron menos protección (Buddle et al., 2003).

Buddle et al. (2008), evaluaron la vacuna Mb-BCG (cepa Pasteur) administrada por vía oral y por vía SC (dosis:  $1 \times 10^6$  UFC). Los animales fueron sacrificados 17 semanas después del reto IT de *M.b.* El 30% de los animales que recibieron la vacuna vía oral desarrollaron lesiones en pulmón, mientras que el 20% de los que recibieron la vacuna vía SC presentó lesiones, en tanto el 70% de los animales controles desarrollo lesiones. Por lo anterior, la vacunación administrada por cualquiera de las dos vías induce niveles comparables de protección contra la tuberculosis.

López et al., (2009) realizaron un estudio para evaluar la eficacia protectora de la vacuna Mb-BCG bajo condiciones de campo ( $1 \times 10^6$  única aplicación). En un total de 140 becerros Fresian Holstein de una a dos semanas de edad. Se dividieron en dos grupos de 70, un grupo fue vacunado y el otro se le administró un placebo durante la segunda semana de edad y se le dio continuidad hasta los 12 meses de edad. Se considero

en este estudio un caso positivo a tuberculosis cuando el animal reaccionó positivo a tres pruebas de seguimiento: tuberculina, INF PPD -B e INF $\gamma$  ESAT6-CFP10 durante los 12 meses de exposición. Los resultados mostraron una eficacia de 59.4%.

### **Operones mce**

Es necesario reconocer que lo mas importante en la primera fase de la infección bacteriana en el huésped, es la manifestación de componentes específicos en la membrana del patógeno que facilitan la entrada a las células de huésped y sus tejidos (Brennan et al., 2001). Muchos microorganismos han evolucionado desarrollando nuevas adhesinas que se relacionan a moléculas comúnmente encontradas en la superficie de las células eucariotas (Relman et al., 1999; Dersh et al., 2000). *Mycobacterium tuberculosis* muestra un tropismo por los macrófagos pero también puede infectar a las células epiteliales, ya que se ha demostrado que algunas de sus proteínas tienen relación con proteínas de origen extracelular como la fibronectina (Menozzi et al., 1996).

En la década pasada se realizaron grandes avances que han facilitando la manipulación biológica molecular de micobacterias lo cual ha incrementado el conocimiento de los mecanismos que utiliza el bacilo tuberculoso para sobrevivir dentro de los macrófagos (Smith, 2003).

Se han realizado estudios genéticos identificando numerosos genes de un fragmento de DNA de *M. Tuberculosis* H37Ra, los cuales codifican proteínas que mejoran la entrada y la sobrevivencia de las

micobacterias en los macrófagos. Estos genes se encuentran contenidos en cuatro operones a los cuales se les designó el nombre de mce por sus siglas en inglés mammalian cell entry (entrada a células de mamífero) que van de mce-1 a mce-4. También se encontró que mce-1 le confiere la habilidad a una cepa no patógena de *Escherichia coli* de entrar a células de mamífero y sobrevivir (Arruda et al., 1993; Cole et al., 1998). Wiker et al. (1990), señalan con anterioridad que estos operones se encuentran en *Mycobacterium bovis* exceptuando el operon mce-3. Parker et al. (1995), mostraron la presencia de estos operones en diversas especies de *Mycobacterium* mediante PCR.

Los investigadores Tekaiia et al., (1999) y Chitale et al., (2001) demostraron que mce-1 codifica para seis proteínas de superficie (mce-1A- mce-1F) que favorecen la entrada a las células HeLa. Esta localización apoya a la propuesta de que estas proteínas pueden interactuar con los componentes del huésped durante la infección y tienen influencia en la respuesta inmune (Cole et al., 1998).

Chitale et al., (2001) encontraron que mce-2 es similar a mce1 en un 67% pero no muestra esta propiedad. Esto sugiere que en adición a la entrada a las células del huésped los operones de mce probablemente tienen otras funciones. Es posible que la expresión del perfil de operones mce tenga importancia en la virulencia y patogenicidad de las micobacterias.

En otro estudio se plantearon como objetivos la búsqueda y la caracterización de los cuatro operones homólogos mce de *M.tuberculosis* (mce-1, mce-2, mce-3, y mce-4) en otras micobacterias no tuberculosas.

Se realizó dot-blot y PCR en 24 aislamientos clínicos representado a 20 especies diferentes de micobacterias encontrándose que los operones mce se distribuyen ampliamente en el género *Mycobacterium*. Los resultados de la búsqueda mostraron la presencia de mce-1, mce-2 y mce-4 homólogos en *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium smegmatis*. ADN y proteínas fueron alineadas para comparar los operones de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, encontrando que las proteínas deducidas para *M. bovis* en los operones mce-1, mce-2, y mce-4 fueron del 99.6-100% homólogos con las respectivas proteínas de *M. tuberculosis*. Los cuatro operones mce en diferentes especies de micobacterias son organizados generalmente de la misma manera. El árbol filogenético comparando los operones mce, mostro que el operon mce-1 se encuentra estrechamente relacionado con mce-2 y mce-3. La amplia distribución de los operones mce en micobacterias patógenas y no patógenas, implica que la presencia de estos genes de virulencia no es un indicador de la patogenicidad de los bacilos. En cambio la patogenicidad de estos factores podría ser determinada por su expresión (Haile et al.,).

Kumar et al. (2003), realizaron un estudio en el cual analizaron la expresión de los operones mce de *Mycobacterium tuberculosis* después de diferentes periodos de crecimiento en cultivos durante la infección in vivo. Se observó la expresión del operon mce1 en cultivo de 8-12 días, pero en este estudio los cultivos progresaron hacia una fase estacionaria y la expresión de el perfil de tales operones fue alterado, solo se pudo detectar por un periodo de tiempo la transcripción del operon mce-1 y mce-4. En el análisis de la expresión de mce mediante tejido de animales



infectados se observó la expresión de los operones *mce-1*, *mce-3* y *mce-4*. Bajo las condiciones realizadas en este estudio la expresión del operon *mce-2* no fue detectada, por lo que se examinó la organización de este operon encontrando que es diferente a los demás operones de *mce*. Los resultados sugirieron que no solamente se da la expresión del operon *mce-1* durante la infección, por lo cual es necesario examinar su función en la patogénesis.

Se ha reportado previamente que la interrupción en el operon *mce-1* causa una mayor virulencia que la cepa silvestre de *M. Tuberculosis* en ratones (Shimono et al., 2003). En este estudio se generó una mutación en *mce3* y *mce4* y una doble mutación en *mce3* y 4 (*mce3/4*), y se observaron en las características de crecimiento en todas las mutaciones realizadas y el tipo silvestre de *M tuberculosis* cepa H37Rv en cultivos y dentro de macrófagos. En adición se detectó la carga bacteriana en órganos de ratones infectados, la cual resultó similar en la mutación *mce3* y en la cepa silvestre, sin embargo las cargas bacterianas en ratones infectados con la mutación de *mce4* y *mce3/4* fue menos que con la cepa silvestre. La supervivencia media de los ratones infectados con la cepa silvestre, mutación *mce-3*, *mce-4* y *mce-3/4* fue de 40.5, 46, 58 y 62 semanas respectivamente. En la examinación histopatológica en pulmón a 15 semanas post infección se encontró que las lesiones en pulmón fueron prominentemente menores en los ratones infectados con la mutación *mce-4* y *mce3/4*, que con las otras dos cepas. Esta observación sugiere que los operones de *mce-3* y *mce-4* tienen una función distinta a la de *mce1* en las sobrevivencia de *M tuberculosis* in vivo (Senaratne et al. 2008).

Gioffre et al. (2005) para investigar si las proteínas codificadas por los operones mce son esenciales para la virulencia, generaron mutantes por interrupción de los operones de *M. tuberculosis* mce-1, mce-2, y mce-3 y se evaluó su capacidad de multiplicarse en el hospedero. Se infectaron ratones Balb/c utilizando la vía IT con las mutaciones realizadas  $\Delta$ mce-1,  $\Delta$ mce-2 y  $\Delta$ mce-3. Diez semanas después de la infección, todos los ratones infectados con  $\Delta$ mce sobrevivieron, mientras que los infectados con la cepa de campo murieron. Los ratones infectados con  $\Delta$ mce-1 desarrollaron pocos y pequeños granulomas, mientras que en los infectados con  $\Delta$ mce-2 y  $\Delta$ mce-3 se retrasó la formación de granulomas. En cambio cuando la infección se realizó por vía intraperitoneal resultó ser más virulenta  $\Delta$ mce-1, por lo cual se sugiere que las cepas mutantes en estos genes mutantes son buenas candidatas para ensayos de vacunación.

Aguilar et al. (2006), utilizaron las mutaciones de mce-2 y mce-3 para infectar ratones Balb vía IT, y se observó que la producción de INF- $\gamma$  y Factor de Necrosis Tumoral es inferior pero progresiva. Células de ganglios linfáticos y bazo de los ratones vacunados con ambas mutaciones de mce y Mb- BCG se estimularon con filtrado de cultivo micobacteriano y antígenos inmunodominantes (ESAT-6, Ag85) se observó una producción mayor de INF- $\gamma$  en los ratones vacunados con las mutaciones de mce que en los animales vacunados con Mb- BCG. Al utilizarse por vía subcutánea, 60 días antes del reto intratraqueal con la cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* (Beijín código 9501000), ambas

mutaciones manifestaron un mayor nivel de protección que la vacuna Mb-BCG. El 72% y el 62% de los ratones vacunados con  $\Delta mce-2$  y  $\Delta mce-3$  respectivamente sobrevivieron durante 16 semanas después del reto, en comparación con el 30% de los vacunados con Mb-BCG. Así mismo, se observó menor daño tisular (neumonía) y menor cantidad de UFC en los ratones vacunados con cualquiera de las dos mutantes en comparación con los resultados en los ratones vacunados con Mb-BCG. Estos datos sugieren que la interrupción de *mce-2* y *mce-3* disminuye la expresión de genes de virulencia y aumenta la inmunogenicidad de las vacunas vivas, favoreciendo su capacidad de proteger contra la tuberculosis aún más que la conferida por Mb-BCG.

# MATERIALES Y METODOS

## Localización

Este estudio se llevo a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Mexicali Baja California. Ubicada en Carretera San Felipe, Fracc. El Campestre. Se utilizó un solo corral en condiciones protegidas para los becerros sujetos a esta investigación. Se utilizo equipo de protección en todo momento.

## Diseño del estudio

Para evaluar la eficacia protectora de las vacunas Mb-BCG y  $\Delta$ mce-2 se diseñó un protocolo de investigación. En este se incluyeron un total de 15 becerros Holstein de 6 semanas de edad negativos a la prueba tuberculina doble comparativa (Utilizando PPD bovino y PPD aviar). Los grupos se identificaron con arete de plástico y se aleatorizaron de la siguiente forma. El grupo no vacunado (n=5), el grupo vacunado con Mb-BCG (n=5) y el grupo vacunado con  $\Delta$ mce-2. Los animales de los tres grupos compartieron el mismo corral

## Pruebas de tuberculina

Todos los animales fueron tuberculinizados con la prueba doble comparativa, misma que se aplico a los animales en tres ocasiones (Antes de la vacunación, antes y después del reto intratraqueal). Antes de aplicar la tuberculina, se rasuro el área donde se inoculo (tercio medio superior

del cuello). El sitio de aplicación superior, cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior de aproximadamente 13cm debajo de la anterior. Se levanto el pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procedió a medir y registrar el grosor de éstos, utilizando un cutímetro. Posteriormente, se inoculo a nivel intradérmico 0.1 ml de PPD aviar en el área superior y 0.1 ml de PPD bovino en el área inferior. La lectura de esta prueba se realizo (72 h  $\pm$  6 h) después de la aplicación, midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones (NOM-EM-017-ZOO-2005). Cualquier animal que presento una reacción con una diferencia  $\geq$  4 mm entre la lectura inicial y final se considero como positivo a la prueba de tuberculina (Buddle, *et al.*, 2001).

### **Vacunación**

Los becerros del grupo vacunado con Mb-BCG fueron inoculados subcutáneamente a nivel de la articulación húmero escapular con 1 ml (una sola dosis:  $1 \times 10^6$  UFC) de la vacuna de Mb-BCG (Cepa Tokyo). Los becerros del grupo vacunado con  $\Delta$ mce-2 se inocularon a nivel de la articulación húmero escapular con 1 ml (una sola dosis:  $1 \times 10^6$  UFC) de la vacuna  $\Delta$ mce-2. Los becerros del grupo control se inocularon mediante la aplicación de 1 ml de solución salina fisiológica. A los dos meses posteriores de la vacunación, se retaron con la cepa virulenta AN5 de *M. bovis* (dosis  $1 \times 10^3$ ), a los tres grupos vía intratraqueal según Buddle *et al.* (1995).

## **Recolección de sangre para los ensayos de interferon gamma (IFN $\gamma$ )**

La recolección de sangre para IFN $\gamma$  se realizó a todos los animales una vez al mes iniciando a las dos semanas después de la vacunación obteniendo un total de 8 muestreos durante el estudio. Se recolectaron 6 ml de sangre de la vena yugular. Se empleo un tubo vacutainer con heparina de litio y un tubo vacutainer sin anticoagulante. Estas muestras se conservaron a una temperatura aproximada de 25° C y se enviaron al laboratorio dentro de la primera hora de su recolección para su análisis. Los antígenos utilizados para detectar IFN $\gamma$  en los animales bajo estudio fueron PPD-B, PPD-A (CSL, Melbourn, Australia), el antígeno de secreción temprana 6 (ESAT6) y CFP-10 (estos últimos proporcionados por Ray Waters, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Ames Iowa). Se utilizo solución salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7.2) como blanco Negativo (Nil). Los análisis se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Wood *et al.*, (1994). Brevemente: en la fase 1, la sensibilización se llevó a cabo colocando cuatro muestras de 750  $\mu$ l de sangre heparinizada en tubos de borosilicato, a cada muestra se le colocó: a) 100  $\mu$ l de Solución Salina Tamponada PBS 7.2; b) 100  $\mu$ l de Stimulogen PPD Bovis; c) 100  $\mu$ l de Stimulogen PPD avium y; d) 100  $\mu$ l de ESAT6-CFP10. Posteriormente se incubó a 37 ° C de 18- 24 hrs, se centrifugaron a 4500 rpm durante 2 minutos y se recolectaron 180  $\mu$ l de plasma sensibilizado colocándose posteriormente en placas para BOVIGAM. En la fase II se realizó la prueba ELISA para detectar producción in-vitro de IFN $\gamma$  de acuerdo al procedimiento recomendado en el paquete Bovigam

(CSL, Australia). Brevemente: Se depositaron 50 µl de diluyente verde en cada pozo y se agregaron 50 µl de plasma. Se incubó a temperatura de laboratorio ( $22 \pm 5$  C) durante 1 hora. Una vez incubada la placa se lavó con solución buffer 1:20 y se le agregó 100 µl de conjugado diluido 1:100 en diluyente azul y se incubó a temperatura de laboratorio ( $22 \pm 5$  C) durante 1 hrs se lavo 6 veces en solución buffer de lavado, se agregaron 100 µl de sustrato y se incubó a temperatura de laboratorio durante 30 minutos. La reacción se detuvo con una solución de enzima de finalización, para terminar la reacción. Finalmente se procedió a la lectura de las placas en el lector ELISA a 450 nanómetros. Fueron incluidos en cada ensayo un control positivo y negativo. Un caso positivo fue aquel en que la densidad óptica (DO) del PPD-B menos el Nil fue  $\geq$  a 0.1 y; la DO del PPD-B menos la DO de PPD-A fue  $\geq$  0.1. Un caso negativo fue aquel en que la DO de PPD-B menos el Nil fue  $<$  a 0.1 o la DO de PPD-B menos la DO de PPD-A fue  $<$  a 0.1. Para ESAT6-CFP10, un caso positivo fue aquel en que la DO de ESAT6-CFP10 menos la DO del Nil fue  $\geq$  a 0.1.

### **Inspección post-mortem**

Diez y seis semanas después del reto IT se programo el envío al rastro de todos a los animales incluidos en el estudio y se realizó la necropsia en dos etapas. En la primera etapa se inspeccionó la cabeza con sus respectivos ganglios linfáticos (GL) en las instalaciones del rastro antes mencionado. En la segunda etapa se procedió a depositar pulmones y sus respectivos GL en bolsa de plástico con cierre en hieleras, las cuales se enviaron al laboratorio de patología del Instituto de

Investigaciones en Ciencias Veterinarias dentro de la primera hora para su inspección individual.

**Cuadro1.-Sistema semicuantitativo de clasificación de lesiones mediante la inspección post-mortem (Vordermeier et al., 2002).**

| Clasificación | Lesión en pulmón                                      | Lesión en Ganglio Linfático                                  |
|---------------|---|--|
| 0             | Lesiones no visibles                                  | No necrosis o lesiones visibles                              |
| 1             | Sin lesiones graves, pero lesiones aparentes en corte | Pequeños focos, 1-2 mm                                       |
| 2             | Menor a 5-10 mm                                       | Varios focos pequeños o aéreas necróticas al menos 5 de 5 mm |
| 3             | Mayor a 5-10 mm                                       | Necrosis extensiva   |
| 4             | Más de una lesión visibles mayor a 10 mm              |  |
| 5             | Coalescente lesión grave                              |  |

**Estudios histopatológicos**

En el estudio histopatológico los tejidos fueron procesados por el método de inclusión y corte de parafina, posteriormente teñidos con Hematoxilina – Eosina como tinción de rutina. Además, se utilizará el método de Ziehl Neelsen para detectar bacilos ácido alcohol resistentes.



## RESULTADOS

Este estudio inicio con 15 becerros divididos en tres grupos (5 no vacunados, 5 vacunados con Mb-BCG y 5 vacunados con  $\Delta$ mce-2). Durante los 8 meses del estudio experimental, 1 becerro del grupo  $\Delta$ mce2 murió. El cual no se tomó en cuenta.

**Cuadro2.- Resultados de la prueba tuberculina en 14 becerros a tres diferentes tiempos del estudio**

| GRUPO               | PPD-1 | PPD-2 | PPD-3 |
|---------------------|-------|-------|-------|
| 791-C               | -     | -     | -     |
| 800-C               | -     | -     | -     |
| 835-C               | -     | -     | +     |
| 1091-C              | -     | -     | +     |
| 1100-C              | -     | -     | +     |
| 46-BCG              | -     | +     | +     |
| 756-BCG             | -     | +     | +     |
| 874-BCG             | -     | -     | +     |
| 912-BCG             | -     | +     | +     |
| 976-BCG             | -     | +     | +     |
| 48- $\Delta$ mce2   | -     | -     | +     |
| 129- $\Delta$ mce2  | -     | +     | +     |
| 827- $\Delta$ mce2  | -     | +     | +     |
| 1114- $\Delta$ mce2 | -     | +     | +     |

\*Grupo C: Grupo control

\*Grupo BCG: Grupo vacunado con Mb-BCG

\*Grupo  $\Delta$ mce-2: Grupo vacunado con  $\Delta$ mce-2

\*PPD-1: Prueba tuberculina antes de la vacunación (Marzo)

\*PPD-2: Prueba tuberculina después de la vacunación (Junio)

\*PPD-3: Prueba tuberculina después del reto IT (Octubre)

El cuadro 2 muestra los resultados de la prueba tuberculina en 14 becerros a tres diferentes tiempos del estudio en el se puede observar que todos los becerros sujetos a este estudio fueron negativos a la prueba de tuberculina antes de la vacunación. Después de la vacunación los becerros del grupo control permanecieron como negativos ya que estos no fueron vacunados, 80% del grupo vacunado con Mb-BCG y 75% del grupo

vacunado con  $\Delta$ mce-2 resultaron positivos a esta prueba, mientras que después del reto IT el 100% del grupo Mb-BCG ,100% del grupo  $\Delta$ mce-2 y el 40% del grupo control resultaron positivos.

### **Inspección post-mortem**

En el proceso de inspección post-mortem ninguno de los 14 becerros mostró lesiones macroscópicas sugestivas a tuberculosis en pulmón, sin embargo en 12 se observaron cambios tales como neumonía, cambio de coloración, ligero engrosamiento y adherencias. En cuanto a ganglios linfáticos solo apareció la clasificación 1 en 4/5 del grupo control, 2/5 del grupo Mb-BCG y en 1/4 del grupo  $\Delta$ mce-2, observándose pequeñas lesiones de 1-2 mm. Adicionalmente se observó aumento de tamaño, engrosamiento del tejido, exudado purulento y lesiones hemorrágicas.

### **Estudio Histopatológico**

En el estudio Histopatológico de pulmón y ganglios linfáticos realizado a los 14 becerros en este estudio no se detecto ninguna lesión granulomatosa, sin embargo en ganglios linfáticos se observó hiperplasia linfoide en 3/5 del grupo control, 4/5 del grupo Mb-BCG, y en ninguno del grupo  $\Delta$ mce-2.

**Cuadro 3.-Resultados de la prueba Interferon gamma con la utilización de los antígenos PPD- Bovino y Antígeno de secreción temprana 6 Esat-6, CFP10.**

| <b>GRUPO</b>        | <b>PPD-<br/>BOVINO</b> | <b>ESAT-6, CFP-10</b> |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| 791-C               | +                      | -                     |
| 800-C               | +                      | -                     |
| 835-C               | +                      | +                     |
| 1091-C              | +                      | -                     |
| 1100-C              | +                      | +                     |
| 46-BCG              | +                      | -                     |
| 756-BCG             | +                      | -                     |
| 874-BCG             | +                      | -                     |
| 912-BCG             | +                      | +                     |
| 976-BCG             | +                      | +                     |
| 48- $\Delta$ mce2   | +                      | +                     |
| 129- $\Delta$ mce2  | +                      | +                     |
| 827- $\Delta$ mce2  | +                      | -                     |
| 1114- $\Delta$ mce2 | +                      | +                     |

El cuadro 3 muestra los resultados de la prueba diagnóstica de interferon gamma la cual se realizo en el último mes del estudio utilizando los antígenos PPD-Bovino y el coctel Antígeno de secreción temprana ESAT -6 y CFP-10 en el que se observa que todos los becerros fueron positivos a la prueba ~~IN~~ cuando se utilizó el antígeno PPD bovino, mientras que cuando se utilizo el coctel ESAT-6 CFP-10, 2/5 del grupo control, 2/5 del grupo Mb-BCG y 3/4 del grupo  $\Delta$ mce-2 resultaron positivos a la prueba.

**Cuadro 4.- Resultados de las pruebas aplicadas a los 14 becerros al final del experimento**

| GRUPO                  | PPD | NECROPSIA | HISTOPATOLOGIA | INF-gamma  |              |
|------------------------|-----|-----------|----------------|------------|--------------|
|                        |     |           |                | PPD BOVINO | ESAT-6,CFP10 |
| 791-C                  | -   | 1         | N              | +          | -            |
| 800-C                  | -   | 1         | H.L            | +          | -            |
| 835-C                  | +   | 1         | H.L            | +          | +            |
| 1091-C                 | +   | 1         | H.L            | +          | -            |
| 1100-C                 | +   | 0         | N              | +          | +            |
| 46-BCG                 | +   | 0         | N              | +          | -            |
| 756-BCG                | +   | 1         | H.L            | +          | -            |
| 874-BCG                | +   | 0         | H.L            | +          | -            |
| 912-BCG                | +   | 0         | H.L            | +          | +            |
| 976-BCG                | +   | 0         | H.L            | +          | +            |
| 48-<br>$\Delta$ mce2   | +   | 0         | N              | +          | +            |
| 129-<br>$\Delta$ mce2  | +   | 0         | N              | +          | +            |
| 827-<br>$\Delta$ mce2  | +   | 1         | N              | +          | -            |
| 1114-<br>$\Delta$ mce2 | +   | 0         | N              | +          | +            |

En el cuadro 4 se muestran los resultados integrados de todas las pruebas aplicadas a los 14 becerros al final del experimento.

## DISCUSION

El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia protectora de las vacunas Mb-BCG y  $\Delta$ mce-2 contra la tuberculosis en ganado bovino. Para evaluar lo anterior, se evaluaron el grado de severidad y la extensión de las lesiones en todos los animales de estudio. Los resultados mostraron que la cepa de reto produjo en el 80% (4/5) de los animales testigo lesiones con clasificación 1 en ganglios linfáticos, lo que significa que los animales no presentaron lesiones graves, pero si mostraron lesiones aparentes en el corte de 1-2 mm. Además, se observaron cambios en el tejido tales como exudado purulento, aumento de tamaño, engrosamiento del tejido y lesiones hemorrágicas. Resulta evidente resaltar que tanto en el grupo vacunado con Mb-BCG como el vacunado con  $\Delta$ mce-2 se presentó un solo caso en donde se observaron lesiones de 1-2mm aparentes en el corte, lo que pudiera sugerir que la eficacia protectora que proporcionaron estas vacunas fue similar. Sin embargo en la histopatología la característica principal fue la presencia de hiperplasia linfoide y la aparición de células muertas, quedando exento el grupo inmunizado con  $\Delta$ mce-2 de tal cambio; esto pudiera sugerir que los becerros que fueron inmunizados con la vacuna  $\Delta$ mce-2 tuvieron una mejor protección que los becerros vacunados con Mb-BCG a este nivel. Se ha observado en condiciones experimentales que al inocular bovinos con *M. bovis* las lesiones se encuentran desde los 30 días posteriores a la inoculación, presentándose nódulos firmes y al corte se pueden apreciar placas laminares concéntricas de color amarillento; en los cortes

histopatológicos se observan granulomas característicos, constituidos por un centro de necrosis caseosa, donde predominan los linfocitos, macrófagos, células epiteliales y células gigantes (Liebana et al., 2000).

El origen exacto de este tipo de lesión no está bien esclarecido, pero se menciona que las células T en infecciones con *M. bovis* son importantes en la respuesta inmune mediada por células que participan en la formación del granuloma, debido a que su presencia favorece el reclutamiento de monocitos que conforman un granuloma característico (Carding. 1998). En nuestro estudio, si bien es cierto que se detectaron pequeñas lesiones durante la inspección post-mortem en ganglios y pulmones, estas, no fueron compatibles con tuberculosis bovina. Por lo anterior, no fue posible concluir sobre la eficacia protectora de estas vacunas. Una posible explicación de que la cepa de reto AN5 solamente provoco pequeñas lesiones de 1-2mm en la necropsia y que a la histopatología no se observaran lesiones compatibles con micobacteriosis, pudiera ser que la dosis de reto no fue la suficiente para provocar lesiones granulomatosas, en el tiempo de estudio sin embargo los animales si fueron expuestos a la cepa de reto ya que los resultados de la prueba de tuberculina después del reto IT lo demuestran.

La vacuna Mb-BCG induce una respuesta positiva a la prueba tuberculina en más del 90% de los individuos vacunados (Haile et al.), en este estudio se observó que el 80% de los animales vacunados con Mb-BCG fueron reactivos positivos. Por otra parte, no estaba documentado el efecto de la vacunación en bovinos con  $\Delta$ mce-2 sobre la sensibilización a tuberculina, en este estudio comprobamos que este inmunógeno fue

capaz de sensibilizar los animales, provocando una reacción de hipersensibilidad tardía del tipo IV en el 75% de los animales.

Por último es necesario continuar con estudios adicionales donde se consideren dosis mayores para la realización del reto de la cepa virulenta AN5 o la utilización de otra cepa virulenta y un mayor tiempo de estudio que ayuden a demostrar el grado de protección que brinda esta vacuna.

## CONCLUSIONES

Debido a que este estudio experimental es el primero en utilizar al bovino como modelo animal para evaluar y comparar la eficacia protectora de la vacuna  $\Delta mce-2$ , fue muy lamentable que no fuera posible apreciar diferencias en cuanto al grado de severidad y la extensión de las lesiones sugestivas a tuberculosis, entre los dos diferentes inmunógenos (Mb-BCG,  $\Delta mce-2$ ) por lo tanto no fue posible concluir sobre el grado de protección y la efectividad que brinda la vacuna  $\Delta mce-2$  en comparación con la vacuna Mb-BCG. Como se mencionó anteriormente pudiera ser que la dosis utilizada para el reto no fuera la suficiente para que los becerros del grupo control desarrollaran lesiones granulomatosas en histopatología y hacer una comparación concreta entre ambas vacunas.

Un hallazgo importante el cual no estaba documentado con anterioridad es que la vacuna  $\Delta mce-2$  es capaz de sensibilizar al ganado bovino y desencadenar una respuesta positiva a la prueba de tuberculina.

Podemos observar adicionalmente en los resultados, que los animales del grupo vacunado con  $\Delta mce-2$  presentaron 15% menos lesiones que los del grupo vacunado con Mb-BCG, con lo cual podemos sugerir que  $\Delta mce-2$  puede disminuir la presencia de lesiones en becerros expuestos a *M. bovis*.



## REFERENCIAS

- Abalos R. and P. Retmal. 2004. Tuberculosis ¿una zoonosis re-emergente? Rev. Sci.tech. int. Epiz, (2), 583-594.
- Aguilar L.D., E, Infante, M.V. Bitaco, A. Cataldi, F. Bigi, R. Hernández Pando. 2006. Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-3 and mce-3 mutants in Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. Vaccine. 24: 2333-2342.
- Aranaz A.; Liebana E.; Gómez- Mampso E.; Galán J.C.; Cousins D.; Ortega, A.; Blazquez, J.; Baquero, F.; Mateos, A.; Suarez, G.; Domínguez, L. (1999). *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* .subsp. nov.; taxonomic study of a new member of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Sapin.Int.J. system. Bacteriol, 49:1263-1273.
- Ashford, D.; Whitney, E ; Raghunathan, P. ; Cosivi, O. ( 2001).Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals, Infecciones micobacteriales en animales domésticos y salvajes ( E.J.B. Manning y M.T. Collins, edit). Rev. sci. tech off. int. Epiz, 20(1); 325-337.
- Behr, M.A.(2002). BCG-different strain, different vaccine? The Lancet Infection Disease. 2:86-92
- Black, G.F.; Weier, R.E.; Floyd, S. (2002). BCG induced increase in interferon gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK. Two randomized controlled studies. Lancet. 359: 1393-1401.
- Buddle, B.M. G.W. de Leslie, A.Pfeffer and F.E. Aldwell. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG.Vaccine13:1123-1130.
- Buddle, B.M. Ryan, T.J.Pollock, J.M., Andersen, P. De Lisle, G.W. (2001).Use of ESAT-6 in the interferon- $\gamma$  test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. Veterinary Microbiology. 80: 37-46.
- Buddle, B. M. D. N. Wedlock, N. A. Parlane, L. A. Corner, G.W. de Lisle, and M. A. Skinner. 2003. Revaccination of Neonatal Calves with *Mycobacterium bovis* BCG Reduces the Level of Protection against Bovine Tuberculosis Induced by single Vaccination. Infection and Immunity. 71: 6411- 6419.
- Buddle, B.M. Denis, M. Aldwell, F.E. Vordermeier, H.M. Hewinson, R.G. Wedlock, D.N.(2008). Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG by a combination of systemic and oral routes, Tuberculosis. doi:10.1016 / j. tube . 2008 .01.005 (en prensa).

- 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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(5).
- Carding S. R. (1998). Role of gamma delta T cell in immunity to infectious diseases and the regulation development. *Immunol Res.* 17:13-22.
- Castañón, M. and Y. López. 2004. A second- generation anti TB vaccine is long overdue. *Animals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 3:10.
- Chen, J. M. D.C. Alexander, M. Behr, and J. Liu. 2003. *Mycobacterium bovis* BCG Exhibit Defects in Alanine and Serine Catabolism. *Infection and Immunity.* 71: 708-716. *infection and Immunity.* 71: 6411- 6419.
- Collins, H.C.: Garange, M.J. (1986). Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. *Royal Irish Academy.* 25: 25-35.
- Collins, C. (2000). The bovine tubercule bacillus. *Br. J. Biomed,* 57: 234-240.
- Cole S. T, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III†, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh§, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393.
- Cousins, D.V.; Corner, L.A.; Tolson, J.W.; Jones, S.L.; Wood P.R. (1998). Eradication or bovine tuberculosis from Australia, Key management and technical aspects. CLS Ltd, Victoria Australia, 45.
- Cousins, D.V.; (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. ( E.J.B.) Manning y MT. Collins, edit. *Rev, csi. Tech .Off Epiz,* 20(1):71-85.
- De Kantor, I.N.: Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmers in Latin America and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology.* 112:111-118.
- Duffield B.J. y Young D.A. (1985). Survival of *Mycobacterium bovis* indefinided environmental conditions. *Vet Microbiology.* 10: 193-197.

- Fine, P.E. (1991). Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*.346: 1339-1345.
- Flyn, J. Chan J. (2001). Tuberculosis latency and reactivation. *Infect.Immun*, 69:85-85.
- Gallagher, J. y Clifton- Hadley R.S. (2000). Tuberculosis in badgers; a review of the disease and its significance of other animals, *Res, Vet, Sci*. 69: 203-217.
- Gazquez A. (1991). Inflammaciones crónicas granulomatosas. *Patología clínica veterinaria*. 1ª edición. Interamericana –MacGraw-Hill, Madrid. 340-358.
- Gioffre, A., E. Infante, D. Aguilar, M. P. Santagelo, L. Klepp, A. Amadio, V. Meikle, I. Etchechoury, M. I. Romano, A.Cataldi, R. P. Hernández and F. Bigi. 2005. Mutation in mce operons attenuated *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes Infect* 7: 325-334.
- Gill, A. y Samartino, L. (2002). Zoonosis en los sistemas de producción animal y las aéreas urbanas y periurbanas de América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 16-22.
- Haile, Y., D. A., Caugant, G. Bjune, H. G., Wiker. 2002. *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 33, 125-132.
- Huitema, H. (1992).Tuberculosis in animal and man with attention to reciprocal transmission of mycobacterial infections mind the successful eradication of bovine tuberculosis un cattle in the Netherlands. Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV). La Haya, Países Bajos.pag 185.
- Jensen, R.: Mackey, D.R. (1979).Disease of Fleddolt Cattle. 4 Ed Lea and Febiger Philadelphia. USA. 132-135.
- Kato – Maeda, M. y Small, P. (2000). How molecular epidemiology has chanced what we know about tuberculosis. *West J. Med*. 172: 256-259.
- Kremer, L.Y Bersa, G.S. (2005) A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*, pp. 287-305. In Cole, S.T.; Eisenash. K.D.; McMurray, D.N.; Jacobs Jr, W.R.(Eds) *Tuberculosis and tubercule bacillus*, American Society for Microbiology, Washintong D.C.
- Kumar A. M. Bose, and V. Brahmachari.2003 Analysis of Expression Profile Mammalian Cell Entry (mce) Operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 71: 6083-6087.

- Liebana, E. Aranaz, A. Mateos, A. Villafranca, M. Gomez-Mampaso, E. Tercero, J.C. Alemany, J.Suarez, G. Domingo, M. Dominguez, L. (1995). Simple and rapid detection of *mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue sample by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 33-36.
- Liebana E. Aranaz, Aldwell, F. E, Nair, J, Niell, S.D, Smyth, A.J, et al., 2000. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release in active mycobacteria form infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunol*.99:23-29.
- López, G., T. Rentarúa, J. Williams, A. Navarro, A de la Mora., G. Medina .(2009). Evaluación en campo de la vacuna *Mycobacterium bovis* BCG contra la tuberculosis bovina. *Jornal homepage: www.elsevier.com/locate/rvsc.* (en prensa).
- Martin, C.(2005). The dream of a vaccine against tuberculosis: new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Res J*.26:162-167.
- Menzies, F.D. y Neill, S.F. (2000). Cattle-to cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J.*, 146: 407-408.
- Millan F., M. D. Salaman, C. Ramírez, J. B. Payeur, J. C. Rhyan, M. Santillán. 2000. Identification of tuberculosis en cattle slaughtered in México. *AJVR*. 61.
- Montali, R.J.; Mikota, D.K.; Chen, L.I. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. En *Infecciones micobacterianas en animales domésticos y salvajes* ( E.J.B. Manning y M.T. Collins, edit). *Rev.csi. tech. Off. Int. Epiz.* 20 (1): 291-303.
- Morris, R.S.: Pfeiffer, D.V.: Jackson, R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Veterinary Microbiology*. 40:153-177
- Morrison, W.I.; Bourne, F.J.; Cox, D.R.; Donnelly, C.A.; Gettinby, G.; McInterney, J.P.; Woodroffe, R.(2000). Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet.Rec.* 146:153-177.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-017-ZOO-2005). (2005). Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). *Diario Oficial de la Federación, México, D.F*
- OPS., OMS. (1992). Plan de Acción para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina en las Américas.; HPV/TUB/113/92.1-39.
- O'Reilly, L.M. y Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. *Tubercule Lung Dis*. 76:1-46.

- Orme I.M. 2001. The search for a new vaccines against tuberculosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 70.
- Ospina,S. (2001). La tuberculosis una perspectiva histórico - epidemiológica. *Infectio*. 5:241-250.
- Parker S.L., Y. Tsai, and C. J. Palmer. 1995. Comparison of PCR-Generated Fragments if the mce Gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* ,*M. intracellular* and *M. scrofulaceum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2: 770-775.
- Perez, A.M.; Ward, M.P.: Ritacco, V. (2002). Simulation-model evaluation of bovine tuberculosis-eradication strategies in Argentine dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 54:351-360.
- Quesada, D. G. y M. A. Guzmán. 2007. Vacunas en tuberculosis. *Archivos de alergia e inmunología clínica* 38 (4): 148-154
- Ritacco, V.; Torres.P.; Sequeira, M. D.; Reiner, A.; Kantor, I.N. (2006). Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean. En: C.H. Thoen
- Rook, G. Y Hernández-Pando, R. (1996). The patogenesis of tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol*. 50: 259-284.
- Senaratne, R. H., Ben Sidders, Patricia Sequeira, Grainne Saunders, Kathleen Dunphy,1 Olivera Marjanovic,1J. Rachel Reader, Patricia Lima,1 Stephen Chan,1 Sharon Kendall,3Johnjoe McFadden and Lee W. Riley. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted inmce3 and mce4 operons are attenuated in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 57: 164-170
- Skinner, M.A.; Kenn, D.L.; Parlane, N.A. Yates, G.F.;Buddle, B.M. (2002). Increased protection against bovine tuberculosis in the burshtail possum (*Trichosusus veulpecula*) when BCG is administrated with killed *Mycobacterium vccae*.82:15-22.
- Smith, R.; Drobniewski, F.; Gibson, A.; Montague, J.; Logan, M.; Hunt, D.; Hewionson, G.; Salomon, R.; O'Nelli,B.(2004). *Mycobacterium bovis* infection. United Kindom. *Emerg. Infect. Dis*.10: 539-541.
- Steele, J.H. (1995). Regional and Country Status Report. In: Thoen C.O.; J.H. Eds. *Mycobacterium bovis* infection in animals and Humans. Ames, Iowa State University Press .pp 162-172.
- Thomson, B. (2006). Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacteria tuberculosis* complex in formal-fixed tissue. En: C.O. Thoen Ed. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Oxford, U.K. Blackwell publishing, Ltd.pp 63-67.

- Thoen, C.O.; Himes, E.M. (1986). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*.2:198-214.
- Vordermeier, H.M.; Whelan, A.; Cocle, P.J. Farrat, L.; Palmer, N.; Hewinson, R.G. (2001). Use of synthetic peptides derived for the antigens ESAT-6 and CFP-10 of differentiation diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology*.8:571-578.
- Vordermeier, H. M. Chamber, M.A. Buddle, B.M. Pollock, J.M. Hewinson, R.G. (2006). Progress in the development of vaccines and diagnostic reagent to control tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal*. 171: 229-244.
- Wadell, R.D.; Lishimpi, K.; von Reyn, C.F. (2001). Bacteremia in *Mycobacterium tuberculosis* or *M. bovis*, Bacille Calmette Guerin (BCG) among HIV positive children and adults in Zambia. *AIDS*. 15:55-60.
- Wedlock D.N.; Skinner, A.; De Lisle, G. ; Buddle, B.M. (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human population. *Microbes infect*. 4: 471-480.
- Wedlock, D.N.; Denis, M.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Buddle, B.M. (2007). Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strain of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of INF $\gamma$  post-vaccination, but induce similar level of protection against bovine tuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.118:50-58.
- Whipple, D.L. y Palmer. M.V. (2000). Reemergence of tuberculosis in animals in the United States. In *Emerging disease of animals* (C. Brown y C. Bolin, edit). ASM Press, Washintong, D.C. pp. 281-299
- Wood, P.R., Rothel, J.S. (1994). In vitro immunodiagnostic assay for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 40 (1-2): 125-135.
- Wood, P.R.; Jones, S.L. (2001). BOVIGAM<sup>TM</sup>: an in vivo cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. 81: 147-155.
- Yong, D.; Dye, C. (2006). The development and impact of tuberculosis vaccine. *Cell*. 124:683-687.