



Universidad Autónoma de Querétaro



Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Análisis de la reactividad del interferón gamma (IFN- γ) a antígenos de *M.bovis* y *M. avium*, en cabras vacunadas con BCG-Phipps y desafiadas a una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*: Un enfoque comparativo

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

P R E S E N T A:

Roberto González Ramírez

Querétaro, Qro.,

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



Análisis de la reactividad del interferón gamma (IFN- γ) a antígenos de *M.bovis* y *M. avium*, en cabras vacunadas con BCG-Phipps y desafiadas a una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*: Un enfoque comparativo

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

P R E S E N T A

González Ramírez Roberto

Dirigida por:

Dra. Sara González Ruiz

SINODALES

Dra. Sara González Ruiz
Presidente

Dr. Feliciano Milián Suazo
Secretario

Dra. Isabel Bárcenas Reyes
Vocal

Dra. Susana Lucia Sosa Gallegos
Suplente

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro
29 de octubre de 2024, México

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infectocontagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*) presente en todo el mundo. La detección de la infección se realiza a través de la prueba intradérmica usando derivado proteico purificado (PPD), PPD-*bovis* en la prueba ano-caudal; y PPD-*bovis* más PPD-*avium*, en la prueba doble comparativa para descartar la presencia de micobacterias ambientales. La vacunación con BCG es ampliamente utilizada en humanos, actualmente no se utiliza en animales, y solo ha sido probada de forma experimental. En México, el control y la erradicación de esta enfermedad se rige por la NOM-031-ZOO-1995, que establece la estrategia de prueba y sacrificio para eliminar la enfermedad, donde por ahora la vacunación aún no es una alternativa. El objetivo de este trabajo fue descartar la presencia de micobacterias ambientales a través de la detección de IFN- γ liberado por células T en respuesta al estímulo con PPD-*bovis* y PPD-*avium*. Se selecciono un grupo de caprinos libres de tuberculosis mediante el kit de diagnóstico ID Screen®. Estos animales fueron divididos al azar en cinco grupos de siete animales cada uno, cuatro grupos vacunados con BCG, y un grupo sin vacunar usado como control. Se tomaron muestras de sangre cada dos a tres semanas por un periodo de 7 meses, esta sangre fue estimulada con los antígenos PPD-*bovis* y PPD-*avium* para medir la concentración de IFN- γ con el kitt Bovigam®; Prionics AG, USA. Los resultados mostraron que el promedio general de respuesta después del desafío de todos los grupos vacunados fue significativamente superior cuando el estímulo se hizo con PPD-*bovis* que cuando se hizo con PPD-*avium*, por lo que se concluye que las micobacterias ambientales no tienen influencia sobre la respuesta a la vacunación en este experimento.

Palabras claves: Tuberculosis bovina, vacunación, cabras, IFN- γ

SUMMARY

Bovine tuberculosis (TBb) is an infectious disease of cattle caused by *Mycobacterium bovis* (*Movies*) and represents a significant problem in many parts of the world. Detection of the infection is performed through intradermal testing using purified protein derivative (PPD), PPD-*bovis* in the ano-caudal test; and PPD-*bovis* plus PPD-*avium*, in the double comparative test to rule out the presence of environmental mycobacteria. BCG vaccination is widely used in humans; to date it is not used in animals and has only been tested experimentally. Mexico, has a national program for the control and eradication of tuberculosis (NOM-ZOO-1995), this program is based on tuberculin testing and culling of reactor, where vaccination is not et an alternative. The aim of this study was to rule out the presence of environmental mycobacteria through the detection of IFN- γ released by T cells in response to the stimulus with PPD-*bovis* and PPD-*avium*. A group of tuberculosis-free goats was selected using the ID Screen® diagnostic kit. These animals were randomly divided into five groups of seven animals each, four groups vaccinated with BCG, and one unvaccinated group used as a control. Blood samples were taken every two to three weeks for a period of 7 months, this blood was stimulated with PPD-*bovis* and PPD-*avium* antigens to measure IFN- γ concentration with the Bovigam® kitt; Prionics AG, USA. The results showed that the overall average response after challenge of all vaccinated groups was significantly higher when stimulation was done with PPD-*bovis* than when stimulation was done with PPD-*avium*, thus concluding that environmental mycobacteria have no influence on the response to vaccination in this experiment.

Keywords: Bovine tuberculosis, vaccination, goats, IFN- γ .

DEDICATORIAS

A mi mamá, por siempre apoyarme en cada etapa de mi vida, animarme a siempre creer en mí y mis decisiones, gracias por enseñarme que en la vida siempre se esta rodeado de ese amor, apoyo y cariño incondicional.

A mi papá por siempre confiar en mi y estar presente cuando la vida se pone un poco dura, por brindarme esta nueva oportunidad en mi vida, de que el trabajo dignifica el alma y que si uno se esmera y se esfuerza; las recompensas siempre seran maravillosas, esto es para y por ti.

A mis hermanos Marcos y Lupita, por hasta cierto punto ser, un modelo “no tan perfecto” de hermano mayor. Los amo con el corazon entero y y quiero dejar claro que ustedes son mis modelos de como ser una mejor persona. Deseo que siempre sientan la felicidad que yo siento en este momento tras lograr esta meta y cumplir este sueño.

A Rafael por acompañarme durante el previo y durante este proceso de carrera y tesis (espero quieras seguir acompañandome), por siempre sacar lo mejor de mi cuando yo no podia y lo logrababa. Cada madrugar, kilómetros de distancia, meses de trabajo y en mucho más estuviste presente. Tu tambien eres parte de este logro y mi amor te lo agradecerá siempre.

A Anifer, Oscar, Cris e Isael por formar parte de esta increíble historia durante la licenciatura, apoyarnos en estos 5 años y los que nos faltan, por permitirme entrar y permanecer en sus vidas con cada risa, palabra de aliento, consejo, regaño y hasta mentadas. Ustedes siempre van a formar parte de mi vida y espero seguir en las suyas con cada experiencia que formemos. Los amo.

Y a cada uno de los docentes que ayudaron en mi formación en estos 5 años, gracias infinitas a ustedes por ayudarme a que este sueño se haya cumplido.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Sara González Ruiz por ser mi directora de tesis, brindarme esta oportunidad y ayudarme durante todo este proceso, apoyándome y dándome ánimos de seguir siempre adelante.

A la Doctora Isabel Bárcenas Reyes, por ser parte de mi comité compartiendo siempre su conocimiento y asesorándome de manera objetiva; al igual de estar siempre pendiente en todo este camino.

Al Doctor Feliciano Milián Suazo, a la Doctora Susana Lucía Sosa Gallegos y al Doctor Héctor Raymundo Vera Ávila por formar parte de mi comité compartiendo siempre su conocimiento y asesorándome de manera objetiva, en verdad muchas gracias.

Al Doctor José Guadalupe Gómez Soto y Al Doctor Konisgmar Escobar García por ser unos pilares importantes durante mi formación académica y personal durante mi estancia en la licenciatura.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Historia de la tuberculosis

3.2 Panorama general de la Tuberculosis bovina (TBb)

3.3 Epidemiología de la enfermedad

3.4 Diagnóstico de la TBb

3.4.1 Prueba de la tuberculina

3.4.2. Ensayo de Interferón gamma (IFN- γ)

3.5 Inmunología de la TBb

3.6 Vacunación contra TBb

3.6.1 Modelo bovinos

3.6.2 Modelo caprino

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

4.2 Objetivos Específicos

V. HIPÓTESIS

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII. CONCLUSIÓN

IX. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Descripción	Página
Cuadro 1.	Grupos experimentales para determinar la eficacia de la vacuna BCG en diferentes protocolos de vacunación en un modelo caprino.	20 - 21
Cuadro 2.	Media, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la concentración de IFN- γ para todos los grupos experimentales de cabras vacunadas contra la tuberculosis bovina y desafiadas con una cepa de campo de <i>M.bovis</i> con el antígeno PPD- <i>bovis</i> para cada semana de muestreo.	25 - 26
Cuadro 3.	Media, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la concentración de IFN- γ para todos los grupos experimentales de cabras vacunadas contra TBb y desafiadas con una cepa de campo de <i>M.bovis</i> con PPD- <i>avium</i> como antígeno para cada semana de muestreo.	28 – 30

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Descripción	Página
Figura 1.	Ganglios linfáticos retrofaríngeos con lesiones visibles de TBb (A). Colonia's de <i>Movies</i> end meidos Stone brink (B).	7
Figure 2.	Vías de transmisión intra y entre especies de <i>Mycobacterium bovis</i> .	8
Figura 3.	. Corrales seleccionados de manera aleatoria en 5 grupos de 7 animales cada uno, colocados estratégicamente para fines del experimento, con suficiente espacio y sombra, considerando el bienestar animal, con agua y comida <i>ad libitum</i> .	19
Figura 4.	Inoculación vía subcutánea en el lado derecho de la tabla del cuello de los animales en los grupos con vacunación con una dosis de 1×10^3 UFC.	20
Figura 5.	Concentración IFN- γ en sangre de cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de <i>M.bovis</i> . El PPD usado en la estimulación de sangre completa <i>in vitro</i> fue <i>M.bovis</i> . Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450 nm).	26
Figura 6.	Concentración (IFN- γ en sangre de cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de <i>M.bovis</i> , de los 5 grupos. El PPD usado en la estimulación de sangre completa <i>in vitro</i> fue <i>M. avium</i> . Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450 nm).	29
Figura 7.	Respuesta antígeno-específica de IFN- γ en cabras después de la vacunación, el refuerzo y el desafío con una cepa de campo de <i>Mycobacterium bovis</i> . Se utilizaron los PPD <i>bovis</i> y <i>avium</i> para la estimulación de sangre. completa <i>in vitro</i> . Los valores de respuesta de IFN- γ están expresados en densidades ópticas (DO 450_nm).	30

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial, de curso crónico y progresivo que afecta al ganado bovino, provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M.bovis*). Esta enfermedad puede afectar prácticamente todos los mamíferos, incluidos el humano (zoonosis). En general provoca un deterioro en el estado de salud, muy a menudo tos y, a la larga, la muerte, por lo que se considera de vital importancia para la salud pública debido al consumo de productos lácteos sin pasteurizar (Pérez-Guerrero *et al.*, 2008).

Para el diagnóstico de la TBb se utiliza la prueba intradérmica usando el derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPD *bovis*), en la prueba anocaudal simple o bien PPD-*bovis* y PPD-*avium*, en la prueba doble comparativa como antígenos. La prueba de la tuberculina ha sido una herramienta indispensable para la identificación de ganado bovino infectado con *M.bovis*; sin embargo, debido a la baja sensibilidad, y a la posibilidad de la interferencia de micobacterias ambientales, tales como *M. avium*, *M. paratuberculosis* o micobacterias atípicas, se pueden presentar animales falsos positivos (OIE, 2009).

En general, un animal infectado con *M.bovis* tiene en la sangre linfocitos que reconocen antígenos propios en el PPD, como resultado inducen la respuesta de INF- γ que puede ser detectado por un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) empleando anticuerpos monoclonales. Para este ensayo se pueden utilizar diferentes tipos de antígenos, uno de los más comunes, es el antígeno de *M. avium* para descartar la participación de las micobacterias ambientales en la respuesta inmune de la vacunación. Y en este caso, lo que se busca es determinar si la participación previa de este tipo de bacterias en los animales pudiera enmascarar la respuesta de los individuos a la vacuna (Diaz *et al.*, 2003).

El diagnóstico de la tuberculosis mediante ensayo *in vitro* de interferón gamma (BOVIGAM) se aplica en paralelo con la prueba caudal con el objetivo de incrementar la sensibilidad y maximizar la detección de animales infectados. La prueba BOVIGAM tiene como fundamento la respuesta inmunitaria de base celular

mediada por linfocitos T, que es la más importante en casos de tuberculosis, y la que se establece con mayor intensidad en las primeras fases de la enfermedad. Además, existe producción de anticuerpos específicos, aunque en condiciones normales es menos relevante y comienza a adquirir mayor intensidad en fases avanzadas de infección, a medida que la respuesta celular va decayendo (Bezoz *et al.*, 2013).

En México, el control de la tuberculosis se basa en la estrategia de prueba y sacrificio. Esta estrategia ha sido exitosa en ganadería para producción de carne, pero con poco éxito en ganadería para producción de leche. Esto debido al costo que implica implementar la estrategia, además del costo por el sacrificio de animales de este tipo y a la pobre confiabilidad en las pruebas de diagnóstico. No obstante, por razones de salud pública y económica, la erradicación de la TBb en México es la de mayor relevancia (NOM-031-ZOO-1995).

El inventario ganadero nacional es de casi 30 millones de cabezas, 91% se dedica a la producción de carne y doble propósito, y aproximadamente el 9% restante (2,700,000 cabezas), a la producción de leche; población que actualmente está en riesgo de enfermar por TB, y que a su vez representa un riesgo para la salud pública. Esta es principalmente la población blanco de una estrategia de vacunación (SIAP, 2021).

La BCG se ha utilizado en humanos por casi 100 años, y se ha probado experimentalmente para su uso potencial en diferentes especies animales. Se ha determinado que dosis bajas tienen una mayor eficacia que dosis altas (Buddle *et al.*, 1995). La cepa *M.bovis* BCG Pasteur 11732P2 a dosis de 10^6 ha sido la más utilizada en becerros de 4-6 meses de edad y desafiados intra-nasalmente con cepas virulentas a dosis de 10^3 (Buddle *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2006; Wedlock *et al.*, 2007). Se ha reportado una eficacia mayor al 60% en promedio con base a la cantidad y el tamaño de las lesiones granulomatosas, así como por el número de bacilos viables dentro de las mismas (Vordermeier *et al.*, 2002). Se ha reportado además mejor efecto si se vacuna animales al nacimiento o en becerros menores

de 4 meses (Hope *et al.*, 2005). Y que el uso de refuerzos con subunidades de proteínas del filtrado de cultivo (CFP) mejora la protección (De Lisle *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2007). La vacunación con BCG y/o CFP no induce respuesta de IFN-*gamma* a los antígenos de bajo peso molecular CFP10 y ESAT6, por lo que el diagnóstico diferencial es también viable (Vordermeier *et al.*, 2001; Denis *et al.*, 2007; Sopp *et al.*, 2008). En un experimento se utilizó la cepa vacunal Phipps, cepa poco utilizada pero que tiene un genoma con menos deleciones que otras cepas vacunales como la Pasteur o la Danesa. En otro estudio, se encontró que un protocolo de vacunación con refuerzo, pre-inmunizando con la BCG y luego reforzando con filtrado de cultivo, más un adyuvante, tuvo una eficacia de alrededor del 70% en la reducción del número de lesiones, el tamaño de las lesiones y el número de bacilos por lesión de animales vacunados, comparado con los no vacunados (Canto *et al.*, 2013). Se demostró además que la vacuna tiene la misma eficacia en vaquillas gestantes, y que es totalmente inocua en esta etapa reproductiva (Milian-Suazo *et al.*, 2011).

Una de las inquietudes de los trabajos experimentales en campo, es que las micobacterias ambientales interfieran con la respuesta inmune a la vacunación, reduciendo su efecto y, por lo tanto, reduciendo su eficacia. Por lo tanto, la presente investigación pretende comparar, a través del ensayo *in vitro* de interferón gamma (Bovigam) la respuesta de los animales vacunados a los antígenos *M.bovis*, el antígeno vacunal, y *M. avium*, el antígeno de micobacterias ambientales en caprinos vacunados con la cepa BCG-Phipps y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

II. JUSTIFICACIÓN

La vacunación del ganado contra la tuberculosis bovina podría reducir la prevalencia, la incidencia y la propagación de la enfermedad en la población bovina, reduciendo el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal y la carga bacteriana por lesión (Canto *et al.*, 2013). La capacidad de proporcionar estos beneficios en mucho depende de la estrategia de vacunación. Se ha demostrado que la BCG es la mejor vacuna de la que se puede hacer uso en la actualidad, y que fue utilizada en el ganado por primera vez en 1911 (Waters *et al.*, 2012). En las últimas dos décadas se han realizado diversos estudios que han demostrado que la primo vacunación con la BCG, más la aplicación de un refuerzo con CFP un mes después, y la adición de algún adyuvante, es eficaz para reducir la diseminación de la tuberculosis en el ganado (Waters *et al.*, 2012; Buddle *et al.*, 2013; Cantó *et al.*, 2013; Parlane & Buddle, 2015; Vordermeier *et al.*, 2016; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018; Contreras *et al.*, 2021). Sin embargo, existe inquietud de que los animales vacunados pudieran haber estado expuestos previamente a bacterias ambientales y que esto afecte la eficacia de la vacuna. Por esto, es importante determinar la concentración de respuesta a los antígenos *M.bovis* y *M. avium* en animales vacunados y no vacunados para descartar esta posibilidad.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas de la historia de la humanidad, encontrando hallazgos en momias egipcias del año 3000 a.C., donde médicos antiguos la describían como una enfermedad de consunción con hemoptisis (Farga, 2004; Lugones *et al.*, 2007). A finales del siglo XVIII se desarrolla con el nombre de “La Gran Peste”, afectó al 25% de la población en Europa y ha ocasionado gran número de muertes a lo largo de la historia de la humanidad (Ledermann, 2003). La tuberculosis era llamada “*phthisis*” en la antigua Grecia, “*tabes*” en la antigua Roma y “*schachepheth*” en el hebreo antiguo. En los años 1700, la Tuberculosis era llamada “la plaga blanca” debido a la palidez de los pacientes. La tuberculosis en los seres humanos se puede rastrear hasta hace 9000 años en Atlit Yam, una ciudad que ahora se encuentra bajo las aguas del mar Mediterráneo, frente a la costa de Israel. Arqueólogos han encontrado tuberculosis en los restos de una madre e hijo enterrados allí. Las primeras menciones escritas de la tuberculosis fueron en la India 3300 años atrás y en la China hace 2300 años (Ledermann, 2003).

Robert Koch fue quien descubrió al bacilo tuberculoso el 24 de marzo de 1882 en el instituto de fisiología de la Universidad de Berlín, en su escrito “sobre la etiología de la Tuberculosis”, demuestra la existencia del *Mycobacterium tuberculosis* como agente causal de la tuberculosis en sus diferentes formas, así como la vía de transmisión, ya que planteaba que “si se inocula a un cobayo sano un cultivo de bacilos, la herida cierra y parece curarse en los primeros días; alrededor de 10 a 15 días después se produce un nódulo duro que se abre pronto y que da lugar a una ulceración que dura hasta la muerte del animal” (Ospina, 2001; Lugones *et al.*, 2007).

3.2 Panorama general de la Tuberculosis bovina (TBb)

La tuberculosis bovina (TBb) es una zoonosis causada por *Mycobacterium bovis*, es un bacilo Gram-positivo, ligeramente curvado y delgado (0.3-1 x 2.4 µm) que no forma esporas y no presenta flagelos; es decir, son inmóviles, no presentan cápsula, son microaerófilos y altamente susceptibles a la luz solar (Karlson & Lessel; Cantó & Olvera, 2013), siendo su incidencia en la salud pública uno de los problemas que afectan directamente la economía de algunos de los países donde se registra. Esto significa que la incidencia de la enfermedad en bovinos se refleja en el aumento de la frecuencia de casos de zoonosis (Hermoso, 1992; Sáez-Llorente, 2010; Romero, 2012), llegando la ocurrencia de la enfermedad entre trabajadores del área de la producción animal a ser relevante en algunos países (Leal Bohorquez *et al.*, 2017). Se calcula que en ciertos países existe hasta un 10% de tuberculosis zoonótica dependiendo la población de estudio y se estima que cerca de 10 millones de personas se ven afectadas por la tuberculosis en el mundo cada año (OIE, 2009; Müller *et al.*, 2013; Olea-Popelka *et al.*, 2017; Perea-Razo *et al.*, 2017).

Mycobacterium bovis es causante de pérdidas económicas importantes en la ganadería mundial, estimadas en más de 3000 millones de pesos anualmente, por las pérdidas que produce ya sea de carne o leche, además de los decomisos en rastro (Garnier, 2003). La tuberculosis bovina se caracteriza por producir granulomas (Figura 1) principalmente en pulmones y nódulos linfáticos de varias especies animales y en el hombre (Acosta-Salinas *et al.*, 2009).

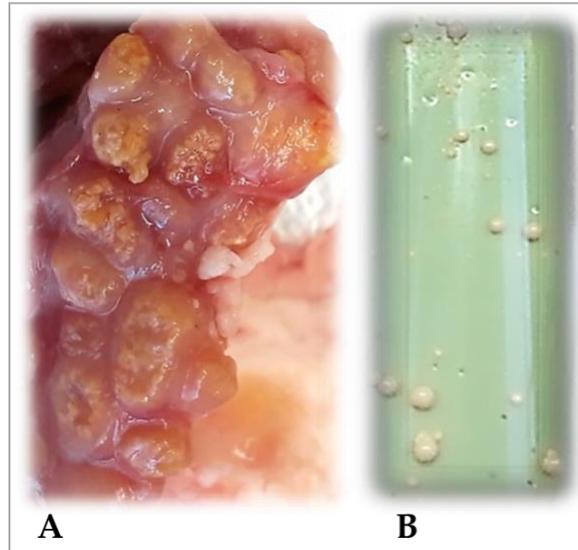


Figura 1. Ganglios linfáticos retrofaríngeos con lesiones visibles de TBb (A). Colonias de *M.bovis* en medios Stonebrink (B) (González-Ruiz., 2019).

Dado que la infección por *M.bovis* es de curso crónico, puede tardar meses o incluso años hasta que el animal desarrolle la enfermedad, y los signos clínicos no son necesariamente específicos, los cuales incluyen: debilidad, anorexia, disnea, inflamación de ganglios linfáticos, tos, fiebre, puede haber pérdidas por abortos, así como disminución en la producción láctea (Cardenal *et al.*, 1992). Las vías de transmisión de la tuberculosis bovina son variadas, la principal es respiratoria por inhalación de aerosoles contaminados, ingestión o por heridas en la piel (Figura 2). Se considera que, al momento del sacrificio del animal, y dependiendo de la ubicación de las lesiones, se deduce la vía de infección con *M.bovis* (Garnier *et al.*, 2003). A nivel de campo la mayoría de las lesiones se observan en el tracto respiratorio, principalmente en linfonodos; el 90% de los casos ocurren por vía respiratoria (Rivera *et al.*, 2010; Milián *et al.*, 2013).

Las principales vías de secreción de *M.bovis* en el ganado bovino son las respiratorias, las heces, la leche, en orina y en algunas ocasiones en secreciones vaginales o el semen. (Zendejas *et al.*, 2007).

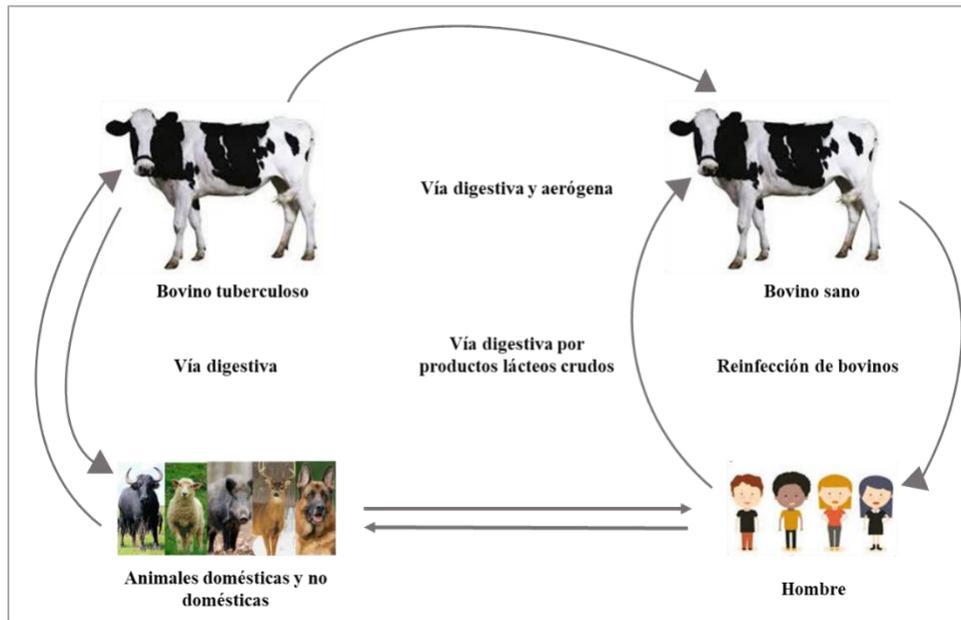


Figura 2. Vías de transmisión intra y entre especies de *Mycobacterium bovis* (González-Ruiz., 2019).

3.3 Epidemiología de la enfermedad

La tuberculosis se encuentra presente en todo el mundo, su mayor índice de prevalencia se encuentra en África, ciertas partes de Asia y América. En países desarrollados la enfermedad ha disminuido significativamente en ganado bovino, sin embargo, se considera que la fauna silvestre es un importante reservorio de la enfermedad ya descrita en animales domésticos y salvajes (Loor, 2020).

La TBb es una de las enfermedades que figuran en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como enfermedad de notificación obligatoria a la OIE (conforme al Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE). En México, la tuberculosis bovina es una enfermedad que se atiende con la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, que se sustenta en la norma NOM-031-ZOO-1995 (PRONABIVE, 2018). A nivel mundial, en 2019, se estimaron que 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis, con un estimado de 1.4 millones de muertes por esta infección y en

América se estimaron 289.000 casos de tuberculosis. La mortalidad estimada para la región fue 22.900 (OPS, 2021).

La vacunación es un componente importante para el control de diferentes enfermedades de origen infeccioso, por lo que la TBb no debería estar exenta de esta estrategia. La única vacuna aceptada para el control de la enfermedad en humanos es la BCG a partir de una cepa de *M.bovis*, proveniente de un caso de mastitis bovina en el año de 1908. La BCG se ha aplicado en humanos desde 1921, lo que la convierte en la vacuna del campo de la salud humana más utilizada a nivel mundial. Se han desarrollado vacunas a nivel experimental con dosis consideradas medias y altas de BCG, sin embargo, la vacunación con BCG puede interferir con los métodos de diagnósticos convencionales (pruebas intradérmicas de tuberculina) por lo cual no puede ser utilizada en bovinos (Cruz-Fierro *et al.*, 2020).

3.4 Diagnóstico de la TBb

La tuberculosis bovina suele diagnosticarse en el animal vivo valorando las reacciones de hipersensibilidad retardada tipo IV (tuberculización), dicha prueba autorizada por la Secretaría debe aplicarse a los bovinos por Médicos Oficiales y/o Médicos Veterinarios Aprobados, y se debe realizar a los bovinos a partir de los dos meses de edad (NOM-031-ZOO-1995).

La infección suele ser subclínica y tras la muerte, la infección se diagnostica mediante necropsia y técnicas histopatológicas y bacteriológicas. El desarrollo de nuevas herramientas en la biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ha apoyado el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos y confiables para enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento (Díaz *et al.*, 2003; Morales *et al.*, 2005; García, 2013). Cuando los bacilos logran penetrar en los alveolos, estos son fagocitados por los macrófagos, que en conjunto con sus fagosomas son el lugar de eliminación y replicación de los bacilos causantes de tuberculosis. Para activar la respuesta inmune mediada por células, lo que pudiera resultar en un método de diagnóstico

detectando IFN- γ en respuesta a un antígeno específico, es decir si un animal está infectado con *M.bovis*, tiene en la sangre linfocitos que reconocen antígenos micobacterianos presentes en el PPD, induciendo la secreción de IFN- γ para que pueda ser detectado por un ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos monoclonales (Rothel *et al.*, 1990; Hui-Qi Qu *et al.*, 2011).

3.4.1 Prueba de la tuberculina

Esta prueba constituye el método de referencia en la Campaña Nacional para la Tuberculosis Bovina y consiste en medir el espesor de la piel, inyectando tuberculina bovina por vía intradérmica en la zona medida y midiendo toda posible hinchazón posterior en el punto de inyección 72 horas después. La prueba comparativa de la tuberculina intradérmica con tuberculina bovina y aviar se utiliza principalmente para diferenciar entre animales infectados con *M.bovis* y animales sensibilizados a la tuberculina debido a una exposición a otras micobacterias o géneros relacionados. La decisión relativa de utilizar la prueba simple o la comparativa en general se basa en la prevalencia de la infección por tuberculosis y en el nivel de exposición ambiental a otros microorganismos que causen sensibilización. La tuberculina es elaborada a partir de *Mycobacterium bovis* cepa AN5. La PPD aviar se elabora a partir de *Mycobacterium avium* cepa D4. La prueba comparativa consiste en la aplicación intradérmica de los derivados proteicos puros, PPD bovino y PPD aviar, en animales a partir de los dos meses de edad; posterior a 72 horas de inoculación se obtienen los resultados, si se observa rubor, calor, dolor, necrosis o cualquier cambio mínimo en el sitio de aplicación, será indicativo de positivo (García, 2013).

La dosis recomendada de PPD *bovis* en ganado bovino es de al menos 2.000 Unidades Internacionales (UI) y en la prueba comparativa de la tuberculina, las dosis no deben ser inferiores a las 2.000 UI cada vez. Las reacciones se interpretan con base al método analítico utilizado (OIE, 2018). La prueba de tuberculina consta de: 1) Prueba en el pliegue caudal (para los hatos en que se desconoce la situación zoonosanitaria de TBb), 2) Prueba cervical comparativa (para confirmar y descartar animales reactivos a la prueba de pliegue caudal) y, 3) Prueba cervical simple (para

probar hatos en los que se conoce la existencia de *M.bovis*) (SENASICA, 20015). Sin embargo, la tuberculina no proporciona resultados confiables epidemiológicamente ya que tienen una sensibilidad que va del 40 al 70%, y una especificidad que va del 78 al 96%. Esto determina una alta proporción de falsos negativos y falsos positivos, por lo que muchos animales son erróneamente enviados a rastro, lo que reduce la confianza de los productores hacia los programas oficiales. Además de un costo extra para el productor por enviar animales falsos negativos a rastro (Milián *et al.*, 2010).

3.4.2 Prueba de Interferón gamma IFN- γ (BOVIGAM)

Es un ensayo mediante el cual es posible verificar la existencia de una respuesta inmune mediada por células desarrollada por el cuerpo del animal en respuesta a la infección por micobacterias. Se detecta el IFN- γ producido por los linfocitos T del animal infectado, utilizando anti-IFN- γ monoclonal. La falta de detección de IFN- γ caracteriza la negatividad del animal a la infección por *M.bovis*, ya que los linfocitos de ganado no infectado no producen esta citocina de formas específicas. Como se trata de una prueba in vitro que tiene la ventaja de no interferir con el estado inmunológico del animal y puede repetirse en el mismo animal, es necesario respetar el período de desensibilización. Este ensayo mostró el aumento en la sensibilidad y la posibilidad de una prueba repetida más rápida, sin necesidad de una segunda visita al lugar (Ramos *et al.*, 2015).

La aplicación estratégica del ensayo de IFN- γ , como complemento de la prueba de la tuberculina, puede facilitar la eliminación temprana de los animales infectados en rebaños problemáticos que, por lo demás, son negativos a la prueba de la tuberculina. El reconocimiento de que el objetivo del ensayo es identificar animales de alto riesgo que son potencialmente infecciosos para otros bovinos puede generar confianza en los propietarios de rebaños de que se pueden tomar decisiones racionales basadas en principios científicos sólidos y que se pueden

diseñar esquemas efectivos para hacer más progreso rápido en la eliminación de la infección de los rebaños afectados (Machado *et al.*, 2015)

3.5 Inmunología de la TBb

El reconocimiento de las estructuras moleculares que se encuentran en los patógenos son una de las principales características de la respuesta inmune innata, los cuales inducen la muerte de los microorganismos y la activación de una respuesta adaptativa mediante el reclutamiento de linfocitos T en el sitio de lesión, además de la activación de células dendríticas y producción de citoquinas y quimiocinas (Álvarez *et al.*, 2017).

El mecanismo de defensa innato va a mantener la homeostasis pulmonar y eliminar las bacterias presentes mediante la activación de macrófagos alveolares, neutrófilos, células epiteliales, proteínas del complemento, células alveolares tipo I y tipo II (Álvarez *et al.*, 2017). Las principales fuentes de activación de la citocina IFN- γ para el control de enfermedades bacterianas intracelulares como *M.bovis* son las células NK (Natural Killer, por sus siglas en inglés) y los linfocitos T (Owen, 2014).

Ha sido observado en estudios, donde bovinos que han sido previamente infectados con *M bovis*, se determinó que la producción de IFN- γ es mediada principalmente por Linfocitos T CD4+ de memoria y en menor medida los linfocitos T CD8+. Esta acción es producida por Las citocinas proinflamatorias IL-12, IL-18, IL-23 producidas por los macrófagos y que inducen la activación de los linfocitos T, estimulando así la síntesis de IFN- γ , el cual a su vez activa a los macrófagos para producir TNF- α . Estos macrófagos van a delimitar el crecimiento de bacterias como mecanismo inmune de resistencia y en tenor de esto, podemos observar como un número considerable de animales resisten la infección, mientras muchos otros desarrollan la enfermedad. En este caso, el crecimiento intracelular de *M.bovis* dependerá de la virulencia bacteria (Sánchez, *et al.*, 2018).

3.6 Vacunación contra TBb

La vacunación para tuberculosis BCG (Bacilo Calmette Guérin) ha sido utilizada desde 1921 en humanos, fue desarrollada por el médico Albert Calmette y el veterinario Camile Guérin entre los años 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur de Lille mediante el aislamiento y cultivo de una cepa virulenta de una vaca con mastitis tuberculosa y no fue hasta 1921 obtuvieron un bacilo atenuado que no causaba la enfermedad al ser administrados por diferentes vías. Diversos estudios han demostrado que induce una respuesta de protección en el ganado a la exposición de *M.bovis* gracias a que ha sido estudiada desde inicios del siglo pasado en ganado bovino (Vordermeier *et al.*, 2016). Estudios demuestran que exponer al animal por rutas de desafío intra-traqueales o aerosoles han tenido resultados positivos en la respuesta de la BCG y han reafirmado la protección que confiere esta vacunación. Pero muy pocos estudios se acercan a un panorama real sobre la transmisión horizontal y evaluar la eficacia de la vacunación ante esta situación (Ameni *et al.*, 2020).

Debido a que se ha asociado una pérdida de la eficacia ante la vacunación, es recomendable vacunar a becerros en los primeros días de vida para evitar una infección previa a la vacunación. Estudios demuestran que la vacuna puede reducir de manera significativa las lesiones y el número de animales positivos dentro de un periodo de 10 a 23 meses post-vacunación (Ameni *et al.*, 2020).

El principal problema de vacunación con BCG en ganado bovino es la interferencia con la prueba de tuberculina autorizada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural regida por la NOM-031-ZOO-1995 NORMA OFICIAL MEXICANA, CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA, por lo que el control de la Tuberculosis se basa en la estrategia prueba-sacrificio, siendo un método costoso y poco viable para el ganadero (NOM-031-ZOO-1995). Esta interferencia puede presentarse de 6 meses hasta 2 años post vacunación (EFSA, 2013).

La proteína ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6 kD, por sus siglas en inglés) de *M.bovis* es un componente del CFP que al ser caracterizado genéticamente induce una respuesta inmunogénica de tipo TH1. Este antígeno al ser secretado durante la fase inicial es reconocido fuertemente por animales que son expuestos a infecciones por *M.bovis* por lo que la inclusión de CFP como refuerzo ha sido estudiada más a fondo (Calderón *et al.*, 2006).

3.7.1 Modelo bovino

La vacunación en bovinos podría significar una valiosa estrategia de control para la TBb, que representa un problema persistente por los reservorios de vida silvestre en que podemos encontrar la enfermedad. Desafortunadamente, interfiere con la prueba tuberculina cutánea por lo que es imposible diferenciar entre bovinos realmente infectados y vacunados (Nugent *et al.*, 2017).

Actualmente una estrategia de vacunación en la vacuna BCG minus, la cual en conjunto de genes perdió un gen cada una. Un estudio comprobó que al vacunar un grupo de conejillos de indias con la vacuna BCG minus y otro grupo con la vacuna BCG, esto permitió crear un test sintético sin estos genes que al ser aplicado en el grupo de vacuna BCG minus no tuvo reacción ante la prueba cutánea de tuberculina. Este avance es realmente importante ya que al demostrar la efectividad tanto de la vacuna como de la prueba cutánea dará pauta para el avance en la erradicación de esta enfermedad al detectar a los animales realmente enfermos (Nugent *et al.*, 2017).

3.7.2 Modelo caprino

La vacunación en pequeños rumiantes ha sido ampliamente estudiada, dando resultados positivos al reducir la gravedad de la enfermedad pulmonar y la diseminación extrapulmonar. La vacunación con BCG es una herramienta útil en

rebaños de cabras para reducir la prevalencia de Tuberculosis a largo plazo (Chambers, 2014).

Un estudio realizado comprobó que en animales vacunados BCG y reforzados con una vacuna que está basada en adenovirus de replicación deficiente expresa un *M. tuberculosis* Ag85A (AdAg85A, por sus siglas en inglés) y al ser desafiados con *M. caprae* por vía endo-bronquial, los animales tuvieron una disminución significativa en comparación con cabras vacunadas solamente con BCG (Arrieta *et al.*, 2018).

Una de las preocupaciones de las pruebas de eficacia de la vacunación contra TBb en animales es la posibilidad de la influencia de micobacterias ambientales sobre la respuesta inmune. Una de estas micobacterias es *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), y aunque las pruebas para la presencia de esta micobacteria fueron negativas en todos los animales previo al inicio del experimento, para confirmar este resultado es necesario evaluar la respuesta de IFN- γ a PPD-*bovis* con la respuesta a PPD-*avium* (Bustamante *et al.*, 2011).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Determinar la concentración IFN- γ en respuesta a los antígenos *M.bovis* y *M. avium* en animales vacunados y no vacunados para descartar la presencia de micobacterias ambientales en la eficacia de la vacunación contra la tuberculosis bovina.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración en sangre de IFN- γ por la estimulación con los antígenos específicos PPD-*bovis* y PPD-*avium* en caprinos vacunados con la BCG-Phipps y no vacunados, y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.
- Comparar la concentración en sangre de IFN- γ por la estimulación con los antígenos específicos PPD-*bovis* y PPD-*avium* en caprinos vacunados con la BCG-Phipps y no vacunados y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

V. HIPOTESIS

La concentración de IFN- γ en sangre en respuesta a la estimulación con el antígeno PPD-*bovis*, es significativamente mayor que aquella en respuesta a PPD-*avium* en caprinos vacunados y no vacunados con la cepa BCG-Phipps, y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales.

Se utilizaron 35 cabras de 3 a 5 meses de edad de una cruce de Alpina y Nubia libres de tuberculosis confirmado con la prueba de la tuberculina y la prueba de ELISA-IFN- γ (Bovigam). Los animales fueron divididos de manera aleatoria en 5 grupos de 7 animales cada uno y colocados en corrales preparados específicamente para los fines de este experimento, con suficiente espacio y sombra, considerando el bienestar animal, con agua y comida *ad libitum*. Dos de los animales murieron a una semana de iniciado el experimento por diarrea causada por coccidia, por lo que todos los animales tuvieron que ser tratados con Baycox® (Bayer) a una dosis de 20 mg/kg.

Previo al inicio del experimento, todos los animales fueron negativos a la prueba de paratuberculosis utilizando el kit de diagnóstico ID Screen® para muestras de suero y plasma (LABGENE Scientific SA, Châtel-Saint-Denis, Switzerland). Los animales estuvieron atendidos de manera continua por un trabajador con experiencia en el manejo y trato de caprinos. El muestreo de sangre rutinario y la aplicación de la tuberculina estuvieron a cargo de experimentados veterinarios de nuestro grupo de trabajo. Todos los animales fueron también negativos a la prueba ano-caudal de la tuberculina y la prueba de ELISA-IFN- γ (Bovigam, Prionics AG, Zurich, Switzerland).



Figura 3. Corrales seleccionados de manera aleatoria en 5 grupos de 7 animales cada uno, colocados estratégicamente para fines del experimento, con suficiente espacio y sombra, considerando el bienestar animal, con agua y comida *ad libitum*.

Vacunación, refuerzo y desafío.

Los animales experimentales fueron distribuidos a los diferentes tratamientos en un diseño completamente aleatorizado (Cuadro 1). Los animales de los grupos con vacunación fueron inoculados vía subcutánea en el lado derecho de la tabla del cuello con una dosis de 1×10^3 UFC. En el caso de BCG envuelta en quitosano, la dosis fue de 1×10^2 UFC en dos mililitros de diluyente, todos en la semana 1. Los animales que recibieron refuerzo fueron inoculados, también vía subcutánea, con $720 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con CFP de acuerdo a los diferentes protocolos. La dosis vacunal fue determinada menor a la reportada en la literatura para prevenir muertes prematuras y poder evaluar por un periodo de tiempo mayor la duración de la respuesta inmune. El adyuvante usado fue el MontanideTM en un 10% del total de la fórmula. El inóculo de desafío fue preparado con una fase logarítmica media de una cepa de campo de *Mycobacterium bovis* crecida en un medio de cultivo de Stonebrink con piruvato. Esta cepa de desafío fue obtenida en México de los linfonodos de una vaca lechera en el 2010 que fue mantenida en glicerol a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Los bacilos fueron peleteados por centrifugación a 750 gravedades ($\times g$) y lavado dos veces con una solución salina buffer de fosfato (PBS; 0.01 M, pH 7.2). Este pellet fue homogenizado en PBS y

agitado con perlas de vidrio de manera continua a 200 revoluciones por minuto (rpm) por 1 h. El homogenizado fue filtrado en un filtro estéril dos veces a través de un filtro de 40- μm y diluido a la dosis requerida (1×10^6 UFC) en 0.5 ml de PBS. Los cabritos fueron desafiados por inoculación directa en la tráquea con una jeringa de 3-ml (23Gx25mm), previa sedación con 0.25 mg/kg de Xilacina.



Figura 4. Inoculación vía subcutánea en el lado derecho de la tabla del cuello de los animales en los grupos con vacunación con una dosis de 1×10^3 UFC.

Cuadro 1. Grupos experimentales para determinar la eficacia de la vacuna BCG en diferentes protocolos de vacunación en un modelo caprino.

Número de grupo	Definición del grupo
1	Grupo control
2	Vacunación con BCG
3	Vacunación con BCG y CFP + adyuvante (Montanide TM).
4	Vacunación BCG + refuerzo CFP + quitosano + PLGA (ácido láctico- co- glicólico, por sus siglas en inglés) + adyuvante (Montanide TM).
5	Vacunación BCG + refuerzo CFP + quitosano + adyuvante (Montanide TM).

Toma de muestras de sangre y estimulación de antígenos. La toma de muestras de sangre para la determinación de IFN- γ como un indicativo de eficacia de la vacuna se llevó a cabo cada 2 a 3 semanas hasta la semana 30, con un total de 13 muestreos. La sangre se tomó de la vena yugular de los animales en tubos vacutainer con heparina. Se tomaron 750 ml de sangre completa de cada animal la cual fue incubada en microplacas de 50 μ l con cada antígeno, la proteína purificada derivada (PPD) *bovis* y *avium*. Se utilizó PBS como control negativo y 50 μ l el mitógeno pokeweed como control positivo por cada animal, a una concentración de 1-mg/mL (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Las microplacas fueron incubadas en un humidificador con 5% CO₂ a 37°C por 20h. Las densidades ópticas (DO) del control negativo PBS se utilizaron para normalizar las lecturas del ELISA para calcular las densidades ópticas de cada antígeno. Así, las DO finales se obtuvieron substrayendo las lecturas de las muestras de PBS. La concentración de IFN- γ en sangre fue determinada después de 16 in vitro con el kit comercial [Bovine

IFN- γ microplate Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kit (ELISA; Bovigam®; Prionics AG, USA).

Sacrificio, clasificación de lesiones y toma de muestras. Después de seis meses del desafío, los animales se llevaron a la sala de necropsias para el sacrificio, la clasificación de lesiones y la toma de muestras de tejido de pulmón y linfonodos para histopatología y análisis microbiológico. Los animales fueron sacrificados siguiendo las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Sacrificio Humanitario de los Animales Domésticos y Silvestres. Los criterios para la clasificación de lesiones se muestran en el cuadro 2. Debido a la dificultad para hacer conteo de lesiones individuales, en especial cuando estas son muy pequeñas, se decidió calificar a los animales de manera individual de acuerdo a la severidad de las lesiones y de los órganos afectados. Para esto, los órganos fueron revisados cuidadosamente y luego rebanados de manera fina para detectar lesiones internas. Los linfonodos de cabeza y tórax fueron removidos completos, luego una mitad fue puesta en formol al 10% para histopatología y la otra mitad fue congelada para el análisis microbiológico. Además, aproximadamente cuatro centímetros cuadrados del lóbulo craneal del pulmón fueron también colectados y divididos de la misma manera que los linfonodos. Para tener el tiempo suficiente de una revisión cuidadosa, los animales fueron sacrificados en un periodo de dos semanas, seleccionando de manera aleatoria un animal de cada grupo para sacrificio diario. Al momento del sacrificio, tanto el número y el tratamiento que recibieron los animales fueron desconocidos para el veterinario que realizó la inspección y calificó a los animales de acuerdo a la lesión observada.

Análisis estadístico. La concentración promedio de IFN- γ en sangre (DO en datos crudos) por grupo experimental para cada periodo de muestreo se comparó utilizando un análisis de varianza de un camino (ANOVA). El promedio de lesiones por grupo fue comparado con el estadístico H en una prueba de Kruskal-Wallis. En todos los análisis se consideró un nivel de confianza del 5%. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software de estadística SPSS versión 22.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del experimento no se observaron signos clínicos sugestivos de tuberculosis, solo estornudos derivados del tipo de alimentación (molido), el cual consistió de una combinación de forraje, alfalfa y maíz.

Todos los animales, incluyendo aquellos con altas calificaciones para la severidad de lesiones, tuvieron una buena condición corporal y un comportamiento de vida normal. Al sacrificio, solo un animal presentó una lesión subcutánea en el sitio de aplicación del desafío, lo que sugiere que el método de inoculación trabajó de manera adecuada.

Respuesta de IFN- γ al PPD-*bovis* en sangre. A la fecha, el mejor indicador de eficacia de la vacuna es la concentración de IFN- γ en sangre. La concentración de IFN- γ medida en densidad óptica (OD) 450-nm en una prueba de ELISA se muestran en el cuadro 2. En este estudio no se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales en los muestreos uno, tres y seis ($p > 0.05$), sin embargo, el grupo 1 tuvo menor concentración que los grupos vacunados, grupos 2-5. Tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos en los muestreos finales del experimento, semanas 24, 28 y 30 ($p > 0.05$), cuando la concentración de IFN- γ regresó a los niveles basales. En general, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos vacunados y el grupo control en las semanas 8-22, excepto por algunas semanas donde la diferencia fue variable, y no hubo diferencia significativa entre algunos de los grupos vacunados y el grupo control. El pico de concentración de IFN- γ se alcanzó en la semana 20 (muestreo 9) en todos los grupos. Cinco semanas después del desafío, el grupo 2, vacunado únicamente con la cepa BCG, tuvo la mayor respuesta de IFN- γ , y el control mostró la respuesta más baja. Todos los grupos regresaron a los niveles básicos en la semana 30 (Figura 3).

Cuadro 2. Media, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la concentración de IFN- γ para todos los grupos experimentales de cabras vacunadas contra la tuberculosis bovina y desafiadas con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis* con el antígeno PPD-*bovis* para cada semana de muestreo.

Semana de muestreo	Grupo experimental	Media de IFN- γ (OD 450 nm)	Desviación estándar	95% IC	Valor de P
1	1	0.1866 ^a	0.2419	-0.0672; 0.4405	0.713
	2	0.0914 ^a	0.0164	0.0762; 0.1066	
	3	0.0970 ^a	0.0366	0.0361; 0.1308	
	5	0.1661 ^a	0.2277	-0.0440; 0.3767	
	6	0.1101 ^a	0.0751	0.0313; 0.1890	
3	1	0.01453 ^a	0.0350	0.1085; 0.1821	0.25
	2	0.2711 ^a	0.0350	-0.0340; 0.5763	
	3	0.3282 ^a	0.1801	0.1616; 0.4949	
	5	0.2578 ^a	0.1251	0.1421; 0.3736	
	6	0.1245 ^a	0.0331	0.0897; 0.1592	
6	1	0.1235 ^a	0.0367	0.0849; 0.1620	0.357
	2	0.1377 ^a	0.0772	0.0662; 0.2091	
	3	0.2185 ^a	0.1406	0.0884; 0.3486	
	5	0.2197 ^a	0.2122	0.0233; 0.460	
	6	0.1158 ^a	0.0275	0.0869; 0.1447	
8	1	0.2021 ^b	0.0180	0.1831; 0.2211	0.0001
	2	0.0947 ^a	0.0106	0.0849; 0.1044	
	3	0.1114 ^a	0.0352	0.0788; 0.1440	
	5	0.0925 ^a	0.0366	0.0586; 0.1264	
	6	0.1495 ^{ab}	0.0663	0.0798; 0.2191	
11	1	0.1755 ^a	0.0436	0.1296; 0.2213	0.05
	2	.3252 ^{ab}	0.0759	0.2550; 0.3954	
	3	.5140 ^b	0.1366	0.3877; 0.6402	
	5	.3640 ^{ab}	0.2260	0.1750; 0.5529	
	6	.4252 ^{ab}	0.3734	-0.0385; 0.8889	
13	1	0.0988 ^a	0.0204	0.0773; 0.1203	.049
	2	0.2364 ^a	0.1450	0.1022; 0.3705	
	3	0.2405 ^a	0.0820	0.1647; 0.3164	
	5	0.1848 ^a	0.1010	0.0914; 0.2783	
	6	0.1475 ^a	0.0401	0.1053; 0.1896	
16	1	0.2556 ^a	0.1852	0.0612; 0.4501	0.002
	2	0.4712 ^{ab}	0.2387	0.2504; 0.6921	

	3	0.3667 ^{ab}	0.2463	0.1389; 0.5945	
	5	0.7475 ^b	0.4321	0.3478; 1.1472	
	6	0.1013 ^a	0.04951	0.0493; 0.1532	
18	1	0.0933 ^a	0.0205	0.0717; 0.1149	0.002
	2	1.1730 ^b	0.8178	0.4166; 1.9293	
	3	0.6585 ^{ab}	0.4943	0.2014; 1.1157	
	5	0.4650 ^{ab}	0.3746	0.1184; 0.8115	
	6	0.1053 ^a	0.0307	0.0730; 0.1375	
20	1	0.7015 ^{ab}	0.2699	0.4181; 0.9848	0.050
	2	1.022 ^{ab}	0.6780	0.3949; 1.6490	
	3	0.7787 ^{ab}	0.5017	0.3146; 1.2427	
	5	1.4491 ^{bc}	0.8747	0.6401; 2.2581	
	6	0.4566 ^{ab}	0.3581	0.0807; 0.8325	
22	1	0.2473 ^a	0.1335	0.1072; 0.3874	0.001
	2	0.7285 ^{ab}	0.5109	0.2560; 1.2011	
	3	0.4198 ^{ab}	0.3974	0.0522; 0.7874	
	5	1.2011 ^b	0.7193	0.5357; 1.8665	
	6	0.1071 ^a	0.0343	0.0711; 0.1432	
24	1	0.4270 ^a	0.2106	0.2059; 0.6480	0.137
	2	0.3648 ^a	0.2789	0.1068; 0.6228	
	3	0.1421 ^a	0.0583	0.0881; 0.1960	
	5	0.4712 ^a	0.4152	0.0872; 0.8553	
	6	0.2450 ^a	0.1186	0.1204; 0.3695	
28	1	0.3918 ^a	0.3512	0.0232; 0.7604	0.158
	2	0.1785 ^a	0.0802	0.1043; 0.2528	
	3	0.1441 ^a	0.0780	0.0719; 0.2163	
	5	0.2178 ^a	0.1717	0.0590; 0.3676	
	6	0.2430 ^a	0.0725	0.1668; 0.3191	
30	1	0.0688 ^a	0.0138	0.0542; 0.0833	0.180
	2	0.1361 ^a	0.0556	0.0847; 0.1875	
	3	0.1174 ^a	0.0529	0.0684; 0.1663	
	5	0.1205 ^a	0.0498	0.0744; 0.1667	
	6	0.0665 ^a	0.0079	0.0581; 0.0748	

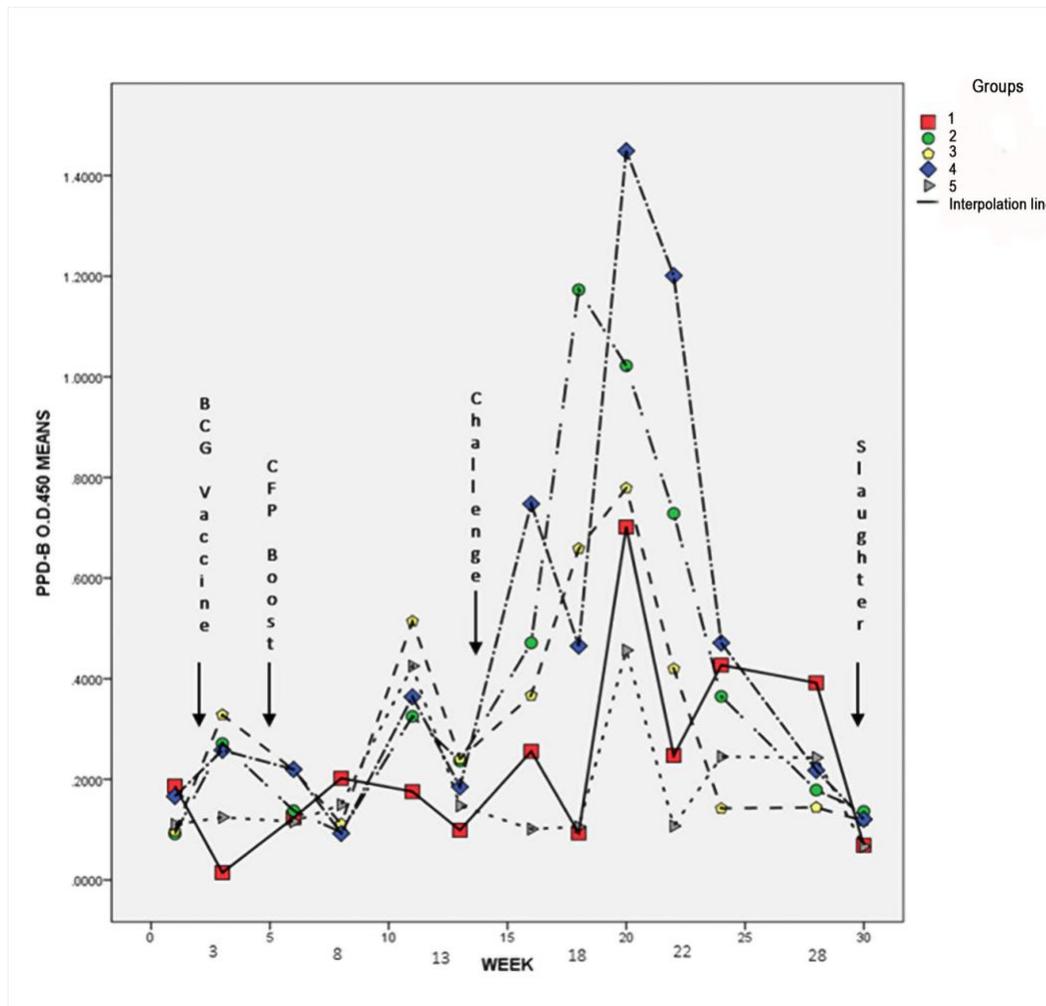


Figura 5. Concentración IFN- γ en sangre de cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de *M.bovis*. El PPD usado en la estimulación de sangre completa *in vitro* fue *M.bovis*. Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450 nm).

Respuesta de IFN- γ al PPD-*avium* en sangre. Con relación a la respuesta de IFN- γ en sangre cuando fue estimulada con el antígeno PPD-*avium*, no se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales en los muestreos 1, 6, 8 y 12 ($p > 0.05$). Se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales en los muestreos 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 y 13. En el muestreo 2 aunque la diferencia fue significativa, en una prueba de Tukey no mostro diferencia de grupos. En cuatro de los muestreos, el grupo 1 o grupo control fue de los que

tuvieron valores mayores de respuesta, en el resto hubo variabilidad de resultados, donde grupos de animales vacunados no fueron significativamente diferentes del grupo control (Cuadro 2, Figura 5).

Cuadro 3. Media, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la concentración de IFN- γ para todos los grupos experimentales de cabras vacunadas contra TBb y desafiadas con una cepa de campo de *M.bovis* con PPD-*avium* como antígeno para cada semana de muestreo.

Semana de muestreo	Grupo experimental	Media de IFN- γ (OD 450 nm)	Desviación estándar	95% IC	Valor de P
1	1	0.0975 ^a	0.0492	0.0458; 0.1491	0.364
	2	0.0945 ^a	0.0159	0.0797; 0.1093	
	3	0.0844 ^a	0.0158	0.0697; 0.0990	
	5	0.0721 ^a	0.0130	0.0600; 0.0841	
	6	0.0808 ^a	0.0166	0.0633; 0.0983	
3	1	0.1120 ^a	0.0186	0.0923; 0.1316	0.037
	2	0.1748 ^a	0.1233	0.0607; 0.2889	
	3	0.2498 ^a	0.1068	0.1510; 0.3487	
	5	0.2135 ^a	0.0985	0.1223; 0.3047	
	6	0.1158 ^a	0.0279	0.0865; 0.1451	
6	1	0.1296 ^a	0.0288	0.0993; 0.1599	0.043
	2	0.1435 ^b	0.0485	0.0987; 0.1884	
	3	0.1182 ^a	0.0355	0.0854; 0.1511	
	5	0.1060 ^a	0.0201	0.0873; 0.1246	
	6	0.0880 ^a	0.0125	0.0748; 0.1011	
8	1	0.1955 ^c	0.0134	0.1814; 0.2095	0.0001
	2	0.0967 ^a	0.0168	0.0811; 0.1123	
	3	0.0894 ^a	0.0159	0.0746; 0.1042	
	5	0.0744 ^a	0.0049	0.0698; 0.0790	
	6	0.1565 ^b	0.0295	0.1255; 0.1874	
11	1	0.0905 ^a	0.0108	0.0790; 0.1019	0.0001
	2	0.2651 ^{bc}	0.0448	0.2237; 0.3065	
	3	0.3362 ^{bc}	0.1124	0.2322; 0.4403	
	5	0.3262 ^{bc}	0.1403	0.1965; 0.4560	
	6	0.1563 ^b	0.0980	0.0534; 0.2592	
13	1	0.1345 ^a	0.1051	0.0241; 0.2448	0.627
	2	0.2000 ^a	0.1642	0.0480; 0.3519	
	3	0.1385 ^a	0.0594	0.0836; 0.1935	
	5	0.1260 ^a	0.0531	0.0768; 0.1751	
	6	0.1918 ^a	0.1335	0.0516; 0.3320	
16	1	0.1018 ^a	0.0512	0.0480; 0.1555	0.001
	2	0.2734 ^{ab}	0.1031	0.1780; 0.3688	

	3	0.2661 ^{ab}	0.1201	0.1549; 0.3772	
	5	0.3870 ^b	0.1358	0.2613; 0.5126	
	6	0.1380 ^a	0.0986	0.0345; 0.2414	
18	1	0.3460 ^a	0.2259	0.1088; 0.5831	0.713
	2	0.4572 ^a	0.2444	0.2312; 0.6833	
	3	0.3542 ^a	0.3409	0.0389; 0.6695	
	5	0.3592 ^a	0.1565	0.2145; 0.5040	
	6	0.2651 ^a	0.1669	0.0899; 0.4404	
20	1	0.5986 ^b	0.3491	0.2322; 0.9651	0.046
	2	0.4795 ^{ab}	0.1787	0.3142; 0.6449	
	3	0.1715 ^a	0.0505	0.1248; 0.2182	
	5	0.3542 ^{ab}	0.2693	0.1051; 0.6034	
	6	0.4540 ^{ab}	0.3026	0.1364; 0.7715	
22	1	0.1671 ^b	0.0881	0.0746; 0.2597	0.003
	2	0.4264 ^{bc}	0.2908	0.1574; 0.6954	
	3	0.0751 ^a	0.0428	0.0354; 0.1147	
	5	0.4662 ^c	0.3359	0.1556; 0.7769	
	6	0.0940 ^{ab}	0.0730	0.0173; 0.1706	
24	1	0.1738 ^{ab}	0.0910	0.0782; 0.2693	0.010
	2	0.0765 ^{ab}	0.0160	0.0617; 0.0913	
	3	0.1465 ^{ab}	0.0573	0.0935; 0.1995	
	5	0.0708 ^a	0.0407	0.0332; 0.1085	
	6	0.1818 ^b	0.1031	0.0735; 0.2900	
28	1	0.1838 ^a	0.0914	0.0879; 0.2797	0.765
	2	0.2385 ^a	0.1733	0.0782; 0.3988	
	3	0.1557 ^a	0.0859	0.0762; 0.2352	
	5	0.2058 ^a	0.1489	0.0681; 0.3435	
	6	0.2476 ^a	0.1934	0.0446; 0.4506	
30	1	0.0725 ^{ab}	0.0226	0.0487; 0.0962	0.001
	2	0.0418 ^a	0.0213	0.0221; 0.0616	
	3	0.0535 ^a	0.0177	0.0371; 0.0700	
	5	0.0521 ^a	0.0118	0.0411; 0.0630	
	6	0.0928 ^b	0.0270	0.0644; 0.0112	

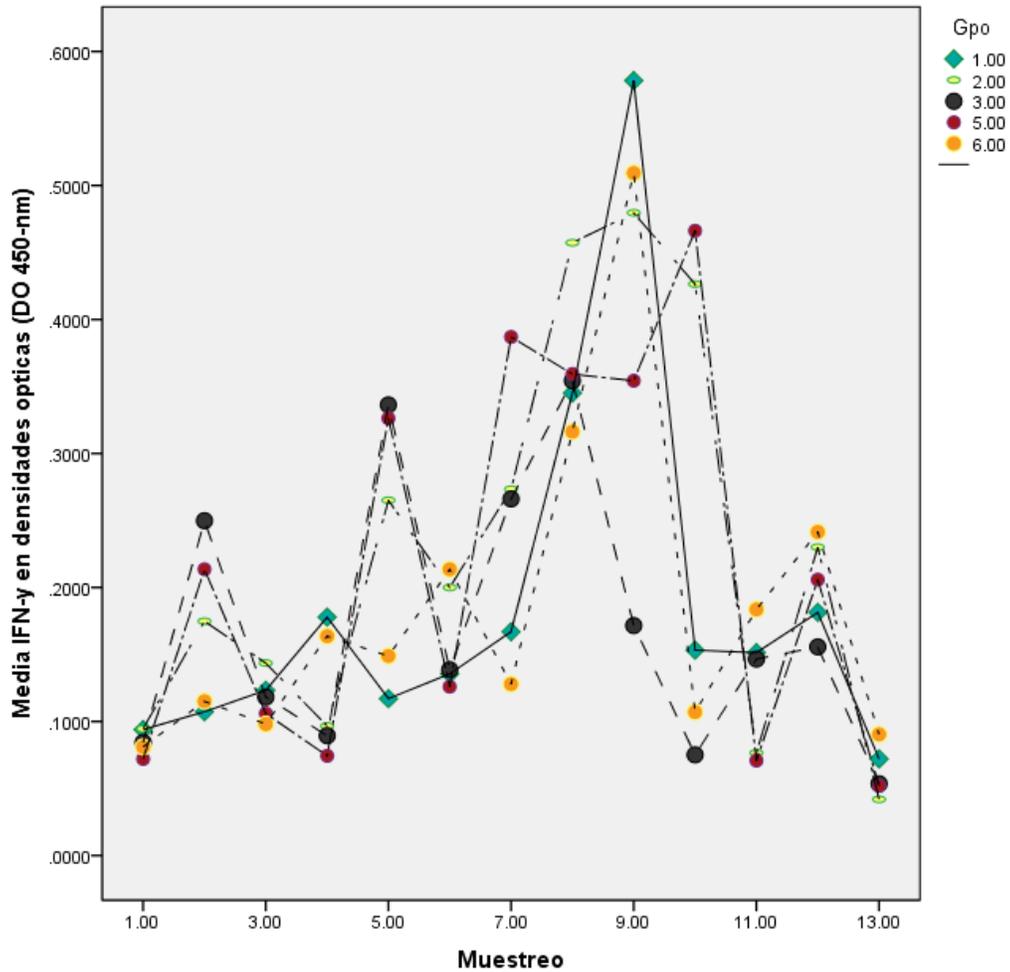


Figura 6. Concentración (IFN- γ en sangre de cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de *M.bovis*, **de los 5 grupos**. El PPD usado en la estimulación de sangre completa *in vitro* fue *M. avium*. Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450 nm).

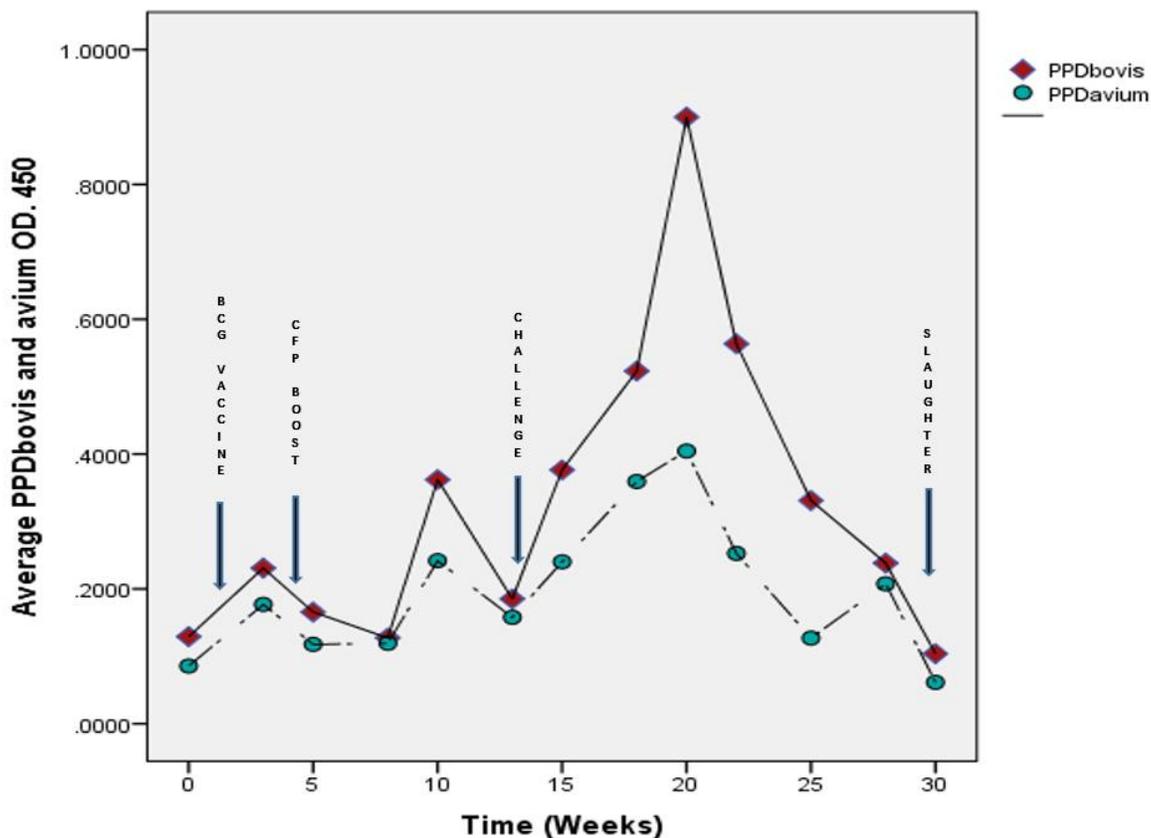


Figura 7. Respuesta antígeno-específica de IFN- γ en cabras después de la vacunación, el refuerzo y el desafío con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*. Se utilizaron los PPD *bovis* y *avium* para la estimulación de sangre completa *in vitro*. Los valores de respuesta de IFN- γ están expresados en densidades ópticas (DO 450_{nm}).

Al comparar el promedio de la concentración de IFN- γ en células sanguíneas periféricas en respuesta al estímulo con los antígenos PPD-*bovis* y PPD-*avium*, de los grupos vacunados con el del grupo control, no se observó diferencia significativa en los muestreos 1-4, 6, 12 y 13 ($p > 0.05$), pero si se observó en los muestreos 5 y 7-11 (Figura 5). El pico de concentración de IFN- γ para ambos casos se alcanzó en la semana 20 tanto para PPD-a como para PPD-b y regresando a su nivel basal en la semana 30 (Figura 3). Estos resultados significan que no existió exposición previa a *M. avium* u otras micobacterias ambientales que pudieran haber influido sobre la respuesta a la vacuna BCG-Phipps reportada en este experimento.

Estudios han descrito lo anterior y demostrado que una exposición a micobacterias ambientales puede sesgar la respuesta inmune hacia PPD-a (Alcaraz *et al.*, 2012).

VIII. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la respuesta de INF- γ al estímulo de células sanguíneas periféricas con el antígeno específico PPD-*bovis*, siempre fue mayor que la obtenida al estímulo con PPD-*avium*, en los animales vacunados en comparación al grupo control, cuando todos fueron desafiados con una cepa de campo de *M.bovis*. De igual manera, el promedio general de respuesta después del desafío de todos los grupos vacunados fue significativamente superior cuando el estímulo se hizo con PPD-*bovis* que cuando se hizo con PPD-*avium*, en comparación al grupo control. Esto indica que la participación de micobacterias ambientales sobre la respuesta a la vacuna en este experimento fue baja o nula y no tuvo influencia sobre la eficacia de la vacuna.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Salinas, R., Estrada-Chávez, C., & Milián-Suazo, F. (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión Genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. *Téc. Pecu. Méx.* 47. (4): 389-412.
- Alcaraz-López, OA., Flores-Villalva, S., Cortéz-Hernández, O., Viguera-Meneses, G., Carrizosa-Urbina, J., *et al.* (2020). Association of immune responses of Zebu & Holstein-Friesian cattle & resistance to mycobacteria in a BCG challenge model. *WILEY*. (00): 1–6.
- Álvarez, N., Serpa, D., Kadir, R., Tirado, Y., Borrero, R., *et al.* (2010). Respuesta inmune específica y de reacción cruzada contra antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones inmunizados con proteoliposomas de *Mycobacterium bovis* BCG. *APJTB*. (7): 188-192.
- Ameni, G., Vordermier, M., Aseffa, A., B-Young, D., & Hewinson, R.G. (2020). Field Evaluation of the Efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. *ASM*. (10). 17: 1533–1538. Recuperado de: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CVI.00222-10>
- Arrieta-Villegas, C., Perálvarez, T., Vidal, E., Puighibet, Z., Moll, X.*et al.* (2018). Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLOS One*. (5). 13: 1-14. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196948>
- Báguena-Cervellera, M.J. (2012). La tuberculosis en la historia. Universidad de Valencia. (2020) Recuperado de: <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/33156/Dra.%20Baguena.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Bezós-Garrido, J., Casal-Comendador, C., Romero-Martínez, B., Álvarez- Sánchez, & J., De Juan-Ferre, L. (2013). Fundamento inmunológico de las pruebas diagnósticas ante mortem de la tuberculosis en rumiantes domésticos. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, UCM. Recuperado de: https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/130-tuberculosis_ante_mortem.pdf
- Buddle, B.M., (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine. (13) 1123–1130.
- Buddle, B.M., Parlane, N.A., Wedlock, D.N., & Heiser, A. (2013). Overview of Vaccination Trials for Control of Tuberculosis in Cattle, Wildlife and Humans. Transbound. Emerg. Dis. 60: 136–146.
- Bustamante, V., José, Aguilar O, José, Ortiz M, Martín, & Bustamante L, José. (2011). *Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis* en bovinos lecheros de la zona de lima detectado mediante tres técnicas diagnósticas. RIVEP. (4). 22: 394-402. Recuperado de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000400014&lng=es&tlng=es
- Calderón, M.N., Parra-López, C., Alfonso, R., Barato, P., Giraldo, D., et al. (2006). *Mycobacterium Tuberculosis* ESAT 6 antigen immunogenicity in owl monkeys. NOVA. (4). 15.
- Canto-Alarcon, G. J., Rubio Venegas, Y., Bojorquez Narvaez, L., Pizano Martínez, O. E., García Casanova, L., et al. (2013). Efficacy of a vaccine formula against tuberculosis in cattle. PLOS One. (10). 8. Recuperado de: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076418>

- Cantó-Alarcon G. J., & Olvera, A. (2013). El agente etiológico de la tuberculosis bovina en México: las bases. Libro técnico Núm. 13, ISBN: 978-607-37-0106-8.
- Chambers, M.A., Carter, S.P., Wilson, G.J., Jones, G., Brown E. *et al.* (2014). Vacunación contra la tuberculosis en tejones y ganado: una visión general de los desafíos, desarrollos y prioridades de investigación actuales en Gran Bretaña. *Wiley*. 175: 90–96.
- Contreras-Magallanes, Y. G., Durán-Aguilar, M., Sosa-Gallegos, S. L., Álvarez, Á. H., Andrade-Santillán, F. A., *et al.* (2021). Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model Animal. (4). 11: 1046.
- Cruz-Fierro, M., Jaramillo-Meza, L., Espitia-Pinzón, CI, Pérez-González, R., Manzo-Sandoval, A., & Díaz-Otero, F. (2020). Evaluación experimental de la vacuna BCG y el extracto proteico en bovinos, mediante la expresión de citocinas. *Spei Domus* (1). 16: 1-27.
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. *EFSA*. (12). 11: 3475-3509.
- Farga, V., (2004). La conquista de la tuberculosis. *RChER*. (2). 20. 101-108.
- García, J. J., & Van-Kooyk, Y. (2013). The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. *Trends Immunol.* (34). 10: 482.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., *et al.* (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (13). 100: 7877–7882.
- Hope, J.C., Thom, M.L.; Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., & Howard, C. J. (2005). Vaccination of neonatal calves with

Mycobacterium bovis BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immunol.* 139: 48–56.

Hui-Qi QU., Fisher-Hoch, S., & McCormick, J.B. (2011). Molecular immunity to mycobacteria: knowledge from the mutation and phenotype spectrum analysis of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *IJID* (5). 15: 305-313.

Jemal, A.M. (2016) Review on Zoonotic Importance of Bovine Tuberculosis and Its Control. *LJ.* 3: 1-13.

Ledermann, W. (2003). La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. *RChER.* 20: 48-50.

Loor-Sánchez, C.J. (2020). Prevalencia de tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*) utilizando la prueba de tuberculina, en el cantón pichincha. Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Recuperado de: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5966/1/T-UTEQ-0104.pdf>.

Lugones, M., Ramírez, M., Pichs, L.A., & Miyar, E. (2007). Apuntes históricos sobre la epidemiología, la clínica y la terapéutica de la tuberculosis en el mundo. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* (45). 2: 53-58.

Machado-Villareal, L., Acosta-Loyola, J.A., Orozco-Andradre, I., Bravo-Rodríguez, G., & Dimakis-Ramirez, D.A. (2015). Determinación del interferón-gamma en tuberculosis: Principios básicos y utilidad. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462015000300007

- Morales, A., Martínez, I., Carlos, A., Álvarez, G., Álvarez, M., *et al.* (2005). Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *FCV-LUZ*. (2). 15: 103-108.
- Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J., *et al.* (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis* –induces tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* (6). 19: 899-908.
- Nugent, G., Yorkney, I., Whitford, J., Aldwell, F.E., & Buddle, B.B. (2017). Eficacia de la vacunación oral con BCG para proteger al ganado en libertad de la infección natural por *Mycobacterium bovis*. *ELSEVIER*. 208: 181-189.
- OIE. (2018). Tuberculosis bovina. Manual Terrestre de la OIE. Recuperado de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf.
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean AS, Mumford, E., *et al.* (2017). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* – a call for action. *LANCET*. 17: 21- 25.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2009). Tuberculosis Bovina. Recuperado de: <https://www.oie.int/doc/ged/d14008.pdf>.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2021). Tuberculosis. Recuperado de: <https://www.paho.org/es/temas/tuberculosis#:~:text=A%20nivel%20mundial%2C%20en%202019,estimaron%20289.000%20casos%20de%20tuberculosis>.
- Ospina, S. (2001). La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Asociación Colombiana de Infectología*. 5: 241-249.
- Owen, J.A., Punt, J., Stanford, S.A., & Jones, P.P. (2014). *Inmunología* 7° Ed. McGraw Hill: México. 691.

- Parlane, N., & Buddle, B. (2015). Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2: 44-53.
- Perea-Razo, C.A., Milián-Suazo F., Bárcenas-Reyes I., Sosa-Gallegos S., Rodríguez-Hernández E., *et al.* (2017). Whole genome sequencing for detection of zoonotic tuberculosis in Querétaro, Mexico. *J. Infect. Dis. Prev. Med.* 5: 158.
- Pérez De Val. B., Villarreal-Ramos B., Nofrarías, M., López-Soria S., Romera N., *et al.*, (2012). Las cabras preparadas con *Mycobacterium bovis* BCG y reforzadas con un adenovirus recombinante que expresa Ag85A muestran una protección mejorada contra la tuberculosis. *ASM*. 19: 1339–1347.
- Pérez-Guerrero, L., Milián-Suazo, F., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., & Escartín-Chávez, M. (2008). Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Publica Mex.* (4). 50: 286-291.
- Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). (2018). Tuberculosis Bovina en México. Recuperado de: [https://www.gob.mx/pronabive/articulos/tuberculosis-bovina-en-mexico#:~:text=La%20tuberculosis%20bovina%20\(TB\)%20es,las%20tuberculosis%20humana%20y%20aviar](https://www.gob.mx/pronabive/articulos/tuberculosis-bovina-en-mexico#:~:text=La%20tuberculosis%20bovina%20(TB)%20es,las%20tuberculosis%20humana%20y%20aviar).
- Ramos, D.F., Silva, P.E.A., & Dellagostin, O.A. (2015). Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Universidad Federal de Rio Grande. Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/7qJDKQYVzSzLfBkvpp33dXr/?lang=en>
- Rivera, P., & Giménez, S. (2010). La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *REDVET*. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63615732006.pdf>

- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J., & Wood, P.R. (1990). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *AVJ*. 69: 1-4.
- Sánchez-López, A. D., Flores-Villalvaba, S., & Gutiérrez-Pabello, J, A. (2018). Naturally *Mycobacterium bovis* infected cattle evoked heterogeneous cellular immune responses. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 9: 171-189.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). GOBIERNO DE MEXICO. Bovino para leche Población ganadera 2011 – 2020. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/655393/Inventario_2020_bovino_para_leche.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (2020). Situación Actual de Tuberculosis Bovina. Recuperado de: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-de-tuberculosis-bovina>.
- Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Simmons, J., *et al.* (2002). Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* (6). 70: 3026-3032.
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., & Villarreal-Ramos, B. (2016). Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu Rev Anim Biosci.* 4 :87-109.
- Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmer, N., *et al.* (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10

for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* (3). 8: 571-578.

Waters, W.R., Palmer, M.V., Buddle, B.M., & Vordermeier, H.M. (2012). Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine*, 30. 2611–2622.

Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., & Buddle, B.M. (2007). Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN post-vaccination but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 118: 50–58.

Zendejas-Martínez, H., Milián-Suazo, F., Quintín-Cuador, J., Cruz-Bello, G., Anaya-Escalera, A.M., *et al.* (2007). Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. *DOAJ*. 43: 629-634.