



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUANTIFICACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA EN BOVINOS
LECHEROS REACTORES A LA PRUEBA DE TUBERCULINA DE UNA
CUENCA LECHERA DEL ESTADO DE HIDALGO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ANABEL ORDAZ VÁZQUEZ

Director de tesis:

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Asesor Externo:

Dra. Miriam Judith Bobadilla del Valle



Tulancingo de Bravo, Hidalgo. 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
 ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
 COORDINACIÓN DE PROGRAMA EDUCATIVO DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

054-CPEMVZ-AMM/11

DR. OTILIO ARTURO ACEVEDO SANDOVAL

Director ICAP

Presente

De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar de la UAEH, la tesis titulada **“CUANTIFICACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA EN BOVINOS LECHEROS REACTORES A LA PRUEBA DE TUBERCULINA DE UNA CUENCA LECHERA DEL ESTADO DE HIDALGO”** presentada por C. ANABEL ORDAZ VÁZQUEZ con número de cuenta 124969, egresado del Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ha sido aprobada por el Jurado Examinador designado y por un revisor externo, por lo que se procede a su impresión y presentación en examen recepcional como requisito parcial para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

Dr. Juan Ocampo López

Presidente

Dra. Rosalinda Acosta Salinas

Secretaria

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Primer vocal

Dra. Patricia Beatriz García Reyna

Segundo vocal

Dr. J. Jesús Germán Peralta, Ortiz

Tercer vocal

Dr. Javier Piloni Martini

Primer suplente

M. en C. José Ignacio Olave Leyva

Segundo Suplente

Dra. Miriam Judith Bobadilla del Valle (revisor externo)

Miriam Bobadilla del Valle

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hgo., 17 de octubre de 2011

[Signature]

DRA. MARICELA AYALA MARTÍNEZ
 Coordinadora del Programa Educativo de
 Medicina Veterinaria y Zootecnia

[Signature]

DR. ARMANDO PELÁEZ ACERO
 Jefe del Área Académica de
 Medicina Veterinaria y Zootecnia



C.e.p. Dr. Armando Peláez Acero.- Jefe del Área Académica de MVZ
 C.e.p. Archivo



Rancho Universitario, Av. Universidad Km. 1
 B. Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600
 Tulancingo, Hgo.
 Tel. 01 7717172000 Ext. 2440



DEDICATORIA

A mi familia por darme lo más grande de este mundo, su amor incondicional.

Mis padres...

Alfonso Ordaz Valadez y Celina Vázquez Nápoles.

Por todo el esfuerzo y dedicación que han puesto por ser los mejores, por sembrar en mí la buena semilla, los amo con todo el corazón.

A mis hermanos...

Maruxa y Abraham.

Por su perfecto y sabio amor siempre serán una inspiración para mí, por haber hecho mi tarea cuando era niña, porque nadie tiene hermanos perfectos, pero yo sí.

A los hombres de mi vida "mis lagartijos"...

Abraham, Israel, Caleb y Elieser.

Porque nunca pensé que podía llegar a quererlos tanto; son el motivo de mi alegría.

A los que me aplaudieron, y me chiflaron.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, Fondos Mixtos Hidalgo, Proyecto M0009-2008-1-96469 "Dinámica de la transmisión de la tuberculosis bovina a humano en una población de alto riesgo, en el estado de Hidalgo".

La realización de ese trabajo me dio la oportunidad de conocer a muchas personas que son difíciles de olvidar por que han dejado huella en mi vida.

A mis revisores el Dr. Ocampo, Dra. Rosalinda, Dra. Paty, Dr. Chucho, Dr. Piloni, Dr. Olave por todo el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y darme animo estos años de estudio, gracias por los buenos consejos, sobre todo agradezco al Dr. Víctor por aguantarme, cuidarme, apoyarme, y confiar en mí como nadie más lo hizo, por compartir todo su conocimiento y llamarme la atención cuando hacía falta. Porque de todos ustedes me llevo algo más que su conocimiento.

Al Dr. José Sifuentes y la Dra. Miriam Bobadilla por confiar en mí aun cuando no me conocían y por permitirme trabajar con su increíble grupo de trabajo.

Al Dr. Orbelín Soberanis por aligerar mi carga muchas veces.

A todos mis compañeros de la primera generación por haber hecho de cada momento inolvidable, entre todos las preocupaciones eran menos y las alegrías eran más.

A todos aquellos que me brindaron su ayuda y amistad en algún momento

A todos mis amigos que me conocen más de lo que imagino, espero nunca fallarles, ustedes saben a quienes me refiero.

Sobre todo a mi familia papás, hermanos, cuñados, tíos y tías, primos y primas, mis abuelos, por siempre estar ahí para apoyarme y nuca permitir que me rinda, por ser mi inspiración y mis héroes.

Y a Dios por ser mi tesoro más grande, bendecirme con todas estas personas y hacerme la persona que soy, Gracias!!!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición	1
1.2 Características generales de las micobacterias	1
1.3 Antecedentes históricos	3
1.4 Importancia económica	5
1.5 Importancia en Salud Pública.....	6
1.6 Epidemiología	7
1.6.1 Resistencia ambiental.....	7
1.6.2 Periodo de incubación.....	7
1.6.3 Hospederos.....	7
1.6.4 Transmisión.....	8
1.7 Patogenia de la infección	8
1.8 Interacción del sistema inmune con <i>M. bovis</i>	11
1.9 Diagnóstico de la tuberculosis bovina	17
1.9.1 Intradermorreacción (prueba de tuberculina)	17
1.9.2 Inspección sanitaria e histopatológica.....	20
1.9.3 Aislamiento e Identificación del agente	22
1.9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
1.9.5 Técnicas de genotipificación	27
1.9.6 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	29
1.9.7 Ensayo de Liberación de Interferón Gamma (IFN- γ)	32
1.9.8 ESAT-6.....	34
II. JUSTIFICACIÓN	37
III. HIPÓTESIS	39
IV. OBJETIVOS.....	39
4.1 General	39

4.2 Específicos.....	39
V. METODOLOGÍA	40
5.1 Diseño del estudio epidemiológico.....	40
5.2 Población de estudio	40
5.3 Lugar de estudio	40
5.4 Determinación del tamaño de muestra.....	40
5.5 Estrategia de reclutamiento.....	41
5.6 Criterio de inclusión de los bovinos.....	41
5.7 Aspectos bioéticos	41
5.8 Prueba de tuberculina	42
5.9 Obtención de las muestras de sangre.....	42
5.10 Estimulación con los antígenos PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6	42
5.10.1 Preparación de reactivos.....	42
5.10.2 Obtención del plasma con las células estimuladas	43
5.10.3 Ensayo de Liberación de IFN- γ	43
5.10.4 Interpretación de resultados.....	44
5.10.5 Bioseguridad	45
VI. RESULTADOS.....	47
VII. DISCUSIÓN.....	59
VIII. CONCLUSIONES	63
IX. PERSPECTIVAS	64
X. REFERENCIAS	65
XI. ANEXOS.....	73
ANEXO 1. Mapa sobre la situación zoonositaria actual de la TBb en México	73
ANEXO 2. Lineamientos generales en la revisión de protocolos de experimentación en donde se utilizan animales (AMCAL, 2006).	73
ANEXO 3. Lineamientos generales en la revisión de protocolos de experimentación en donde se utilizan animales.....	76
ANEXO 4. Preparación de la solución bufferada de fosfatos (PBS).	85
ANEXO 5. Protocolo para realizar el Ensayo de Liberación de IFN- γ	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Animales susceptibles a infecciones por micobacterias	2
2. Clasificación de las micobacterias de lento crecimiento grupo I, II y III y de rápido crecimiento grupo IV, más frecuentemente aisladas en muestras clínicas	4
3. Tejidos que deben ser examinados en el ganado reactor a la prueba de tuberculina al sacrificio	21
4. Principales características de los miembros del CMTB, positivo a la prueba (+), negativo (-), sensible (S) y resistente (R)	26
5. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam [®]), en bovinos reactores a la prueba de tuberculina, con antígeno PPD bovino ($n=464$)	48
6. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam [®]) en bovinos reactores a tuberculina, usando el kit de Bovigam [®] /PPD bovino y Bovigam [®] más el antígeno ESAT-6 ($n=464$)	53
7. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam [®]) en bovinos reactores y no reactores a la Tuberculina, usando el ensayo Bovigam [®] más ESAT-6 ($n=527$)	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modo de transmisión de <i>M. bovis</i>	9
2. Mecanismo de activación del macrófago y linfocitos T por micobacterias	13
3. Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a <i>M. bovis</i> (PM= inspección <i>post-mortem</i>)	15
4. Diagrama de la respuesta inmune contra TBb.....	16
5. Base celular de la hipersensibilidad tipo IV o retardada	18
6. Linfonodo Retrofaríngeo. H&E 40x. Linfadenitis granulomatosa causada por <i>M. bovis</i> . Se observa la presencia de células epiteloideas (E) y células gigantes (G) rodeadas por una cápsula de tejido fibroso (flecha).....	23
7. Principio de la técnica de ELISA sandwich	31
8. Descripción de la región RD1 del CMTB	35
9. Esquematación de resultados del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam [®]), a partir de la prueba de la tuberculina (n=527).	49
10. Gráfico del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam [®]), medido en densidades ópticas (DO), en bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina, con antígenos PPD-Bovino (PPDBo) y ESAT-6. La lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada como control positivo para validar el ensayo.	50
11. Gráficos del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam [®]) medido en densidades ópticas (DO), en bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina, con antígeno PPD-bovino (PPDBo) y ESAT-6, mientras que la lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada para validar el ensayo. A) bovinos con resultados negativos a la liberación de IFN- γ con PPD bovino B) bovinos con resultado positivo a la liberación de IFN- γ con PPD bovino.....	51
12. Gráfico del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam [®]) medido en densidades ópticas (DO), en bovinos negativos a la prueba de la tuberculina, con antígeno PPD bovino (PPDBo) y ESAT-6. La lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada como control positivo para validar el ensayo.	52

13. Resultados del Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam [®]). <i>A)</i> bovinos negativos a PPD bovino y ESAT-6 (n=145). <i>B)</i> bovinos negativos a PPD bovino y positivos a ESAT-6 (n=17). <i>C)</i> bovinos positivos a PPD bovino y negativos a ESAT-6 (n=103). <i>D)</i> bovinos positivos a PPD Bovino y ESAT-6 (n=199).	54
14. Resultados del Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam [®]). <i>A)</i> bovinos positivos a Tuberculina y negativos a ESAT-6 (n=248). <i>B)</i> bovinos positivos a Tuberculina y positivos a ESAT-6 (n=216).	56
15. Gráfica de la Especificidad y Sensibilidad para los antígenos PPD bovino y PPD aviar en el Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam [®]).....	57

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad producida por *Mycobacterium bovis*, que puede afectar a gran número de especies domésticas, silvestres y al hombre, por lo que es considerada una zoonosis. En países en vías de desarrollo la infección por *M. bovis* es un problema de salud pública debido a la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino. En el sector ganadero ocasiona disminución en la producción de carne, leche y pérdidas económicas, por lo que se requiere de pruebas más específicas para que el diagnóstico de la enfermedad sea más eficaz. Una de estas pruebas que se han desarrollado mide la producción de interferón *gamma* (IFN- γ) liberado por los linfocitos sensibilizados *in vitro* con antígenos específicos, incluyendo la proteína ESAT-6, haciendo la prueba más específica y capaz de complementar la prueba de tuberculina.

El objetivo de este trabajo fue determinar la especificidad y sensibilidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ a través del Bovigam[®], de los antígenos PPD bovino y ESAT-6, en bovinos sin prueba de tuberculina reciente para promover su valor diagnóstico. Se evaluaron 527 animales, 464 reactores a la prueba de tuberculina y 63 no reactores por medio del Bovigam[®]. La especificidad del Ensayo de Liberación de INF- γ para el antígeno PPD bovino, considerando un punto de corte ≥ 0.10 , fue del 100%, con una sensibilidad de 65.1%, mientras que para el antígeno ESAT-6, considerando un punto de corte de ≥ 0.10 , fue de 100% de especificidad y la sensibilidad de 46.6% respectivamente, lo que hace que sea una prueba confiable en hatos con baja prevalencia de la enfermedad, donde se descarta de manera eficaz a los animales verdaderos negativos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Este complejo está formado por las especies *M. tuberculosis* que infecta principalmente a humanos, *M. bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guérin o BCG utilizado en la vacunación), *M. africanum* huésped de humanos en África ecuatorial, *M. canettii* huésped de humanos, *M. microti*, huésped de ratas, *M. caprae* que infecta a cabras y *M. pinnipedii* (O'Reilly, 1995; Alcaide *et al.*, 2005).

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica del ganado bovino causada por *M. bovis*, que se caracteriza por la formación de granulomas específicos con contenido caseoso y tendencia a la calcificación, no vascularizados, que según su tamaño y ubicación, causan variadas signologías, como por ejemplo emaciación progresiva, en ocasiones fiebre fluctuante, debilidad e inapetencia (Lüchter, 2004). *M. bovis* ocasionalmente puede infectar a un gran número de especies domésticas y silvestres como se muestra en el **Cuadro 1** y al ser humano, por lo que se le considera una zoonosis y presenta una distribución mundial (Pollock, 1997; OIE, 2009).

1.2 Características generales de las micobacterias

Las micobacterias presentan forma de bacilos delgados que se tiñen pobremente por Gram, son ácido alcohol resistentes por lo que se tiñen mejor por Ziehl- Neelsen (ZN), adquieren un color rojo intenso, o bien se utilizan técnicas de fluorescencia como la de Auramina-Rodamina, inmóviles, aerobias y parásitos intracelulares facultativos (Vadillo *et al.*, 2002). La producción de pigmentos en presencia o ausencia de luz y la velocidad de crecimiento son de importancia para su identificación. De esta forma surgieron 4 grupos con cierta transcendencia clínica

Cuadro 1. Animales susceptibles a infecciones por micobacterias (Tomado y modificado de Gyles, 2004)

Género <i>Mycobacterium</i>	Especies afectadas
Complejo <i>M. avium</i>	Gallinas, aves silvestres, porcinos, simios, bovinos, ovinos, caprinos, caninos, felinos, reptiles, anfibios, peces, animales de peletería, equinos.
<i>M. bovis</i>	Bovinos, caprinos, caninos, felinos, simios, visones, porcinos, elefantes, rinocerontes, zorros, loros, venados, alces, tapires, camellos, bisontes, llamas, jirafas, conejos.
<i>M. tuberculosis</i>	Simios, porcinos, elefantes, caninos, tapires.
<i>M. paratuberculosis</i>	Bovinos, ovinos, caprinos, venados, alces, antílopes, cabras de las montañas.
<i>M. lepraemurium</i>	Felinos, ratas, ratones.
<i>M. leprae</i>	Armadillos.
<i>M. fortuitum</i>	Caninos, felinos, bovinos, porcinos.
<i>M. marinum</i>	Peces, sapos.
<i>M. kansasii</i>	Simios, venados, bovinos, porcinos.
<i>M. chelonae</i>	Porcinos, felinos, manatíes, tortugas, peces

(Runyon, 1970): Grupo I (fotocromógenas), Grupo II (escotocromógenas), Grupo III (no cromógenas), que corresponden a las micobacterias de crecimiento lento y el Grupo IV que corresponde a la micobacterias de crecimiento rápido. Una modificación de su clasificación se muestra en el **Cuadro 2**.

Las micobacterias son resistentes a la desecación, congelación, ácidos y álcalis, sensibles a la luz solar, luz ultravioleta (UV) y temperaturas superiores a 70°C (Vadillo *et al.*, 2002). Poseen una membrana plasmática con la particularidad de que el lipoarabinomano está anclado a la pared celular y el fosfatidil-inositol-manósido forma un puente entre la membrana y el peptidoglicano. La pared celular es gruesa con un elevado contenido de lípidos, que consta de varias capas. La más interna es el peptidoglicano, dando rigidez y forma a la bacteria, la segunda posee arabinogalactanos unidos a ácidos micólicos de la tercera capa, lo que la hace impermeable a gran número de sustancias, lo que le confiere la habilidad de poseer resistencia natural a la mayoría de los antimicrobianos (Hett y Rubin, 2008).

1.3 Antecedentes históricos

La TB es una de las enfermedades más antiguas del mundo, se han encontrado lesiones óseas que sugieren la presencia de TB en momias egipcias, por lo que se cree que esta enfermedad ha evolucionado junto con el hombre. Villemin en 1856 demostró que la inoculación a conejos de tejido tuberculoso de humanos y del ganado bovino causaba la enfermedad, lo cual llevaba a las primeras afirmaciones de ser una enfermedad de tipo infeccioso. Koch en 1882 logró descubrir el microorganismo en tejido enfermo, tiñéndolo con azul de metileno alcalino y contrastándolo con vesuvina (Howard y Francis, 1983).

El *M. bovis* fue aislado por Theobald Smith por primera vez en el año 1898, el cual diferenció el bacilo tuberculoso humano del bovino, por las características de los cultivos y su diferente patogenicidad en animales de experimentación.

Cuadro 2. Clasificación de las micobacterias de lento crecimiento grupo I, II y III y de rápido crecimiento grupo IV, más frecuentemente aisladas en muestras clínicas (Alcaide *et al.*, 2005).

I.Grupo Fotocromógenas	II.Grupo Escotocromógenas	III.Grupo No cromógenas	IV.Grupo. *MNT No cromógenas
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. intracellulare</i>	
		<i>M. malmoense</i>	
		<i>M. nonchromogenicum</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. terrae</i>	
		<i>M. trivial</i>	
		<i>M. tuberculosis</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	

*MNT. Micobacterias no tuberculosas.

El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina se describió en 1909, las investigaciones posteriores concluyeron que, entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar, eran causados por *M. bovis*. En 1970 se le asignó el nombre de *M. bovis* por Karlson y Lessel para el bacilo bovino (Howard y Francis, 1983). En 1924 Albert Calmette y Alphonse Guérin desarrollaron una vacuna a partir de una cepa de *M. bovis* atenuada mediante pases en medio de cultivo y la llamaron vacuna de Calmette-Guérin (Grange y Thoen, 1995). Actualmente, es la única vacuna disponible, con la característica de ser una cepa viva atenuada, utilizada contra la tuberculosis en la población humana y ocasionalmente en el ganado, es importante señalar que su uso limita las pruebas cutáneas de tuberculina y otras pruebas inmunológicas, por lo tanto no se lleva cabo en países donde las medidas de control se basan en tales pruebas, en países donde no hay pruebas ni esquemas de control por sacrificio se puede utilizar la vacunación con BCG para reducir la propagación de la infección en el ganado (OIE, 2009; Jones *et al.*, 2010). En nuestro país no se lleva a cabo la vacunación puesto que no está establecido en la NOM-031-ZOO-1995.

1.4 Importancia económica

El ganado sano que tiene contacto con animales enfermos de TBb, puede infectarse en un corto tiempo lo que representa un riesgo tanto para el bienestar animal, como para su productividad, convirtiéndose en una de las pérdidas económicas más significativas (Pollock, 2002). Las pérdidas económicas alrededor del mundo se estiman por más de 3 billones de dólares por año (Steele, 1995). Por ejemplo, en 2008/2009, Estados Unidos de América (EUA) destinó \$40 millones de dólares y Gran Bretaña alrededor de 100 millones de euros para las campañas de erradicación de TBb (Anon, 2010).

En México se estiman pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo. Además, la TBb disminuye la producción de leche en

un 17%, reduce la ganancia de peso hasta en un 15%, la fertilidad en un 6% y aumenta la tasa de conversión alimenticia (García *et al.*, 2005).

1.5 Importancia en Salud Pública

Como en la mayoría de las zoonosis, el hombre es solo un hospedero accidental de *M. bovis* y su infección depende de la fuente animal. La principal vía de transmisión de *M. bovis* al humano, es por ingestión de leche sin pasteurizar y sus productos (CFSPH, 2007)

El riesgo potencial de contraer *M. bovis* por la vía aerógena es más alto en personas como ganaderos, veterinarios, inspectores de carne, tablajeros, cazadores y encargados de zoológicos, al igual que investigadores, personal de laboratorio, ya que existen reportes en donde se informa que la TBb es una zoonosis ocupacional (Collins, 1983), y la frecuencia de infección por *M. bovis* es mayor en trabajadores de granjas y mataderos que en habitantes de zonas urbanas (OIE, 2009). A menudo, en el contexto de co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA), *M. bovis* resulta ser una importante amenaza a la salud pública (Daborn, 1993; Raviglione *et al.*, 1995).

En México, los desafíos actuales en el control de la TB son diferentes debido a la heterogeneidad de la población, la más amplia brecha socioeconómica, la falta de servicios sanitarios y una pobre cultura en cuanto a la salud. De acuerdo con la Plataforma Única de Información Nacional, en su módulo Tuberculosis, del 2006 se presentaron alrededor de 17,000 casos nuevos en todas sus formas, 84% de los cuales corresponde a TB pulmonar. La tasa nacional para formas pulmonares es de 13.6 por cada 100 mil habitantes. La tuberculosis infantil representa 10% del total de casos registrados. La tasa en mayores de 15 años es de 18.3% para 2006, lo que refleja un decremento importante en comparación con 1997, ubicada en 29.46. Las enfermedades que más frecuentemente se asocian a tuberculosis son: *diabetes mellitus* (18%, porcentaje que se incrementa hasta 35% en mayores de 40 años), (11.6%) desnutrición, (6.8%) alcoholismo y (5 a10%) VIH/SIDA (SSA, 2006).

1.6 Epidemiología

1.6.1 Resistencia ambiental

M. bovis puede sobrevivir por varios meses en el ambiente, particularmente en condiciones de frío, oscuridad y humedad temperaturas que van de 12 - 24°C, y el tiempo de sobrevivencia puede variar de 18 a 332 días, esto depende de la exposición al sol. Se puede encontrar en el suelo o bien en la pastura de animales infectados donde puede sobrevivir un par de semanas (CFSPH, 2007).

Existen estudios que mencionan que *M. bovis* es un organismo bastante resistente que puede sobrevivir en las heces del ganado bovino por al menos 5 meses en invierno, 4 meses en otoño, 2 meses en verano y en el suelo por más de dos años, mientras que el bacilo presente en pus y descargas mórbidas puede permanecer viable por algunas semanas (O'Reilly, 1995).

1.6.2 Periodo de incubación

Los signos de la TBb pueden desarrollarse después de meses en el ganado. La infección puede permanecer en latencia por años y reactivarse, cuando los animales son sometidos a estrés o bien en animales viejos (CFSPH, 2007).

1.6.3 Hospederos

M. bovis es uno de los microorganismos patógenos que tiene más amplio espectro de hospederos, se ha encontrado en especies tanto domésticas como silvestres, y se ha reportado la enfermedad incluyendo: cabras, cerdos, ovejas, caballos, gatos, perros, zorros, venados, bisontes, búfalos, tejones, zarigüeyas, liebres, hurones, jabalíes, antílopes, camellos, llamas, alpacas y primates (O'Reilly, 1995; Phillips *et al.*, 2003). Algunas otras especies en las que se ha descrito la enfermedad es en palomas, visones, *kudus*, *eland*s, tapires, alces, elefantes, órix, rinocerontes, ardillas, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y depredadores felinos como leones, tigres, leopardos y lince (De Lisle *et al.*, 2001).

1.6.4 Transmisión

La TBb es una enfermedad zoonótica con un patrón epidemiológico complejo, el cual incluye la transmisión de la infección dentro y entre animales del hato y hacia especies silvestres, la cual puede depender de un gran número de factores tales como la densidad del ganado y la generación de aerosoles, además del número de bacilos excretados (Pollock *et al.*, 2006).

El reservorio principal de *M. bovis* es el bovino que puede transmitir la infección a muchas especies de mamíferos, incluido el hombre como se muestra en la **Figura 1** (Acha y Szyfres, 2007). El ganado transmite *M. bovis* a través de aerosoles contaminados de las secreciones respiratorias de los animales enfermos, estos aerosoles contagian a otros cuando hay un contacto cercano, además contaminan las pasturas, que serán después utilizadas para la alimentación del ganado. Los animales al alimentarse se contaminan ingieren la bacteria, al utilizar calostro en becerros con leche de vacas infectadas, heces y algunas veces por orina, secreciones vaginales o semen actúan como una fuente de infección (Goodchild y Clifton, 2001; CFSPH, 2007). La transmisión genital puede ocurrir si los órganos reproductores están infectados, pero se observa en raras ocasiones (Neil *et al.*, 1991).

Se estima que cerca del 5% de las vacas tuberculosas, sobre todo en casos avanzados, tienen lesiones en útero o metritis tuberculosa y que del 1 al 2% tienen una mastitis tuberculosa resultando de importancia para la salud pública (Acha, 2007). En algunos países, los reservorios silvestres constituyen una fuente constante de re-infección para el ganado (Corner, 2006).

1.7 Patogenia de la infección

La forma clínica y patológica más común en bovinos es la tuberculosis pulmonar. La fuente de infección es el animal con lesiones pulmonares abiertas (bacilífero), que al toser, elimina pequeñas gotitas de hasta 10µm de diámetro, con bacilos que se mantienen en suspensión y son aspirados por otros individuos susceptibles.

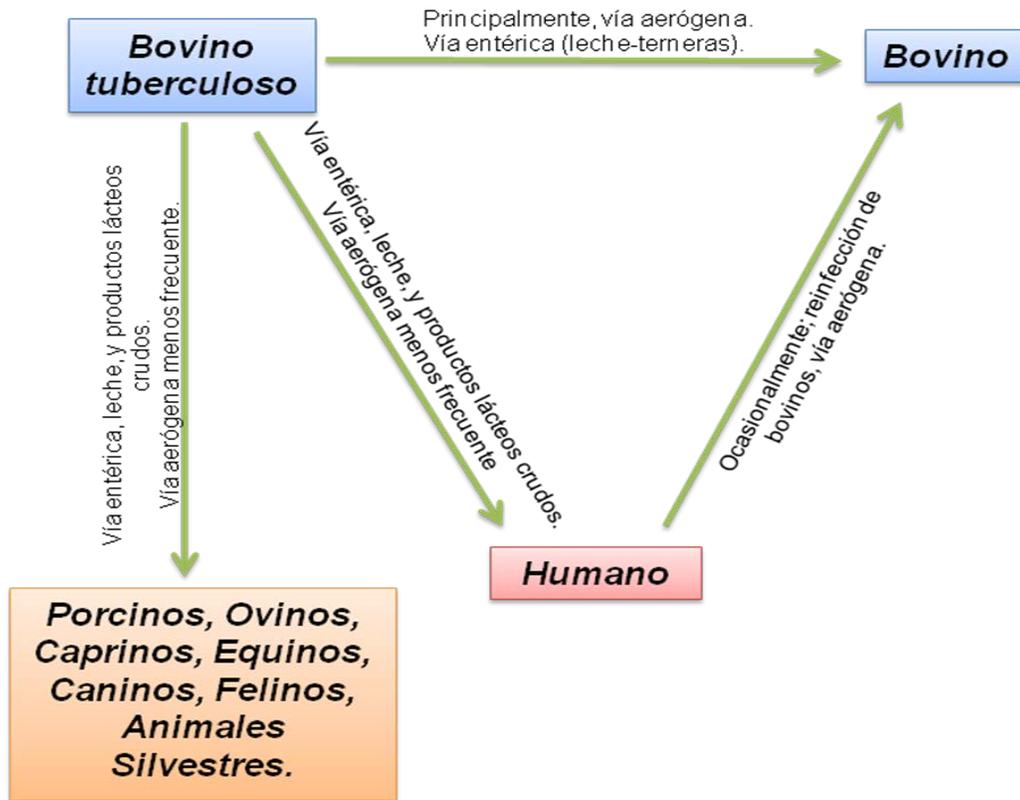


Figura 1. Modo de transmisión de *Mycobacterium bovis* (Tomado de Acha, 2007).

Las gotas más grandes pueden quedar retenidas en las vías superiores, causando frecuentemente lesiones en ganglios cervicales (Stanchi, 2007). Por otro lado, las gotas pequeñas se internan dentro del tracto respiratorio, posiblemente en la superficie alveolar del pulmón (Pritchard, 1988).

El macrófago es la célula hospedera principal en donde *M. bovis* crece intracelularmente cuando penetra al organismo de un animal susceptible, dependiendo de la concentración y ruta de infección, con una pequeña influencia de factores como la genética del animal o el estado nutricional del mismo se levantara una respuesta inmune (Pollock y Neill, 2002). El bacilo penetra en el organismo por vía aerógena (80 - 90% de los casos), y se multiplica en el punto de entrada en las primeras semanas, entonces es fagocitado por los macrófagos alveolares y evita su destrucción a partir de mecanismos que impiden la fusión de los fagolisosomas, siendo entonces transportado a los linfonodos cercanos. Al sobrepasar la capacidad del macrófago los bacilos son liberados y siguen su multiplicación, entonces se activa la respuesta inmune, lo que se conoce como “complejo tuberculoso primario”, éste se presenta en cualquier lóbulo, pero generalmente en la porción dorsocaudal del lóbulo diafragmático y en ocasiones puede estar comprometido más de un lóbulo (Lüchter, 2004; Stanchi, 2007).

En esta fase se pueden presentar tres posibilidades, 1) que los bacilos invadan el organismo por vía hemática o linfática; 2) que al romperse la lesión y alcanzar algún vaso, puedan causar tuberculosis miliar, en órganos como pulmones, riñones, hígado y hueso, entre otros; 3) los bacilos puedan ser destruidos por el sistema inmune del animal, dejando una lesión cicatrizada y una respuesta inmune mediada por células. En resumen, la infección puede transformarse a una tuberculosis activa, permanecer en estado de latencia y probablemente reactivarse después de algún tiempo (Welsh *et al.*, 2005).

El proceso de la enfermedad es lento y puede ser clínicamente inaparente por largo tiempo; incluso cierto número de animales pueden pasar toda su vida productiva sin

signología evidente, pero constituye una amenaza potencial para el resto del hato. En otros animales se origina una bronconeumonía crónica, con tos y disminución de la capacidad productora, en casos avanzados, cuando gran parte de los pulmones están destruidos, hay disnea pronunciada (Acha *et al.*, 2007).

1.8 Interacción del sistema inmune con *M. bovis*

Está bien establecido que la respuesta inmune contra una infección micobacteriana es predominantemente mediada por células (IMC) (Medeiros *et al.*, 2010). El macrófago actúa como célula hospedera y célula efectora clave para el control y destrucción del patógeno (Pollock, 2002). Por otra parte, todas las subpoblaciones de linfocitos T ($T\gamma\delta$, TCD4 y TCD8 $\alpha\beta$) han sido involucradas en la respuesta inmune en el ganado. La secuencia de participación se inicia con la población $T\gamma\delta$ (estas poseen la capacidad de producir interferón gamma (IFN- γ) en pocas cantidades, sin embargo, su papel principal es la de ser enlace entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa), seguida de los TCD4 y finalmente predomina la actividad de la población de los TCD8 $\alpha\beta$ (Ritacco *et al.*, 1991; Pollock *et al.*, 2005).

El reconocimiento de las micobacterias por el macrófago pueden llevarse a cabo por diversos receptores, por ejemplo, algunas moléculas del sistema del complemento tienen una función dual en la fagocitosis de las micobacterias, tal es el caso de los C3b que se unen inespecíficamente a los carbohidratos de superficie del patógeno y son reconocidos a través de CR1, CR3 y CR4 durante la fagocitosis (Carroll, 1998).

La porción Fc de las inmunoglobulinas (Ig) que opsonizan a las micobacterias son reconocidos por su gran afinidad por diversos receptores Fc (FcRs), principalmente los subtipos IgG; otro tipo de receptores son los de manosa y recientemente, se ha demostrado que la señalización proinflamatoria estimulada por antígenos micobacterianos como lipoarabinomananas (LAM) está mediada por receptores de la familia TLR por sus siglas en inglés *toll-like receptor* (Trejo *et al.*, 2003).

Con respecto a la respuesta inmune innata, los neutrófilos son las primeras células inflamatorias en llegar al sitio de multiplicación del bacilo, seguidos por los linfocitos

NK (por sus siglas en inglés *natural killers*) y macrófagos. Las células NK pueden destruir al patógeno directamente o eliminan a los monocitos infectados, también son capaces de activar a las células fagocíticas para su desplazamiento al sitio de infección (North y Yung, 2004).

Después de ser fagocitado, el bacilo es procesado dentro del fagolisosoma, y los antígenos son presentados a los linfocitos T CD4+ por las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), vía el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) el cual está sólo presente en macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. La fusión del fagosoma con el retículo endoplásmico, puede favorecer la presentación de antígenos a linfocitos T CD8+ vía el MHC clase I, como se puede observar en la **Figura 2** (Teixeira *et al.*, 2007).

Sin embargo la activación de los TLR además de ser una importante conexión entre la inmunidad innata y la adquirida, promueve la degradación y liberación del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B), que se desplazan al núcleo de la célula e induce la activación de la transcripción de una gran variedad de genes que trae como ventaja la producción de citocinas como la interleucina 12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α), así como la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 (que interactúan con CD28). Las citocinas son moléculas producidas por células inmunocompetentes después de algún estímulo y son el componente central en la defensa contra micobacterias, por ejemplo la producción de IFN- γ por los linfocitos T es también inducida por las interleucinas IL-23, IL-18 e IL-27, un proceso que es acelerado cuando la IL-18 e IL-27 actúan en sinergismo con la IL-12 (Teixeira *et al.*, 2007).

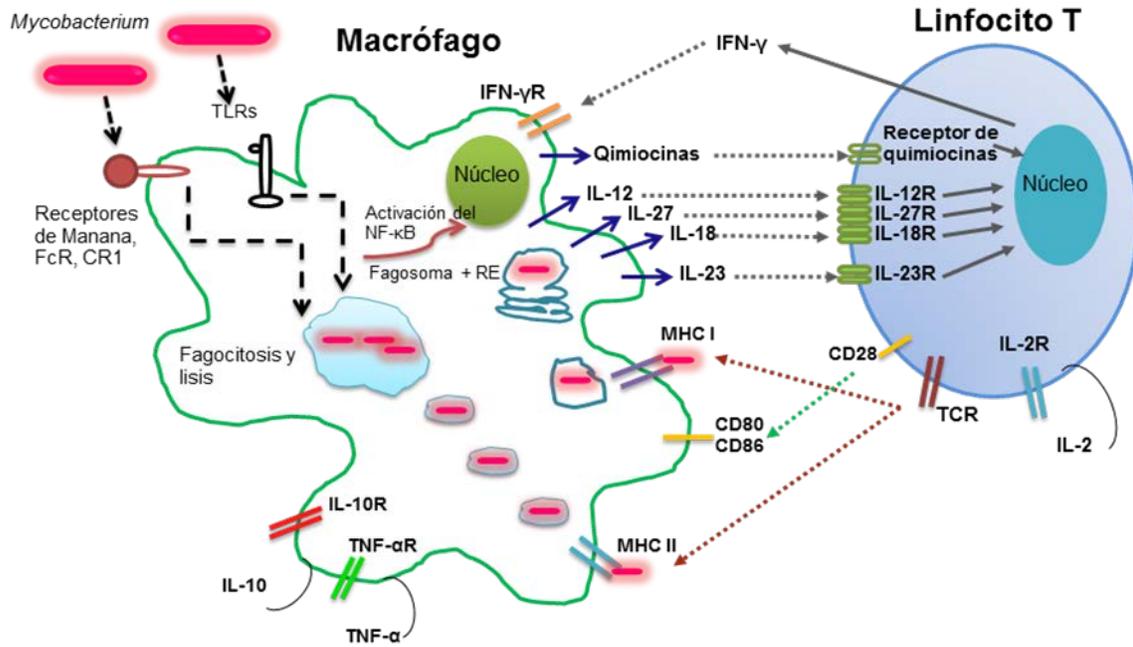


Figura 2. Mecanismo de activación del macrófago y linfocitos T por micobacterias (Tomado y modificado de Teixeira *et al.*, 2007).

La producción de IFN- γ por las células NK es inducida por la IL-12 en la fase inicial de la respuesta inmune, además la IL-12 induce la activación, diferenciación y producción de IFN- γ , también como el desarrollo de linfocitos Th1 (por sus siglas en inglés *T helpers*) antígeno-específico. La producción de IL-2 y sus receptores, activan las células T e inducen la proliferación de linfocitos T. Mientras que el IFN- γ en sinergia con el TNF- α activan la actividad microbicida del macrófago por medio de la IMC. El IFN- γ se encuentra relacionado con la producción de quimiocinas como la interleucina 10 (IL-10), producida por macrófagos y por linfocitos T, que actúa como inmunosupresor endógeno; sin embargo, la producción solo de IFN- γ no es capaz de controlar al bacilo, es solo un componente crucial para las respuesta protectora contra el patógeno (Teixeira *et al.*, 2007).

Aunque la IMC por Th1 tiene el potencial de controlar la infección por micobacterias, la interacción micobacteria-macrófago y el balance resultante de quimiocinas y citocinas producidas puede observarse en distintos panoramas de la infección. La bacteria puede ser eliminada del hospedero, quedar en estado de latencia y reactivarse de su estado de latencia a algún estadio después de un tiempo, o bien desarrollar una tuberculosis activa, como se observa en la **Figura 3** (Welsh *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que durante los estadios tempranos de la infección por micobacterias predomina la respuesta IMC Th1 e IFN- γ , pero en cuanto la enfermedad progresa, puede haber un cambio entre la respuesta por Th1 a Th2, con una anergia asociada de la respuesta celular y el desarrollo de la respuesta humoral o bien la producción de anticuerpos por los linfocitos B, como se observa en la **Figura 4** (Ritaco *et al.*, 1991; Pollock, 2002,).

La ausencia de la respuesta IMC en animales infectados, ocurre particularmente cuando la carga bacteriana es muy alta, ocasionando que algunos métodos de diagnóstico como los que miden las respuesta IMC fallen (McNAir *et al.*, 2001).

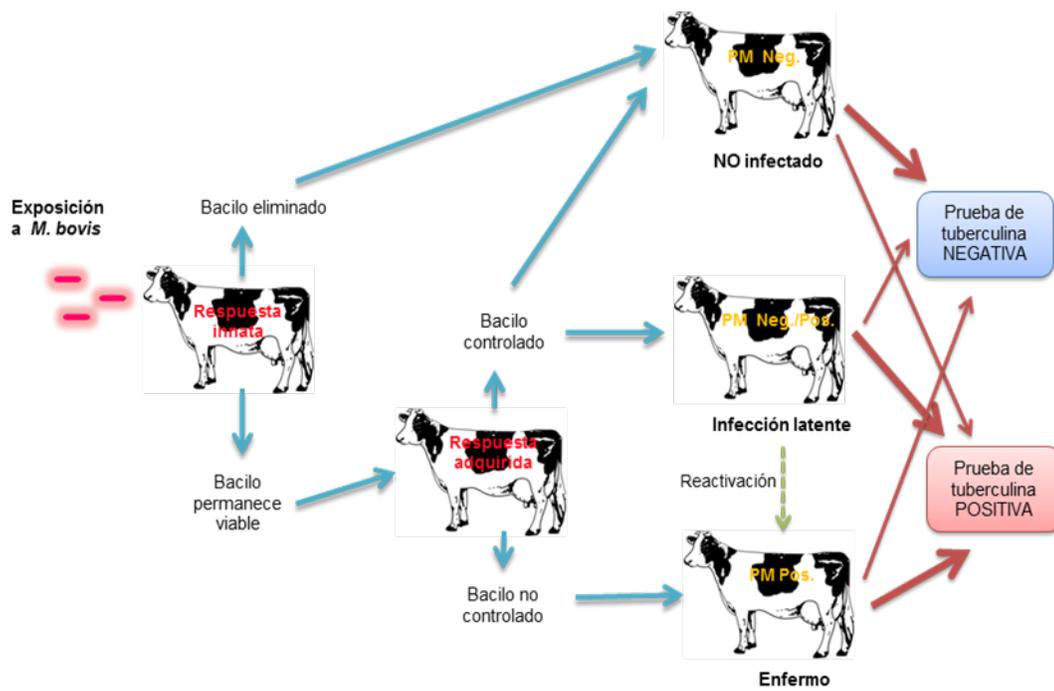


Figura 3. Diagrama que muestra los posibles resultados después de la exposición del ganado a *M. bovis* (PM= inspección *post-mortem*) (Tomado y modificado de Pollock, 2002).

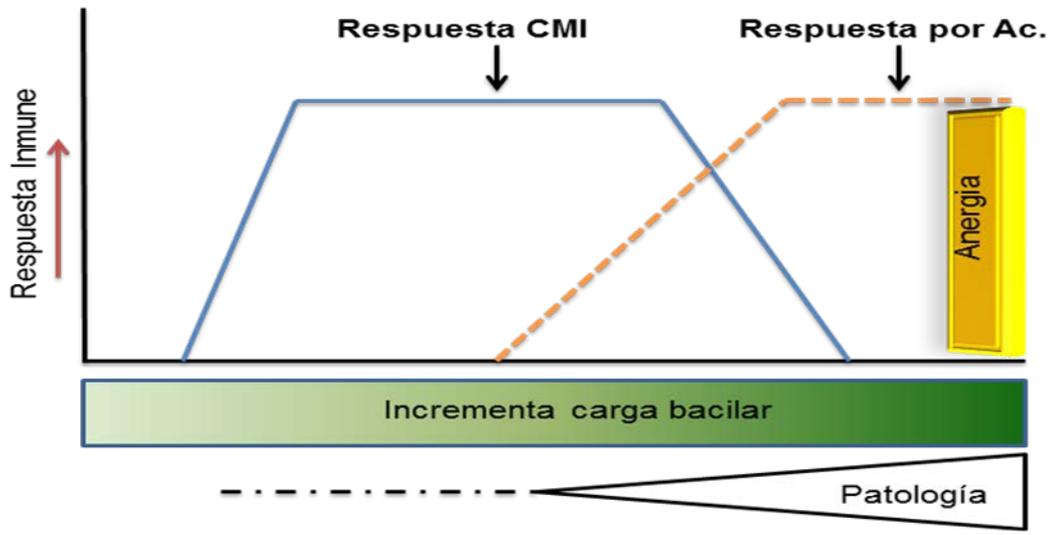


Figura 4. Diagrama de la respuesta inmune contra TB (Tomado y modificado de Pollock, 2002).

1.9 Diagnóstico de la tuberculosis bovina

Existen un gran número de métodos para el diagnóstico de la TBb, sin embargo, es complicado el considerar solo uno como diagnóstico definitivo por lo complejo del curso de la infección. El conocimiento de las herramientas disponibles para el control y erradicación del problema en los animales, nos da la posibilidad para determinar, no solo la prueba a utilizar, sino también cómo, cuándo y dónde se ha de aplicar para lograr un mejor resultado. Es entonces que se dividen en métodos de diagnóstico *ante-mortem* y *pruebas post-mortem*.

1.9.1 Intradermorreacción (prueba de tuberculina)

La prueba de tuberculina se ha utilizado en humanos y animales por más de cien años. El desarrollo de esta prueba surgió a partir de la preparación de la primera “tuberculina” por Robert Koch en 1890, es un concentrado estéril de filtrados de proteína de cultivo del bacilo tuberculoso en caldo de carne con glicerina, y recientemente, en medios sintéticos (OIE, 2009; Whelan *et al.*, 2010).

La prueba de tuberculina es un instrumento básico para detectar la presencia de la infección causada por *M. bovis*, y desempeña un papel fundamental en los programas de control y erradicación de la TBb. Es la prueba *ante-mortem* autorizada por la Organización Mundial en Salud Animal, que constituye un tipo de hipersensibilidad retardada también denominada tipo IV (Anon, 2008; OIE, 2009).

Esta forma de hipersensibilidad es el resultado de la sensibilización a ciertas sustancias antigénicas simples es una reacción mediada por linfocitos Th1 CD4+ sensibilizados, que se desarrolla después del contacto con antígenos específicos persistentes o no degradables como la tuberculina, causando la liberación de citocinas, el reclutamiento de otros linfocitos y macrófagos. Esta reacción es dependiente de IFN- γ y otras citocinas, el IFN- γ activa los macrófagos que trabajan para eliminar el antígeno blanco, como se muestra en la **Figura 5** (McGavin y Zachary, 2007).

Hipersensibilidad Tipo IV

- Linfocitos CD4+, tipo Th1
- 48-72hr
- Antígenos solubles unidos a MHC II, inoculados en piel (tuberculina).

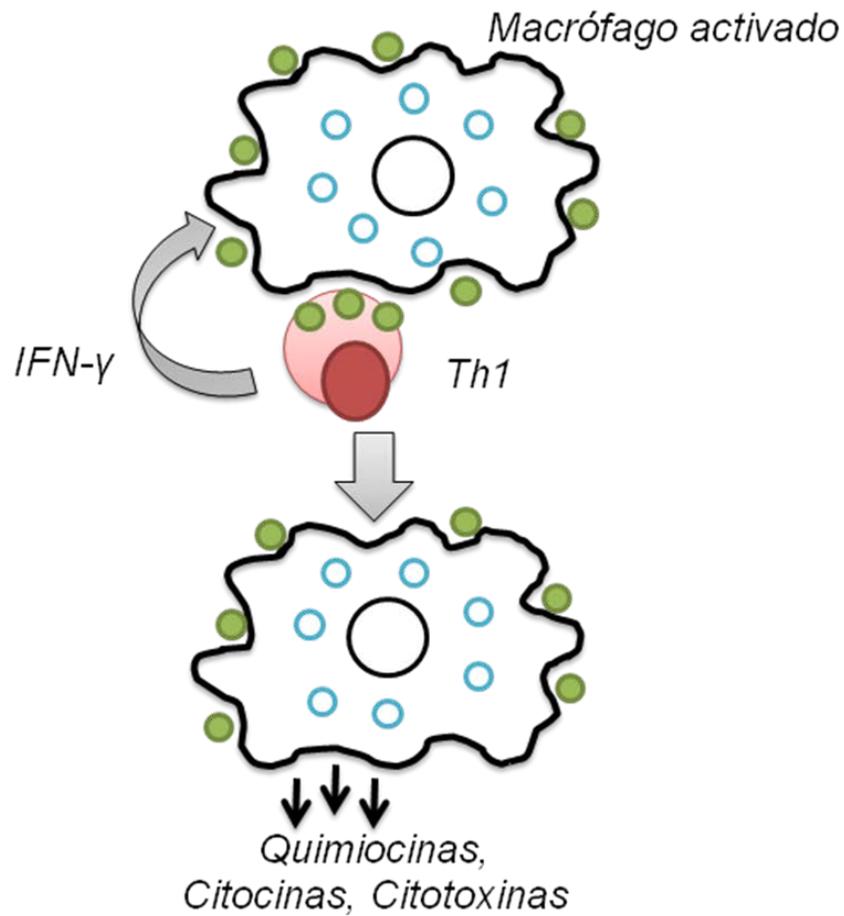


Figura 5. Base celular de la hipersensibilidad tipo IV o retardada (Tomado y modificado de McGavin, 2007).

El objetivo de la prueba de tuberculina es identificar la presencia de los linfocitos Th1 del huésped que han sido sensibilizados a antígenos específicos de *M. bovis* (Andersen *et al.*, 2000).

En nuestro país de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995 que establece los lineamientos para la realización de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina establece las siguientes pruebas para el diagnóstico: la prueba de pliegue caudal que consiste en la inoculación en forma intradérmica de un derivado proteico purificado ó PPD bovino, seguido por la lectura a las 72 ± 6 horas después. Se considera al animal como reactor negativo en el caso de que no se observe ni se palpe algún cambio o inflamación en el sitio de aplicación, reactor positivo cuando se observe o palpe algún cambio. A los animales que son reactores positivos a la prueba de pliegue caudal se les realiza una segunda prueba, la cervical comparativa. En esta prueba se inyecta PPD aviar en la parte superior de la tabla del cuello y PPD bovino en la parte inferior; para la evaluación se establece la diferencia entre el grosor inicial de la piel medida con un cutímetro en ambos sitios de inoculación, con aquella que se presenta a las 72 horas post-inoculación (NOM-031-ZOO-1995).

La prueba de tuberculina tiene como desventaja que puede dar falsos positivos debido a reacciones cruzadas por la exposición a micobacterias ambientales, asimismo puede dar resultados falsos negativos, debido a un estado anérgico del animal, por la aplicación de ciertos fármacos inmunodepresores como los corticosteroides, así como la mala aplicación de la prueba (Pollock *et al.*, 2005). Estos resultados generan problemas económicos y el desacuerdo de los productores con la aplicación de la Norma Oficial Mexicana, en la cual se determina que los animales reactores positivos a la prueba de tuberculina se deben sacrificar. La especificidad para la prueba del pliegue caudal es de 78 a 98.8% y la sensibilidad de 68 a 96.8% y para la prueba cervical comparativa la especificidad es de 88.8 a 100% y la sensibilidad de 55.1 a 93.5% (Monaghan *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 2004).

1.9.2 Inspección sanitaria e histopatológica

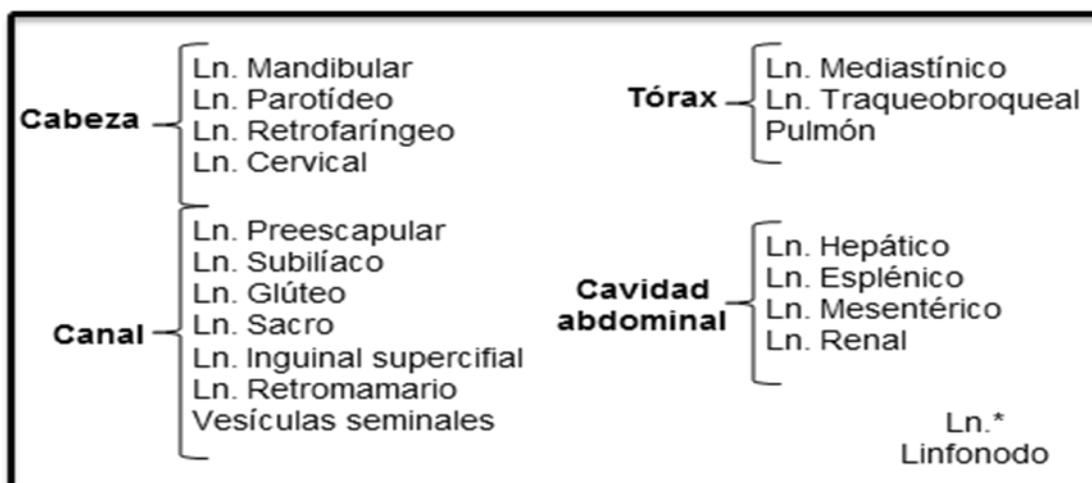
Otra forma de diagnosticar la TB es mediante la necropsia. La observación de lesiones macroscópicas y microscópicas en la necropsia sugestivas a TBb de donde se deben tomar muestras de tejido con lesiones sugestivas, enviarlas para cultivo y confirmar la presencia de *M. bovis*, los sitios anatómicos examinados y los órganos sometidos a revisión se enlistan en el **Cuadro 3**. Un examen cuidadoso puede resultar en la detección del 95% del ganado con lesiones. Este proceso es empleado cuando la detección de la lesión macroscópica es suficiente, por ejemplo cuando la TBb es endémica o bien la prevalencia de la enfermedad es alta (Corner, 1994).

Los linfonodos más afectados suelen ser los asociados al sistema respiratorio como retrofaríngeos en un 29.9%, mediastínico 28.2%, bronquial 18%, pulmón 9.8%, mesentérico, parotídeo, cervical caudal e inguinal superficial (Corner, 1994). En un estudio realizado en la sala de necropsia del CAIT (Complejo Agroindustrial de Tizayuca) se encontró que la frecuencia de lesiones en el linfonodo mediastínico fue de 86%, traqueobronquial 55%, retrofaríngeo 29%, mesentérico 25% y retromamario de 6.5% (Ramírez, 2011). Las lesiones pulmonares varían de acuerdo a la cronicidad de la infección. Al inicio el granuloma tuberculoso se aprecian amarillentas, discretas, de necrosis caseosa, mientras que con el tiempo las lesiones caseosas son encapsuladas y acumulan prominentes depósitos de calcio.

En regiones donde la TBb es prevalente, frecuentemente se observan casos de pleuritis o peritonitis tuberculosa, donde la pleura muestra nódulos caseosos y abundante calcificación, que le da un aspecto perlado a los nódulos tuberculosos (Howard y Francis, 1983; Trigo, 1996).

En ocasiones las lesiones no se pueden observar a simple vista, por lo que es necesario hacer cortes en los tejidos (CFSPH, 2007). Para la preservación del tejido y su posterior procesamiento, como el aislamiento bacteriano o histopatología es necesario que la muestra se conserve, en una solución saturada de borato de sodio, en congelación, o bien en formalina al 10% amortiguada con fosfatos en una relación

Cuadro 3. Tejidos que deben ser examinados en el ganado reactor a la prueba de tuberculina al sacrificio (Tomado y modificado de Corner, 1994).



1:10 (muestra-formalina), con un tamaño promedio de 2 cm por lado, abarcando parte de tejido lesionado y parte de tejido normal (Corner, 1994).

La imagen histológica teñida por hematoxilina-eosina, permite identificar cualquier cambio morfológico del tejido, la imagen es típica de una inflamación granulomatosa, donde se pueden observar células epiteloideas, llamadas así por su semejanza con epitelios, células gigantes multinucleadas formadas por la fusión de macrófagos, mientras que en la periferia se organizan linfocitos y células plasmáticas como se observa en la **Figura 6**. Al paso del tiempo se produce necrosis central y fibrosis periférica. (Trigo, 1996; Neill *et al.*, 2001).

La respuesta inflamatoria crónica rica en macrófagos y la formación del granuloma tuberculoso típico o tubérculo, están guiados por factores como la favorable localización intracelular de este organismo dentro del macrófago y por la pobre digestibilidad de la pared celular. La inflamación granulomatosa puede restringir y prevenir el crecimiento micobacteriano a través de la yuxtaposición de macrófagos infectados y células T. La forma del granuloma también puede evitar la diseminación de micobacterias, encapsulando la lesión infectada con la concentración de múltiples capas de macrófagos no infectados y tejido fibroso (Cassidy, 2006).

1.9.3 Aislamiento e Identificación del agente

Teniendo en cuenta los métodos tradicionales de identificación, dentro del CMTB se pueden diferenciar distintas especies. Las especies de este género bacteriano se identifican con base en propiedades metabólicas y bioquímicas, por su estructura antigénica, sensibilidad a antibióticos y quimioterapéuticos, así como por su patogenicidad para diferentes especies animales. Recientemente se ha agregado la diferenciación genotípica, mediante el empleo de análisis de DNA como spoligotipo, VNTR y MIRUs (Alcaide *et al.*, 2005).

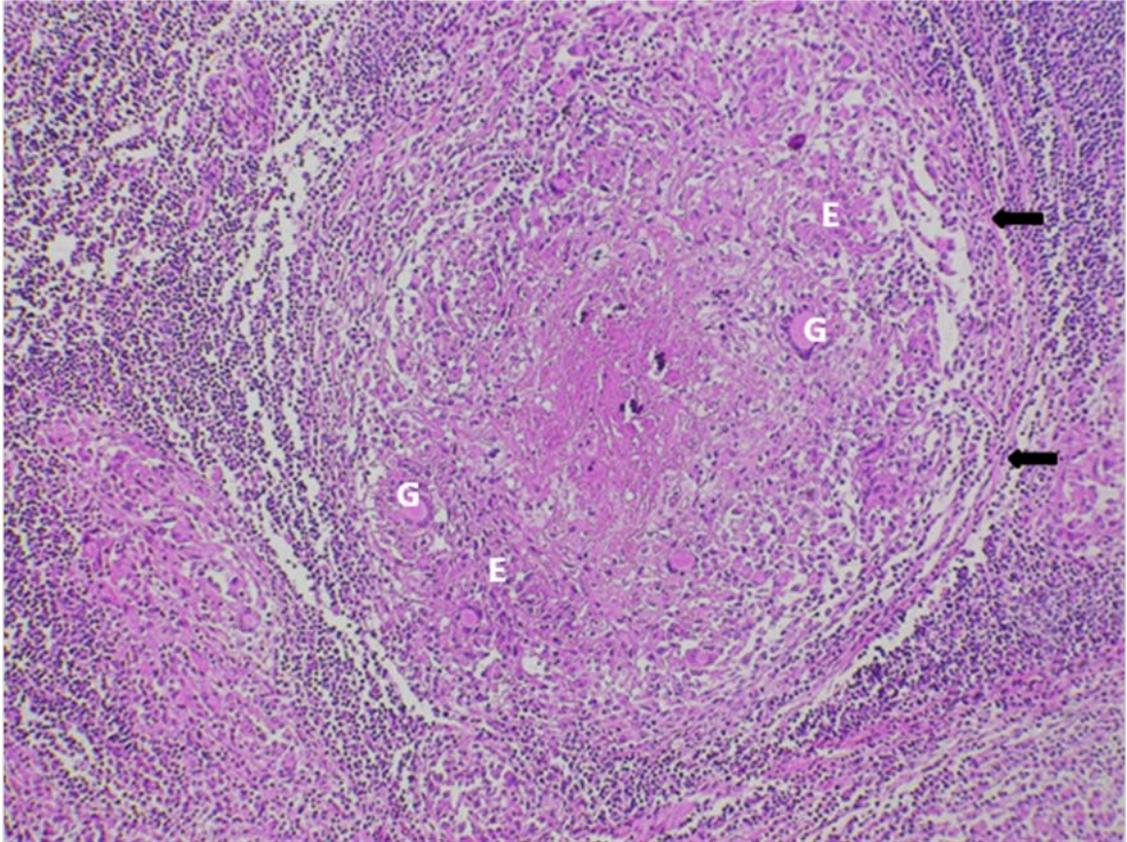


Figura 6. Linfonodo Retrofaríngeo. H&E 40x. Linfadenitis granulomatosa causada por *M. bovis*. Se observa la presencia de células epiteloideas (E) y células gigantes (G) rodeadas por una cápsula de tejido fibroso (flecha). (Adaptado de Jiménez, 2011)

1.9.3.1 Tinciones

Los métodos más utilizados para búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR) son:

- a. Tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada (carbolfucsina). El Ziehl-Neelsen, donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde, dependiendo del colorante de contraste utilizado.
- b. Métodos que utilizan como colorante primario fluorocromos como la auramina-rodamina los bacilos fluorescentes se observan de color amarillo o naranja. La microscopia con esta tinción presenta una sensibilidad de 22% a 80% (Alcaide *et al.*, 2005).

1.9.3.2 Cultivo

El aislamiento de micobacterias a partir de muestras de tejido en medios de cultivo, continúa siendo fundamental y se considera el gold standard para el diagnóstico definitivo de TB. El cultivo ha demostrado ser más sensible (10^1 - 10^2 bacterias viables/mL) que el examen microscópico. Los medios sólidos de cultivo son medios ricos que contienen huevo, fécula de papa, sales y un agente inhibidor como es el verde de malaquita. Los medios más utilizados son el de Löwenstein-Jensen (LJ) sin glicerol más piruvato y el de Stonebrink (SB) con piruvato de sodio. Sin embargo, existen otros medios de cultivo como lo son: agar Middlebrook 7H10 y 7H11. Además de los medios clásicos caldo Middlebrook 7H9, caldo Dubos, caldo Youmans, caldo Proskauer-Beck entre otros. Asimismo, existen otros medios comerciales que utilizan la base de los convencionales. Tanto en medios con base de huevo o de agar se pueden observar colonias rugosas con aspecto de migas de pan (que suelen ser característica del CMTB), no pigmentadas, de crecimiento lento. El tiempo de incubación de 6 a 8 semanas parece ser el más adecuado, sin embargo, esto puede ser una limitante para el diagnóstico rápido del microorganismo. La temperatura óptima de crecimiento del CMTB es de 37°C, en un ambiente microaerofílico de 5 a 10% de CO₂ (Alcaide *et al.*, 2005).

1.9.3.3 Pruebas bioquímicas

En 1992 se propusieron unos requisitos mínimos para la definición de especies de micobacterias de crecimiento lento, algunos se mencionan en el **Cuadro 4**. Entre estos requisitos se encuentra un número limitado de pruebas bioquímicas que, junto con pruebas genéticas y moleculares, permitirían la caracterización de las distintas especies de este grupo de micobacterias. Entre estas pruebas bioquímicas están: producción de niacina, reducción de nitratos, tiofeno-2-ácido carboxílico (TCH), presencia de la enzima pirazinamidasas, catalasa semicuantitativa y catalasa termoestable (Alcaide *et al.*, 2005).

1.9.3.4 Sistemas automatizados

El BACTEC-MGIT 960 (Mycobacterial Growth Indicator Tube), es un método fluorométrico basado en un 7H9 de Middelbrook con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de la reducción de O₂. Contiene suplementos de antibióticos y de enriquecimiento, pero sólo admite el método de descontaminación de NaOH-NALC (N-acetil-L-cisteína). Asimismo, puede utilizarse para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos de primera línea como, estreptomycin, rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida (Alcaide *et al.*, 2005).

1.9.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de la TBb se ha mejorado sustancialmente en los últimos años (Parra *et al.*, 2008). La PCR es una alternativa rápida, sensible y específica en el diagnóstico de TBb; comparado con el aislamiento en cultivo; además permite confirmar rápidamente el diagnóstico de TBb, sin cultivo previo (Romero *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Principales características de los miembros del CMTB, positivo a la prueba (+), negativo (-), sensible (S) y resistente (R) (Tomado y modificado de Alcaide *et al.*, 2005).

Pruebas	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Niacina	+	+	-	-
Nitratasa	+	-	-	-
Tipo respiratorio	Aerobio	Microaerófilo	Microaerófilo	Aerobio
TCH (5m g/ml)	R	S	S	S
Pirazinamida	S	S	R	R
Cicloserina	S	S	S	R

Se puede llevar a cabo a partir de distintos tipos de muestra como: expectoración, sangre, hisopados nasales, leche, así como de linfonodos y otros tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, esto último con la ventaja de la detección rápida del bacilo no viable (Roring *et al.*, 2000).

La técnica consiste en la amplificación de secuencias específicas de ADN, mediante la PCR de una zona de ADN concreta (blanco) y la observación directa o bien, un posterior análisis post-amplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación de los fragmentos de amplificación obtenidos (Alcaide *et al.*, 2005). Las secuencias blanco más ampliamente utilizadas en la detección de las micobacterias del CMTB son las secuencias de inserción IS6110 y IS1081 altamente conservadas en el ADN de las micobacterias pertenecientes al CMTB (Wards *et al.*, 1995; Skuce *et al.*, 1996). En la actualidad, la PCR se utiliza como diagnóstico complementario preliminar a la confirmación por aislamiento bacteriológico, tal como lo indica la NOM-031-ZOO-1995 (Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina *Mycobacterium bovis*).

Actualmente existen variantes de la PCR original, llamada PCR anidada, permite identificar el gen que codifica para la proteína de secreción MPB70, característica de ciertas cepas del CMTB y en la actualidad se utiliza como herramienta epidemiológica para demostrar patrones moleculares entre cepas aisladas, como por ejemplo, la similitud que tienen cepas de *M. bovis* aisladas de humanos y aisladas de ganado, que representan un riesgo para la salud humana (Romero *et al.*, 2006, Pérez *et al.*, 2008).

1.9.5 Técnicas de genotipificación

La determinación de las huellas genéticas permite distinguir entre cepas diferentes de *M. bovis* y hacen posible establecer su origen, transmisión y distribución mundial (OIE, 2009). Se basa en el principio de la estabilidad genética por su reproducción asexual, donde una bacteria da origen a clones de bacterias con la misma información genética, de este modo, se deduce que cepas de micobacterias con

idéntico genotipo tienen el mismo origen y que cepas con genotipo diferente provienen de lugares diferentes (Acosta *et al.*, 2009). Se han evaluado diversos métodos moleculares para identificar las diferentes especies que integran el CMTB. Las técnicas basadas en PCR seguida de análisis RFLP (por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) son el método de referencia para identificar cepas individuales del CMTB. La secuencia de inserción IS6110, presenta numerosas copias en el cromosoma de *M. tuberculosis*, en localizaciones muy variables, mientras que *M. bovis* se caracteriza por contener únicamente entre una y cinco copias del fragmento IS6110 (Skuce *et al.*, 1996).

Estas técnicas, por sí solas, no pueden ser utilizadas eficientemente para clasificar taxonómicamente los miembros del CMTB (Skuce *et al.*, 1996). Las cepas con escaso número de copias de IS6110 deben ser tipificadas por la técnica de *Spoligotyping* (por sus siglas en inglés *Spacer Oligonucleotide Typing*), que detecta la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras variables dentro de la región DR (por sus siglas en inglés *Direct Repeat locus*). Los espaciadores en la región DR son amplificados por PCR y detectados por hibridación del producto de PCR marcado con biotina con una membrana que tiene unidos los oligonucleótidos derivados de las secuencias espaciadoras. Los aislados de *M. bovis* presentan la típica ausencia de los espaciadores 39 a 43. Mediante esta técnica se ha podido distinguir especies sensibles a la pirazinamida, que se han denominado *M. bovis* subtipo *caprae*, detectadas por la ausencia de los espaciadores 3 a 16 como patrón *spoligotype*, mientras que el subtipo resistente se ha denominado *M. bovis* subtipo *bovis* (Aranaz *et al.*, 1996). El *spoligotyping* se puede utilizar como diagnóstico complementario a la tipificación de tuberculosis de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995.

Otras de las herramientas de la biología molecular es la caracterización del perfil VNTR (por sus siglas en inglés *variable-number tandem repeat typing*), los cuales son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de secuencias repetidas. Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos

complementarios a secuencias específicas en sus flancos. El tamaño del amplicón revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene, permitiendo almacenar códigos numéricos comparables entre diversos laboratorios y crear bases de datos (Acosta *et al.*, 2009).

1.9.6 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ha sido aplicada para el diagnóstico de la TBb y permite evaluar los anticuerpos séricos en forma sencilla y rápida. Existen métodos derivados que están siendo evaluados para la medición de la respuesta inmune humoral, que han mostrado tener importancia para la detección de animales infectados por *M. bovis* en estados tardíos de la enfermedad (Lightbody *et al.*, 1998).

Puede ser muy útil en ganado anérgico, aunque su sensibilidad y especificidad son limitadas debido al desarrollo tardío e irregular de la respuesta inmune humoral (OIE, 2009). Sin embargo, puede identificar animales infectados en etapas previas al desarrollo de hipersensibilidad retardada, la razón radica en la divergencia entre la inmunidad humoral y celular en el curso de la TBb. La prueba de ELISA ha sido utilizado para detectar anticuerpos en el suero contra los antígenos de *M. bovis* y otros antígenos, tales como: PPD, filtrado de cultivo, así como antígenos purificados nativos o recombinantes (Estrada *et al.*, 2001).

1.9.6.1 Fundamento

La prueba de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los diferentes tipos de ELISA se enumeran a continuación:

Anticuerpos marcados:

- ELISA Directo
- ELISA Indirecto
- ELISA Sandwich

1.9.6.2 ELISA Sandwich

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado, como se muestra en la **Figura 7.**

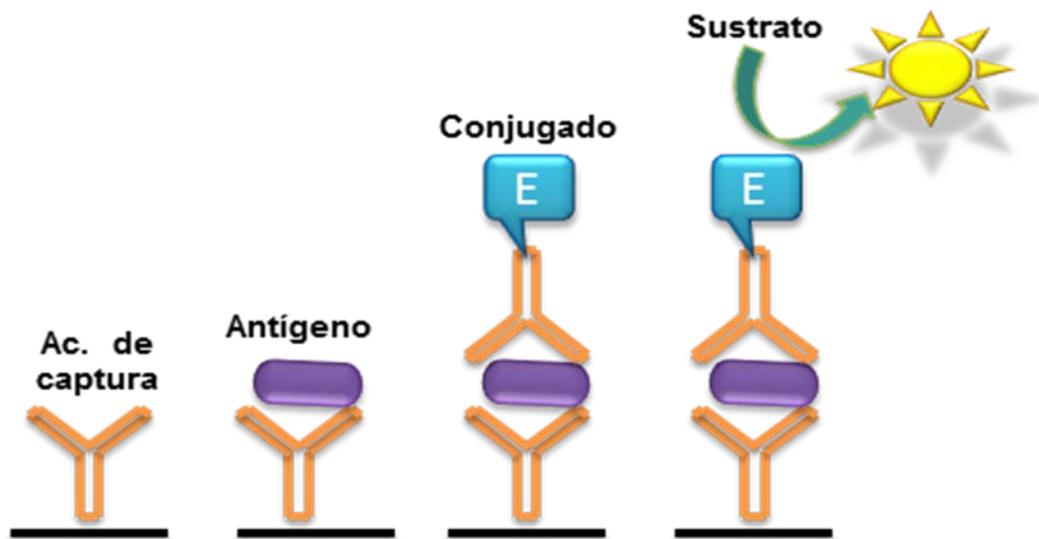


Figura 7. Principio de la técnica de ELISA Sandwich.

1.9.7 Ensayo de Liberación de Interferón Gamma (IFN- γ)

La respuesta inmune contra patógenos depende en gran parte de las citocinas, las cuales regulan todas las células del sistema inmune. Las citocinas como es el caso del IFN- γ , son proteínas de bajo peso molecular, secretadas al inicio de la activación celular por diferentes leucocitos, principalmente linfocitos T CD4+ cooperadores y células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas, entre otras. Funcionan como moléculas mensajeras intercelulares que inducen una actividad biológica, en particular después de unirse a su receptor en una célula blanco competente o que expresa receptores específicos. La respuesta a estas citocinas incluyen el desarrollo de la inflamación, la inducción de la respuesta inmune humoral y celular, la hematopoyesis, así como la proliferación y diferenciación celular, entre otros (Gutiérrez, 2010).

El IFN- γ puede ser la clave en el control de la infección por *M. bovis*, ya que en la TB esta citocina es producida por células T CD4 y CD8, así como por células NK. Recientemente se ha reportado que la IL-12 que es secretada luego de la fagocitosis de la micobacteria y que conlleva al desarrollo de la respuesta inmune tipo Th1, depende de la producción de IFN- γ por macrófagos alveolares infectados por micobacterias (Flynn y Chan, 2001).

La función que ejerce el IFN- γ sobre las células que estimula son variadas e importantes, por ejemplo, en los macrófagos es la expresión del MHC, mientras que en los linfocitos B activados hay un cambio de clase a IgG_{2a}, además estimula la proliferación de los linfocitos Th2 y la eliminación de la bacteria por los macrófagos (Gutiérrez, 2010).

El IFN- γ es particularmente importante en la infección por tuberculosis ya que se ha observado en un estudio en ratones, que una alteración en el gen de IFN- γ conlleva a una inhabilidad para controlar normalmente el reto con *M. tuberculosis* (Cooper *et al.*, 1993).

Wood *et al.*, en 1990 desarrollaron una prueba diagnóstica celular rápida *in vitro* (24 horas) para la TBb, basado en la detección de IFN- γ . Se basa en la comparación de PPD Bovino contra PPD Aviar en un inmunoensayo (EIA) tipo sandwich. Este método diagnóstico *in vitro* compite favorablemente con la prueba de tuberculina por su sensibilidad y especificidad (Adam, 2001). Además, se ha sugerido realizar el Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) en hatos con alta prevalencia de la enfermedad, infección persistente o que no pueden ser detectados con la simple prueba de tuberculina en un tiempo de 8-28 días después de la aplicación de la tuberculina incrementará el número de animales reactivos. Existe una gran variedad de estudios en donde no se ha mostrado efecto significativo después de aplicar la prueba cervical comparativa en ganado naturalmente infectado. Se ha mostrado que la prueba del pliegue caudal incrementa selectivamente la producción de IFN- γ *in vitro* en respuesta al antígeno PPD bovino realizado 3 días después de la lectura de la tuberculina (Gormley *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2006; Coad *et al.*, 2010).

Esta técnica tiene como ventajas: a) flexibilidad en su interpretación fijando los puntos de corte de acuerdo al *status* de la región que se está probando, b) no se requiere de un segundo manejo del ganado para leer la prueba, c) no existe interferencia con el *status* inmunológico del animal, ya que puede ser repetido en varias ocasiones a diferencia de la prueba de tuberculina, d) se pueden adaptar una gran variedad de antígenos para diferenciar animales vacunados de los que no lo están, en el caso de países en donde se lleve a cabo la vacunación (Ryan *et al.*, 2000, Wood, 2001; Vordermeyer, 2006).

La sensibilidad y especificidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ ha sido estimada en un gran número de estudios internacionales, la sensibilidad varía entre 73.0% a 100%, con una media de 87.6%, y la especificidad de 85.0% a 99.6% con una media de 96.6% (Schiller *et al.*, 2010).

1.9.8 ESAT-6

Una de las líneas de investigación de la TBb está enfocada al estudio de la secreción activa de ciertas proteínas antigénicas por micobacterias, la cual induce una fuerte IMC en el hospedero (Jones *et al.*, 2010). Actualmente existe un gran interés en el estudio y caracterización de nuevas proteínas potencialmente antigénicas para ser utilizadas en los estudios serológicos de alta especificidad (Lyashchenko *et al.*, 1998). Se ha demostrado que existe solo una pequeña diferencia en la expresión de antígenos por las cepas dentro del CMTB, pero el hecho es que estas cepas tienen epítopes en común con micobacterias no patogénicas, lo que promueve el desarrollo de pruebas para identificar antígenos específicos dentro del CMTB (Jackett *et al.*, 1988).

ESAT-6 por sus siglas en inglés (*early secreted antigenic target*) es una pequeña proteína de tan solo 6 KDa, secretada por el CMTB, que ha sido evaluada como candidata para vacuna y una herramienta en el diagnóstico (Mustafa, 2002; Pai, 2005; Dietrich *et al.*, 2006). Los genes de ESAT-6 y su chaperona (CFP-10 por sus siglas en inglés *culture filtrate proteins*) están localizados en la región RD1 (por siglas en inglés *region of difference 1*), al menos 7 diferentes antígenos están codificados por esta región RD1, por ejemplo: Rv3871, Rv3872 (PE35), Rv3873 (PPE68), Rv3874 (CFP-10), Rv3875 (ESAT-6), Rv3878 y Rv3879c por lo que se le conoce como isla inmunogénica, en una porción del genoma del CMTB como se observa en la **Figura 8** (Renshaw *et al.*, 2002; Okkels *et al.*, 2003).

Se ha observado que a partir del ganado infectado por *M. bovis* se han aislado a miembros de la familia proteínas de proteínas ESAT-6, que están entre los antígenos más frecuentemente reconocidos en *M. bovis*. Existen 23 miembros de la familia de proteínas ESAT-6, pequeñas proteínas de aproximadamente de 100 aminoácidos, que muestran una secuencia de aminoácidos similar tanto para ESAT-6 como CFP-10, éstas han demostrado ser fuertes inmunógenos en modelos de infección en humanos, ratones, bovinos y conejillos de indias (Brodin *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2010).

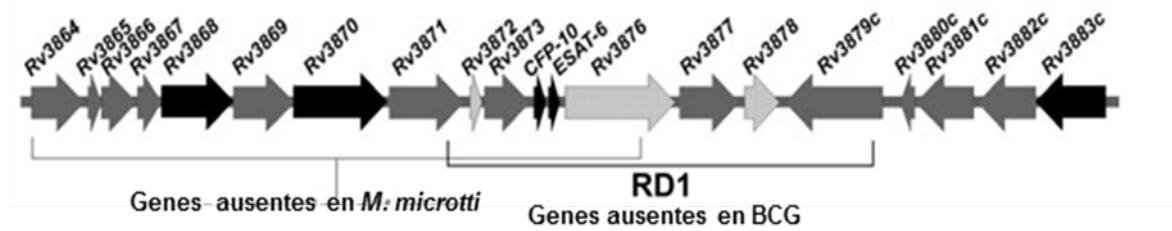


Figura 8. Descripción de la región RD1 del CMTB (Tomado y modificado de Gao *et al*, 2004).

ESAT-6 es consistentemente un importante blanco para la respuesta por células T y los genes correspondientes están sujetos a la presión selectiva impuesta por el sistema inmune del hospedero. Además de la respuesta por células T existe una fuerte respuesta por anticuerpos contra ESAT-6, recientemente encontrada en individuos infectados, primates y bovinos (Brodin *et al.*, 2004). Derrick *et al.*, (2007) presenta evidencia de que ESAT-6 puede inducir la apoptosis de una línea de macrófagos (THP-1) en humanos, por medio de la formación de poros en la membrana celular. Mientras que Hsu *et al.*, (2003) mencionan que ESAT-6 es un importante inmunomodulador que puede inducir la citólisis por la disrupción de la bicapa lipídica de las membranas.

El hecho importante es que el gen de ESAT-6 está presente y se expresa en las demás cepas de CMTB y no se encuentra en la cepa vacunal BCG, lo que la hace una candidata antigénica para el diagnóstico diferencial entre animales vacunados de los no vacunados (Vordermeyer *et al.*, 1999).

II. JUSTIFICACIÓN

Tanto el control como la erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar a la población humana el riesgo de contraerla, mejorar la productividad de los bovinos, evitar las pérdidas económicas y las restricciones a la movilización de animales, tanto nacional como internacionalmente, es por eso que a lo largo del tiempo se han ido mejorando los métodos de vigilancia, implementando así en nuestro país la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina *Mycobacterium bovis* (García *et al.*, 2005).

La situación actual de TBb dentro de los estados de la República Mexicana se encuentran en fase de erradicación con prevalencia menor al 0.50%: Baja California Sur, Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas y parte de Hidalgo. Mientras que el resto del país está como zona en control con prevalencia mayor al 2% o desconocida, con excepción de cuencas lecheras con prevalencias de 16.5% promedio como se observa en el Anexo 1 (SAGARPA 2011).

Estudios epidemiológicos sugieren que los factores de riesgo más importantes en la ocurrencia y diseminación de la tuberculosis bovina, dentro de un hato, son el número de animales infectados, la cantidad de animales susceptibles y las medidas tendientes a prevenir la diseminación. A pesar de que no todos los animales infectados transmiten la enfermedad, aquellos con cuadros respiratorios o con mastitis tuberculosa son los más infecciosos y en muchos de éstos *M. bovis* puede estar presente en orina, secreciones genitales, semen o deposiciones, lo que facilita su transmisión (Cousins, 2001; Abalos y Retamal, 2004).

Por lo anterior, es importante realizar estudios que permitan conjuntar pruebas inmunológicas, como la tuberculina y el Ensayo de Liberación de IFN- γ , para conocer la situación epidemiológica de TBb dentro de una cuenca lechera con alta prevalencia de la enfermedad. Esto permitirá promover el valor diagnóstico del IFN- γ ,

evitando el exceso de manejo de los bovinos y las pérdidas económicas que conlleva la prueba de tuberculina, permitiendo que el diagnóstico sea más efectivo, sensible y específico para el control de la enfermedad.

Asimismo es importante conocer la efectividad de los antígenos en animales susceptibles que se infectan naturalmente por la convivencia con bovinos infectados, captándolos de manera efectiva en estadios tempranos de la infección y evitando de esta manera el desarrollo de lesiones y la diseminación de la enfermedad.

III. HIPÓTESIS

La respuesta de IFN- γ a los antígenos PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6 en ganado lechero, mejorará el diagnóstico de infección en bovinos por *M bovis*, en comparación con la prueba de tuberculina.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la especificidad y sensibilidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ de los antígenos PPD bovino y ESAT-6, en bovinos sin prueba de tuberculina reciente para promover su valor diagnóstico.

4.2 Específicos

1. Estandarización del Ensayo de Liberación de IFN- γ .
2. Selección de animales reactivos positivos y negativos por medio del dictamen de la campaña y toma de muestra de sangre periférica.
3. Evaluación y análisis comparativo de los resultados de la prueba de Tuberculina con los de IFN- γ .
4. Evaluación de la especificidad y sensibilidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ y ESAT-6 en animales no sensibilizados con tuberculina recientemente.

V. METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio epidemiológico

Transversal, de tipo analítico.

5.2 Población de estudio

La cuenca lechera en la cual se realizó el estudio está constituida por aproximadamente 26,000 cabezas de ganado bovino especializado en la producción de leche, principalmente de la raza Holstein-Friesian y sus cruzas (Holstein/Jersey, Holstein/Suiza). Donde el 64% de la población eran vacas en producción, el 14% eran vacas con siete meses o más de de gestación y que no estaban produciendo leche, 6% eran vaquillas hacia su 1er. parto (>15 meses), y 16% eran becerras (<15 meses) para recría distribuidas en los 126 establos que integran al Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT).

5.3 Lugar de estudio

El CAIT, es una cuenca lechera del Estado de Hidalgo, cuenta con una superficie de 220 Has, ubicado en el municipio de Tizayuca al sur del Estado de Hidalgo, a la altura del kilómetro 57 de la carretera México-Pachuca. Geográficamente localizado a los 19°50' de latitud Norte y 98°59' de longitud Oeste; a 2,260 metros sobre el nivel del mar, con un clima templado con verano cálido y una precipitación pluvial media anual de 640 mm. Está conformada por unidades de producción lechera intensiva que en su mayoría poseen un alto nivel tecnológico, lo que permite una elevada productividad animal casi la totalidad de la rentabilidad de los establos proviene de la venta de leche.

5.4 Determinación del tamaño de muestra

La SAGARPA estima que en las cuencas lecheras de México, la prevalencia de TBb es de aproximadamente el 16% (Pérez *et al.*, 2008).

Considerando la información de la SAGARPA, se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2(pq)}{d^2}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra requerido

z = Nivel de confianza (0.95)

p = proporción en que existe el fenómeno en la población (0.16)

q = complemento (1-p) (1-0.16)

d = nivel de precisión (0.035)

Con un 95% de confianza y un poder estadístico del 80%, el tamaño mínimo de muestra es de 414 animales, con una tasa de no respuesta del 20% se necesitan muestrear por lo menos 17 animales por establo (n=517).

5.5 Estrategia de reclutamiento

Se realizaron visitas a los establos para explicar a los propietarios, la importancia de su participación en el estudio. Se incluyeron a todos los bovinos que cumplieron con los criterios de inclusión, el reclutamiento fue consecutivo, voluntario y con resultados confidenciales.

5.6 Criterio de inclusión de los bovinos

1. Bovinos de 18 meses de edad ó de 350 kg o más de peso vivo.
2. Hembras
3. Reactor a la prueba de PPD, ya sea en pliegue anocaudal, cervical simple o doble comparativa a la última prueba de la tuberculina realizada en el establo.
4. Contar con el permiso del dueño del establo para participar en el estudio

5.7 Aspectos bioéticos

A los propietarios de los establos se les solicitó el consentimiento correspondiente para el uso de sus animales en este proyecto, atendiendo los lineamientos del Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y de la UAEH (Anexos 2 y 3).

5.8 Prueba de tuberculina

Los establos por norma (NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina *Mycobacterium bovis*, DOF 08/03/1996) deben aplicar anualmente la prueba de tuberculina con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, por lo que de los dictámenes de prueba realizados en el último año se obtuvo información de los animales reactivos.

5.9 Obtención de las muestras de sangre

Se realizó la colección de muestras en un período de tiempo comprendido entre mayo a noviembre de 2010, de un total de 556 bovinos. Se colectaron aproximadamente de 5 - 8 mL de sangre de la vena caudal por cada animal que en su registro se presentaba como reactor a la prueba de tuberculina, en un tubo con heparina sódica (BD Vacutainer® Sodium Heparin, USA) como anticoagulante. Las muestras fueron identificadas con el número de arete y número de establo al cual pertenecían, después de tomar las muestras se agitaron adecuadamente en varias ocasiones para mezclar con el anticoagulante. Las muestras se transportaron al laboratorio de biología celular y molecular del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la UAEH, a temperatura ambiente y protegidas de la luz, se procesaron antes de haber transcurrido 8 horas después de la toma de muestra.

5.10 Estimulación con los antígenos PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6

5.10.1 Preparación de reactivos

Se prepararon los antígenos agregando 17 µL de PPD aviar, 17 µL de PPD bovino, 4 µg de ESAT-6 concentración final (obtenido de Statens Serum Institut – Copenhagen, Dinamarca) y 17 µL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos, Anexo 4) como control negativo, como control positivo se utilizó 1 µg de lectina *Phytolacca americana* (Pokeweed - Sigma® Chemical CO. St Luis, MO USA) como control positivo en tubos Eppendorf de 1.6 mL de capacidad. Todas las pruebas se

realizaron por duplicado. Se dispensaron 250 μ L de sangre con cada antígeno y se colocaron en un mezclador orbital (Rotator oscilatorio, Multi-purpose, Barnstead Int.) por 5 min y posteriormente se incubaron (Incubadora de CO₂, THERMO®) a 37°C de 16 a 20 horas en atmosfera húmeda.

5.10.2 Obtención del plasma con las células estimuladas

Se centrifugaron (Microcentrífuga, sorvall-*pico*, THERMO®) los tubos a 5,000 r.p.m. por 3 min, se separaron los plasmas y se colocaron en microtubos nuevos numerados de acuerdo al animal correspondiente, y se almacenaron a -4°C hasta su proceso para realizar una ELISA tipo sandwich.

5.10.3 Ensayo de Liberación de IFN- γ

Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante del equipo Bovigam® (*Mycobacterium bovis* Gamma Interferferon Test Kit for Cattle. Victoria Australia, Anexo 5), la cual se describe a continuación:

Se reconstituyeron con 2 mL de agua destilada estéril los reactivos liofilizados (conjugado, control positivo y control negativo), mientras el resto de los reactivos (placa, diluyente verde, diluyente azul y solución sustrato), junto con los plasmas se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta conseguir una temperatura uniforme de 22 \pm 5°C. Se realizó una dilución del plasma estimulado con la lectina de 1:10 (muestra – agua).

Se añadieron 50 μ L de diluyente verde a cada pozo de la placa, el plasma se mezcló al menos 4 veces y se agregaron 50 μ L de plasma en cada pozo, incluyendo los controles positivos y negativos por duplicado. Los controles se agregaron a los pozos al final. Se tapó la placa y se incubó a temperatura ambiente (22 \pm 5°C) durante 60 \pm 5 minutos, en un mezclador orbital.

Mientras se mezcló 1 parte de solución de lavado concentrada 20X con 19 partes de agua destilada.

Al terminar la primera incubación se vació la placa con cuidado para no contaminar los pozos adyacentes y se agregaron 100 μ L de solución de lavado a cada pozo y se repitió el procedimiento 6 veces. Después se colocó la placa boca abajo sobre papel absorbente limpio y se sacudió varias veces a fin de secar los pozos lo más posible.

Posteriormente, se prepararon 12 mL de diluyente azul más 120 μ L de conjugado concentrado 100X y se agregaron 100 μ L de conjugado a cada pozo, se tapó la placa e incubó durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$), en un mezclador orbital. Al finalizar la segunda incubación se lavó nuevamente 6 veces, como en la primera ocasión.

5 min antes del segundo lavado se prepararon 12 mL de buffer sustrato más 120 μ L de cromógeno y se agregaron 100 μ L de solución sustrato a cada pozo, se cubrió la placa de la luz e incubó a temperatura ambiente ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 min en un mezclador orbital. Después de 30 min se agregaron 50 μ L de solución de frenado a cada pozo, se mezcló por 2 min y se realizó la lectura de la absorbancia medida en densidades ópticas (DO) en un lector de placas de ELISA (Awareness, Stat Fax 2100[®]), utilizando un filtro de 450 nm con filtro de referencia de 630 nm y finalmente se realizó la interpretación de resultados.

5.10.4 Interpretación de resultados

Se introdujeron los datos de absorbancia de cada antígeno de las muestras analizadas a una hoja de cálculo y se realizaron los cálculos de acuerdo a como indica el manual de la prueba diagnóstica:

1. La muestra fue positiva sí:

- El valor de (DO PPD bovino – DO PBS) es ≥ 0.1
- El valor de (DO PPD bovino – DO PPD aviar) es ≥ 0.1

2. La muestra fue negativa sí:

- El valor de (DO PPD bovino – DO PBS) es < 0.1
- El valor de (DO PPD bovino – DO PPD aviar) es < 0.1

3. En el caso del antígeno ESAT-6, el punto de corte se estableció por la lectura mínima de los animales reactivos a tuberculina y la lectura máxima para los animales negativos a tuberculina, para un animal positivo entonces:

- El valor de (DO ESAT-6 – DO PBS) es ≥ 0.1

Control de calidad y validación de la prueba:

- El control negativo debe tener una densidad óptica < 0.130
- El control positivo debe tener una densidad óptica < 0.700
- En las células estimuladas con la lectina el valor debe ser ≥ 0.10

5.10.5 Bioseguridad

Durante la toma de muestras biológicas y posteriormente para su procesamiento en el laboratorio, el personal que lo realizó pudo verse expuesto a diversos organismos que son de riesgo, como *M. bovis* y otros agentes zoonóticos.

Cuando se realizó este estudio, fue muy importante tener en cuenta las prácticas y procedimientos encaminados a reducir al mínimo esos riesgos. Los procedimientos de toma de muestra y trabajo de laboratorio fueron manejados de acuerdo a los procedimientos establecidos por la legislación ambiental vigente.

Para la toma de muestras biológicas en bovinos, en todo momento se utilizó overol, botas de plástico y guantes protectores, para evitar el contacto directo o accidental con sangre y heces de los bovinos.

Para evitar accidentes y lesiones al animal y/o al personal involucrado, se ingresó al bovino la jaula de contención, la cual evitó la libertad de movimiento del bovino y

permitió coleccionar la muestra de forma segura. Se utilizó material estéril y nuevo, adecuado para realizar la flebotomía en la vena caudal de cada animal. Una vez realizados los procedimientos, los guantes y el material punzocortante se depositaron en un contenedor de polipropileno rígido de color rojo, llevado ex profeso al lugar donde se tomaron las muestras. Posteriormente, este material fue depositado en un contenedor temporal ubicado en el Laboratorio Diagnóstico en Salud Animal del CAIT, para que posteriormente la empresa MedAm S.A. de C.V. dedicada al tratamiento de los residuos peligrosos biológico infeccioso (RPBI) se los llevara y le diera el tratamiento adecuado para su disposición final, con base en la normatividad de la materia.

En el ICAP-UAEH, cuenta con un Comité de Bioseguridad, que ha elaborado manuales de procedimientos basados en la normatividad vigente y enfocados a que personal de laboratorio que participó en el estudio, realizara sus prácticas de manera adecuada y reducir los riesgos que por su trabajo pueden llegar a presentarse. La UAEH tiene contrato con la empresa MedAm S.A. de C.V para que los RPBI que se generen, se les dé el tratamiento indicado por las normas para asegurar que estén libres de peligro en su deposición final.

VI. RESULTADOS

Se estudiaron 556 bovinos de raza Holstein-Friesian, con un rango de edad de 3 a 5 años en una población aproximada de 26,000 bovinos lecheros. Participaron 25 de 126 (20%) establos. De acuerdo a los dictámenes de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, 464 (83.4%) de los animales muestreados fueron reactivos a la prueba de tuberculina ya sea por prueba ano-caudal y/o doble comparativa, 63 (11.3%) fueron negativos y en 29 (5.2%) animales no fue posible conocer el resultado de la prueba.

Se realizó el Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) con los antígenos PPD bovino y PPD aviar en los 464 bovinos reactivos a la prueba de tuberculina, 302 (65.1%) tuvieron resultado positivo al antígeno PPD bovino y 162 fueron negativos (34.9%) (**Cuadro 5, Figura 9, 10 y 11**). El Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) en los 63 bovinos con la prueba de tuberculina negativa presentaron el 100% un resultado negativo con los antígenos PPD bovino y PPD aviar (**Cuadro 5**) y ESAT-6 (**Figura 12**).

302 de los 464 bovinos fueron positivos con PPD bovino con el Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam[®]), 199 (65.9%) fueron positivos al antígeno ESAT-6, en tanto que 103 (34.1%) fueron negativos. Se encontraron 162 de 464 bovinos negativos al ensayo de Bovigam[®] estimulados con PPD bovino. (**Cuadro 6 y Figura 13**).

Los 464 bovinos reactivos a la prueba de tuberculina, fueron sometidos al Ensayo de Liberación de INF- γ con el antígeno ESAT-6. Encontramos que 216 (46.6%) fueron positivos y 248 (53.4%) negativos al antígeno ESAT-6 (**Cuadro 7 y Figura 14**). Se observó que con la estimulación con ESAT-6, 17 muestras de 162 (10.5%) muestras que habían sido negativas con PPD bovino y PPD aviar fueron positivas con ESAT-6.

La especificidad del Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam[®]) para el antígeno PPD bovino considerando un punto de corte ≥ 0.10 , es del 100%. La sensibilidad fue de 65.1% (**Figura 15**).

Cuadro 5. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]), en bovinos reactivos a la prueba de tuberculina, con antígeno PPD bovino ($n=464$).

PRUEBA	IFN-γ PPD Bovino	
	Negativo	Positivo
Tuberculina		
Negativo	63 (100%)	0 (0%)
Positivo	162 (34.9%)	302 (65.1%)

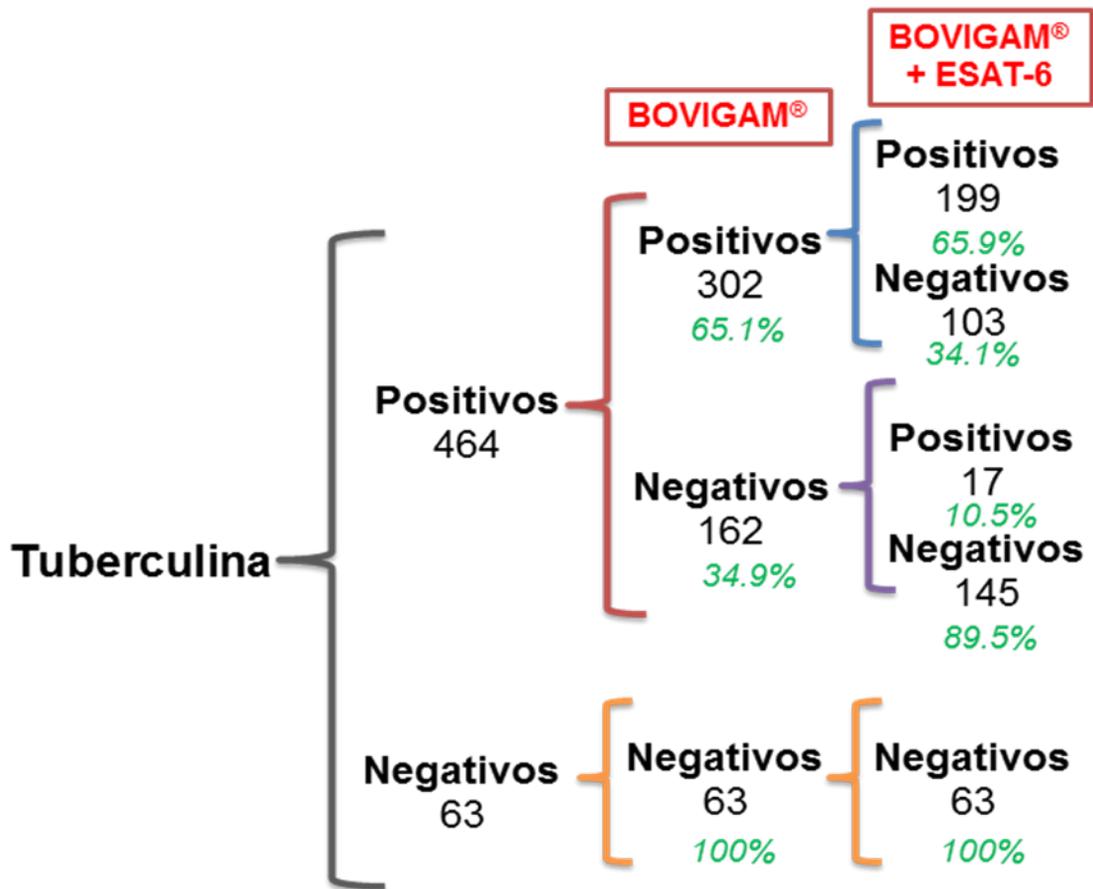


Figura 9. Esquematación de resultados del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]), a partir de la prueba de la tuberculina (n=527).

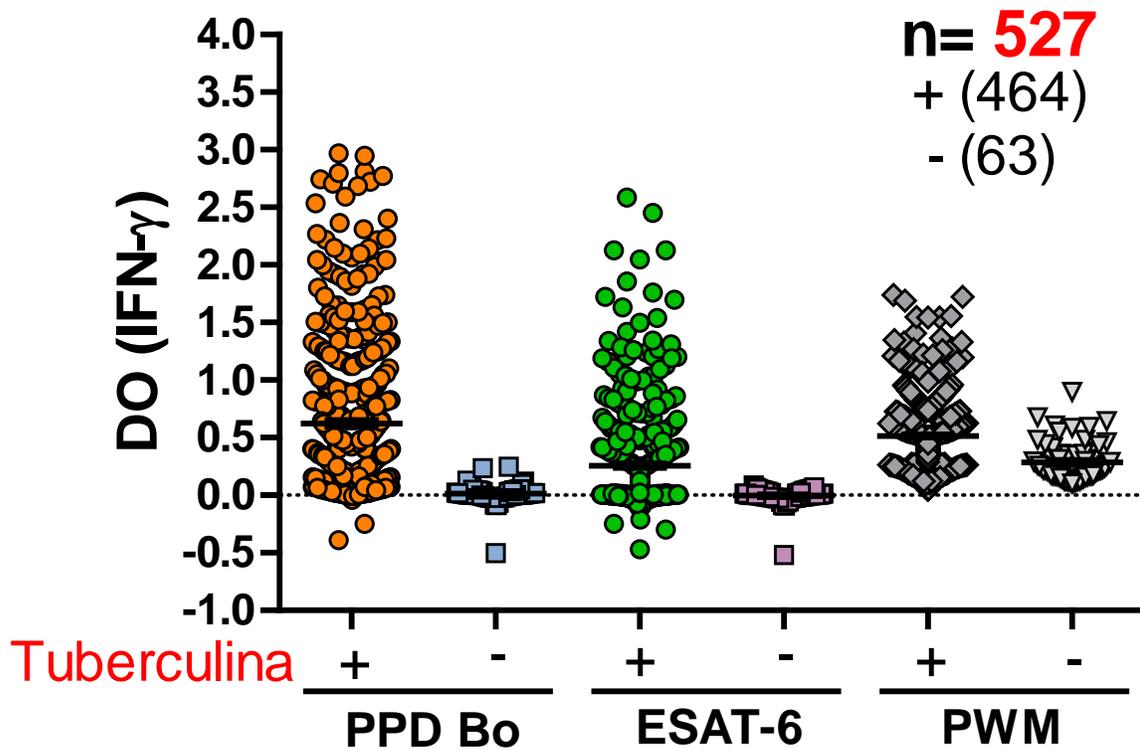


Figura 10. Gráfico del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam[®]), medido en densidades ópticas (DO), en bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de la tuberculina, con antígenos PPD-Bovino (PPDBo) y ESAT-6. La lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada como control positivo para validar el ensayo.

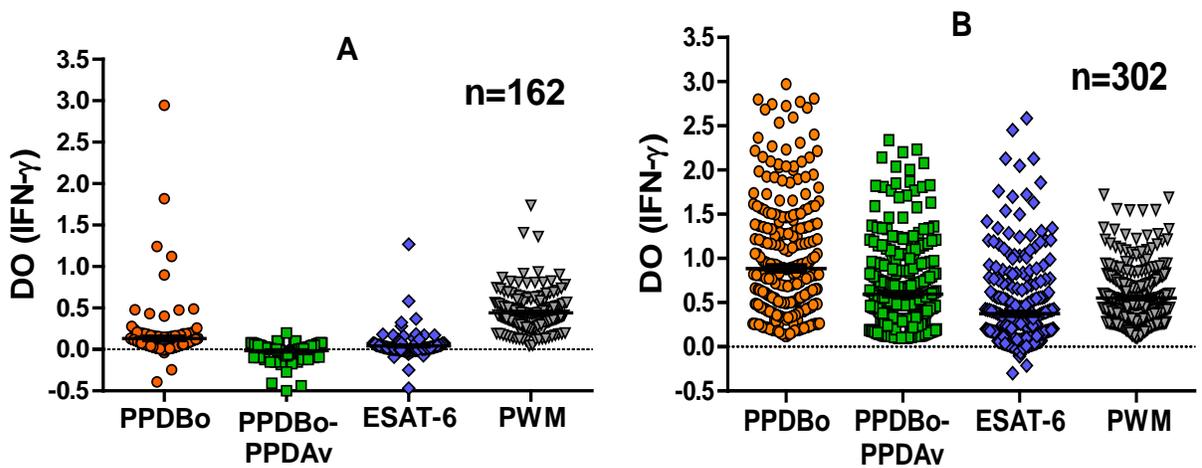


Figura 11. Gráficos del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam[®]) medido en densidades ópticas (DO), en bovinos reactivos a la prueba de la tuberculina, con antígeno PPD-bovino (PPDBo) y ESAT-6, mientras que la lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada para validar el ensayo. A) bovinos con resultados negativos a la liberación de IFN- γ con PPD bovino B) bovinos con resultado positivo a la liberación de IFN- γ con PPD bovino

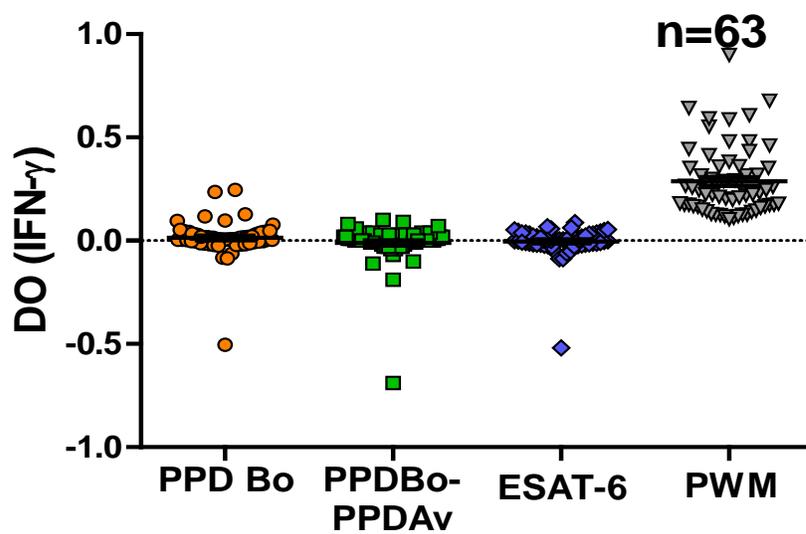


Figura 12. Gráfico del resultado del Ensayo de Liberación IFN- γ (Bovigam[®]) medido en densidades ópticas (DO), en bovinos negativos a la prueba de la tuberculina, con antígeno PPD bovino (PPDBo) y ESAT-6. La lectina Pokeweed (PWM) fue utilizada como control positivo para validar el ensayo.

Cuadro 6. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) en bovinos reactivos a tuberculina, usando el kit de Bovigam[®]/PPD bovino y Bovigam[®] más el antígeno ESAT-6 ($n=464$).

PRUEBA	IFN- γ ESAT-6	
	Negativo	Positivo
IFN- γ PPD Bovino		
Negativo	145 (89.5%)	17 (10.5%)
Positivo	103 (34.1%)	199 (65.9%)

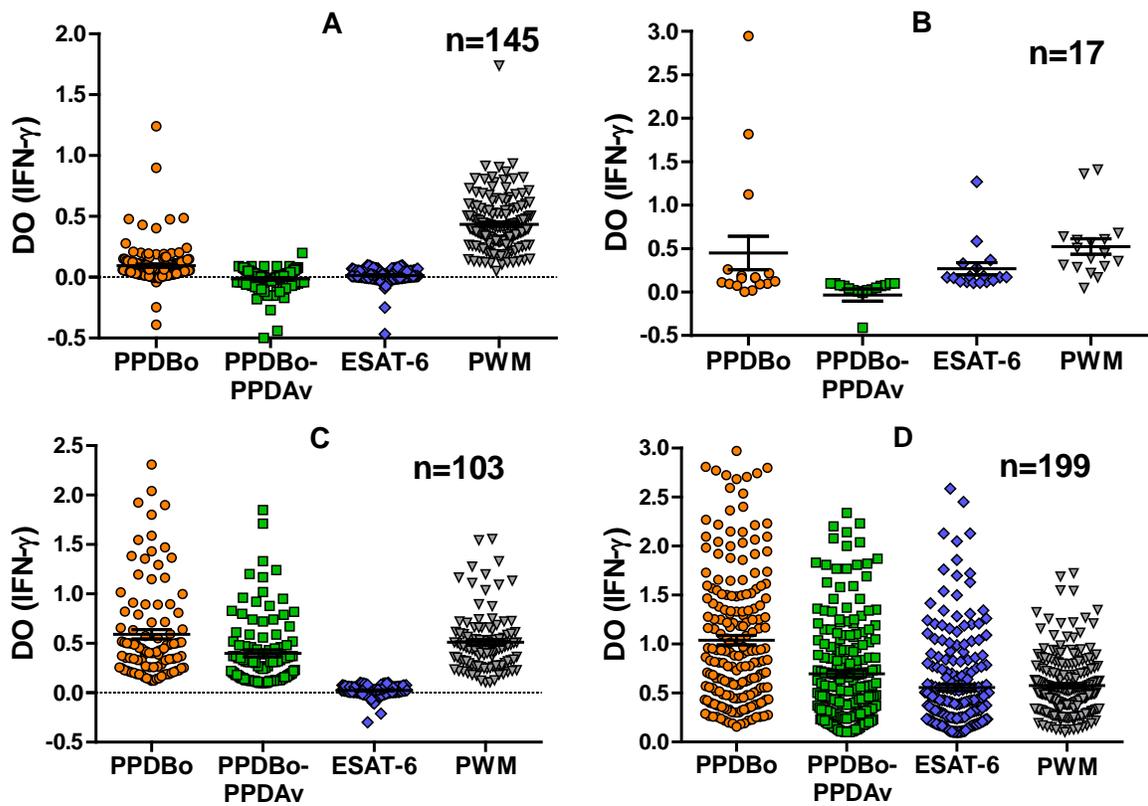


Figura 13. Resultados del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]). A) bovinos negativos a PPD bovino y ESAT-6 (n=145). B) bovinos negativos a PPD bovino y positivos a ESAT-6 (n=17). C) bovinos positivos a PPD bovino y negativos a ESAT-6 (n=103). D) bovinos positivos a PPD Bovino y ESAT-6 (n=199).

Cuadro 7. Resultado del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) en bovinos reactivos y no reactivos a la Tuberculina, usando el ensayo Bovigam[®] más ESAT-6 ($n=527$).

PRUEBA	INF- γ ESAT-6	
	Negativo	Positivo
Tuberculina		
Negativo	63 (100%)	0 (0%)
Positivo	248 (53.4%)	216 (46.6%)

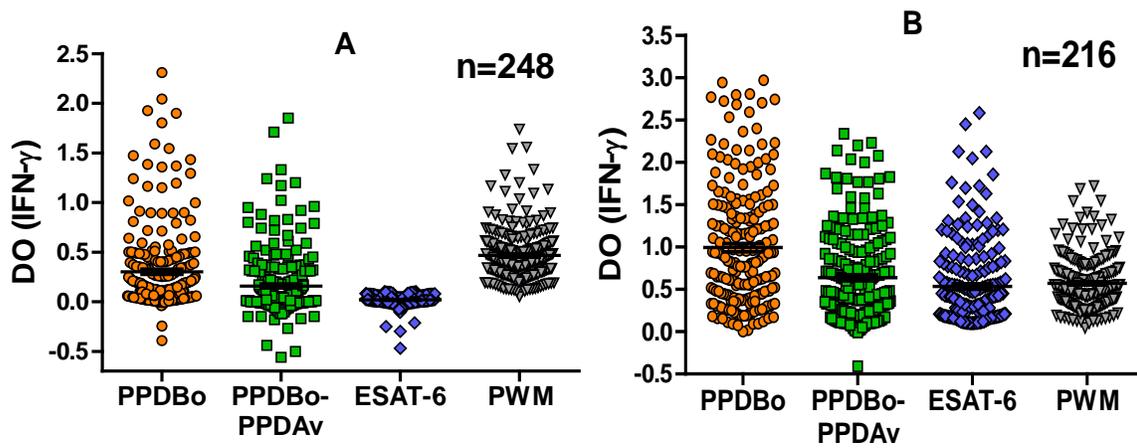


Figura 14. Resultados del Ensayo de Liberación de $\text{INF-}\gamma$ (Bovigam[®]). A) bovinos positivos a Tuberculina y negativos a ESAT-6 (n=248). B) bovinos positivos a Tuberculina y positivos a ESAT-6 (n=216).

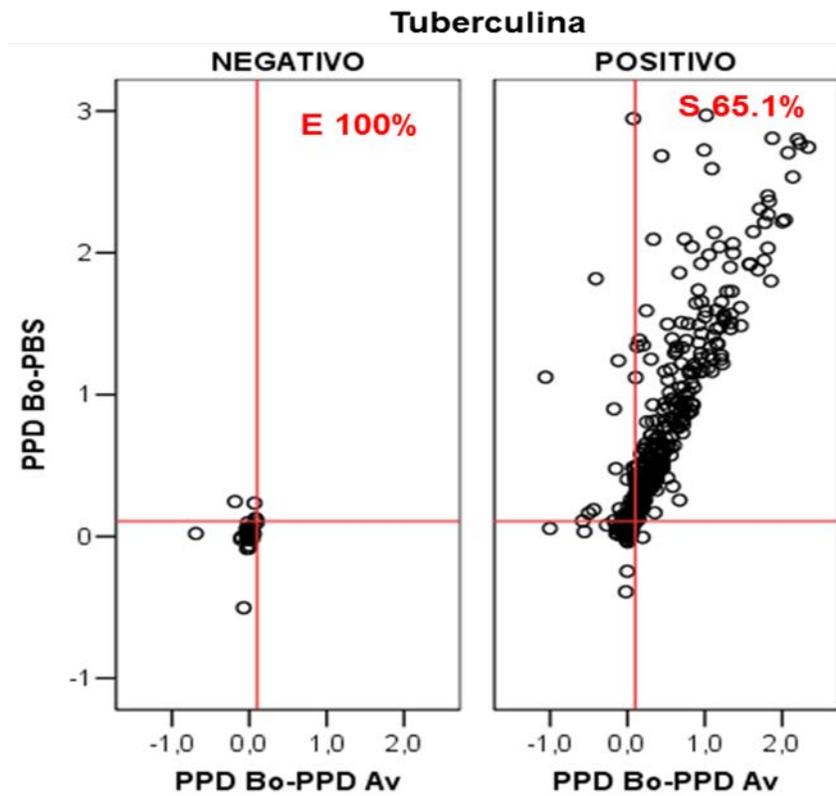


Figura 15. Gráfica de la Especificidad y Sensibilidad para los antígenos PPD bovino y PPD aviar en el Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam[®]).

La especificidad del Ensayo de Liberación de INF- γ (Bovigam[®]) para el antígeno ESAT-6, considerando un punto de corte de ≥ 0.10 , fue de 100% y la sensibilidad de 46.6% respectivamente.

VII. DISCUSIÓN

Con la finalidad de erradicar la TBb en México, como en muchos otros países, se lleva a cabo el diagnóstico presuntivo de la TBb con la prueba de tuberculina, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Esta prueba es muy laboriosa y costosa en términos generales, por lo que durante las últimas dos décadas se han puesto a prueba nuevos métodos de diagnóstico, complementarios a la prueba de tuberculina. Por tal razón, en el presente estudio se realizó el Ensayo de Liberación de IFN- γ por Bovigam[®], el cual cuantifica el IFN- γ liberado por los linfocitos que son estimulados con diversos antígenos como: PPD bovino, PPD aviar y ESAT-6. Se estudiaron 464 animales reactivos a la prueba de tuberculina, tanto caudal simple como cervical comparativa, en una cuenca lechera del Estado de Hidalgo. Se incluyeron 63 animales no reactivos a tuberculina como grupo control. Uno de los objetivos fue conocer la especificidad y sensibilidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ en bovinos sin prueba de tuberculina reciente para promover su valor diagnóstico en una cuenca lechera con alta prevalencia de tuberculosis (10.29%) tan solo de los establos inscritos a la campaña, en contraste con animales que conviven con la infección de manera natural (Torres, 2011).

De los 464 bovinos reactivos a la prueba de tuberculina, 302 (65.1%) animales resultaron ser positivos al Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) lo cual nos confirmaría que los bovinos han estado en contacto con el agente causal de la TBb y se ha levantado una respuesta inmune específica en contra, la cual es captada por medio de este ensayo *in vitro*, aportando resultados comparables con una prueba cervical (*in vivo*), debido a la utilización de antígenos similares como PPD bovino y aviar. En nuestro país, esta prueba de campo se toma como una prueba definitiva que conlleva al sacrificio de los animales reactivos, de acuerdo a la norma (Wood, 2001)

Se obtuvo 162 (34.9%) de 464 animales reactivos a la prueba de tuberculina que al realizar el Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) dieron resultados negativos a ésta, lo que concuerda con investigaciones que han reportado animales reactivos positivos a tuberculina con IFN- γ negativo. Esto puede deberse a una co-infección por micobacterias ambientales o una anergia del animal infectado, debido a que se desconoce el estado de infección de los bovinos, recordando que la respuesta inmune primaria es mediada por células y conforme la infección se hace crónica se monta una respuesta inmune mediada por anticuerpos, haciendo más difícil captar estos animales por medio de esta prueba (Pollock, 2002; Gormley *et al.*, 2004; Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Por otro lado, cuando se utilizó como antígeno ESAT-6 fueron detectados 17 bovinos más, lo que incrementó el diagnóstico de TBb en un 10.5%. Este resultado fue importante probablemente: como se mencionó con anterioridad, probablemente estos animales están reaccionando a antígenos inespecíficos de micobacterias ambientales, debido a la baja especificidad de la prueba de tuberculina, y al realizar el Ensayo de Liberación de IFN- γ resultan negativos o bien la infección es muy reciente y sólo es captada por el antígeno ESAT-6, debido a su gran especificidad por micobacterias patógenas (Pollock, 1997).

De igual forma se observaron estos resultados al someter los 302 bovinos que fueron positivos al Ensayo de Liberación de IFN- γ : al utilizar Bovigam[®] + ESAT-6 dieron positivos 199 (65.9%) a éste, lo que concuerda con algunos autores que han mencionado que la utilización de antígenos como ESAT-6 en la prueba de IFN- γ como ESAT-6 aumenta la especificidad con respecto a la prueba de tuberculina porque la región Rv3875 que codifica para este antígeno, está ausente en el genoma de la mayoría de micobacterias ambientales, pero al mismo tiempo se disminuye su sensibilidad. (Buddle *et al.*, 2003).

Por otro lado 103 de 302 bovinos positivos a tuberculina y al Ensayo de Liberación de IFN- γ y 145 de 162 bovinos positivos a tuberculina, pero negativos al Ensayo de

Liberación de IFN- γ dieron resultados negativos cuando se les estimuló con el antígeno ESAT-6. El CAIT cuenta con un amplio porcentaje de animales tuberculosos en años recientes y va en aumento, por lo que podría inferirse que estos animales podrían estar en un periodo de latencia de la enfermedad, en el que su sistema inmune estuvo activo contra la enfermedad y respondieron a la prueba de tuberculina, sin embargo al realizar el ensayo junto con el antígeno ESAT-6 no están respondiendo debido a la inactividad de su sistema inmune contra la enfermedad (Pollock, 1997; Pollock, 2002).

Los resultados de nuestro estudio muestran que el Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) posee una especificidad de 100%. Existe una gran variedad de trabajos realizados, sin embargo pocos en nuestro país como el de Aagaard *et al.*, (2006) que reportan una especificidad de 89% para el mismo ensayo. Vordermeyer *et al.*, (2006) hicieron una comparación entre un gran número de trabajos realizados alrededor del mundo, en el cual los resultados en todos los estudios están basados sobre la comparación de la respuesta al PPD bovino y aviar, donde la especificidad de la prueba de Bovigam[®] va de un rango de 87.7 a 99.2% con una media de 96.6% y un trabajo similar realizado por Schiller *et al.*, (2010) muestra una especificidad de 85 a 96.6% con una media de 96.6%. Esto indica que la especificidad del ensayo es muy buena, aun sin haber llevado a cabo una prueba de tuberculina previa, captando y reafirmando su negatividad en todos los bovinos no reactivos a la tuberculina por dictamen.

La sensibilidad del Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) en este trabajo fue de 65.1% utilizando los antígenos PPD bovino y aviar. Aagaard *et al.*, (2006) reportan una sensibilidad del 90% para el mismo ensayo. Un estudio de comparación llevado a cabo por Vordermeyer *et al.*, (2006) muestra una sensibilidad de 80.9 a 100% con una media de 88.3% para la prueba de Bovigam[®], y más recientemente Schiller *et al.*, (2010) reportan una sensibilidad de 73 a 100% con una media de 87.6%. Nuestros resultados de sensibilidad están por debajo de los obtenidos por otros autores, esto podría deberse a que los animales del estudio no tuvieron una

sensibilización preliminar con la aplicación de tuberculina, lo que resultaría en linfocitos sin un estímulo previo, haciendo que disminuya la sensibilidad del ensayo. Estudios más recientes muestran resultados similares a los anteriores con una especificidad del 97% y sensibilidad de 90% en comparación con la prueba de tuberculina, en animales de hatos sospechosos de TBb (Ozturk *et al.*, 2010).

Los resultados del ensayo de liberación de INF- γ para el antígeno ESAT-6 fueron de 100% de especificidad. Lo que concuerda con lo reportado por Agaard *et al.*, (2006) trabajo realizado en conjunto entre México, Argentina e Irlanda del Norte donde la especificidad es del 100%. Otros trabajos también muestran una especificidad de 100% (Buddle *et al.*, 2003). Se puede concluir que la especificidad del antígeno es excelente obteniendo así un alto número de animales verdaderos negativos y baja proporción de falsos positivos.

En tanto que en este trabajo la sensibilidad para el ensayo de Liberación de IFN- γ para el antígeno ESAT-6 en este trabajo fue de 46.6%, por Agaard *et al.*, (2006) dicha sensibilidad fue del 40% en México, y del 59% en Irlanda. Otro trabajo muestra una sensibilidad del 84% utilizando el mismo antígeno (Buddle *et al.*, 2003). De manera general, la sensibilidad se muestra por debajo de la especificidad, dejando una mínima proporción de falsos negativos, que en términos de infección por *M. bovis* representan aún un riesgo para la demás población susceptible; en este contexto la utilización de otros antígenos que aumenten la sensibilidad del ensayo serían de buena utilidad, sin dejar de lado a ESAT-6 por su alta especificidad.

La diferencia entre especificidad y sensibilidad puede deberse a que existen variables en la estandarización de la prueba, por ejemplo, los diferentes puntos de corte que se pueden manejar, la validación de los controles, la interpretación de éstos, las condiciones de la toma de muestras, la estimulación de las mismas, la concentración de los antígenos, así como la prevalencia de la enfermedad en los establos en los que se llevan a cabo los estudios (Schiller *et al.*, 2010).

VIII. CONCLUSIONES

El Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) posee una alta especificidad y mediana sensibilidad, en animales sin prueba reciente de tuberculina, siendo una prueba diagnóstica confiable.

El Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) podría ser utilizado en aquellas zonas donde la prevalencia de la enfermedad es baja, utilizando el antígeno ESAT-6, el cual aumenta la especificidad de la prueba y aumenta la posibilidad de tener animales verdaderos negativos.

Esta es una prueba fácil de llevar a cabo, que no requiere de una segunda prueba, no se necesita una segunda visita al establo.

IX. PERSPECTIVAS

El Ensayo de Liberación de IFN- γ (Bovigam[®]) puede ser implementado en programas de erradicación como una prueba alternativa a la de tuberculina.

Es necesario ensayar otros antígenos con Bovigam[®] para incrementar la sensibilidad de esta prueba.

Se recomienda realizar pruebas en campo con tuberculina complementada con ESAT-6, para incrementar la especificidad de esta prueba y aumentar el número de animales verdaderos positivos.

Es necesario que dentro de los programas de erradicación en zonas donde la enfermedad sea persistente, se necesite de una alta sensibilidad y se tolere una baja especificidad.

X. REFERENCIAS

- Abalos, P. y Retamal, P. (2004). Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 23 (2): 583-594
- Acha, P.N., Szyfres, B. (2007). Zoonotic tuberculosis. In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animal. 2da Ed. Washington: Pan American Health Organization/World Health Organization; Scientific Publication. 503: 266-280.
- Acosta, S.R., Estrada, C.C., Milán, S.F. (2009). Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión. Tec. Pec. Méx. 47(4): 389-412.
- Adam, L.G. (2001). *In vivo* and *in vitro* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20: 304-324.
- Agaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A.J., Gutierrez-Pabello, J.A., Suarez-Güemes, F., McNair, J., Cataldi, A., Espítia, C., Andersen, P. and Pollock, J.M. (2006). Optimizing Antigen Cocktail for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herd with Different Prevalence of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixtures Shows Optimal Sensitivity and Specificity. J. Clin. Microbiol. 4326-4335.
- Alcaide, F., Esteban, J., González, J., Palacios, J.J. Micobacterias. En: Cercenado, E., Cantón, R. (2005). Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9.ª Ed. Madrid: SEIMC.
- Andersen, P., Munk, M.E., Pollock, J.M., Doherty, T.M. (2000). Specific immune-bases diagnosis of tuberculosis. The Lancet 356: 1099-104.
- Anon. (2008). Bovine Tuberculosis. Diagnostic techniques. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.4.7., 686–689.
- Anon. (2010). DEFRA: breakdown of bovine TB expenditure from the England bTB programme budget: 1998/99 – 2008/Disponibile en: <http://www.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/expenditure-stats.pdf> (consultado en enero de 2010).
- Aranaz, A., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L. (1996) Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 34(11):2734-2740.
- Bovine Tuberculosis. Disponible en:http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf. The enter for Food Security and Public Health. Consultado en 2010.

- Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S.T., y Brosch, R. (2004). ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? Trends. Microbiol. 12: 500–508.
- Buddle, B.M., McCarthy, A.R., Ryan, T.J., Pollock, J.M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Andersen, P., de Lisle, G.W. (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. Vet. Rec. 153, 615–620
- Carroll, M.C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. Annu. Rev. Immunol. 16:545-568.
- Cassidy, J.P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet. Microbiol. 112: 151-161.
- Coad, M., Clifford, D., Rhodes, S.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., and Whelan, A.O. (2010). Repeat tuberculin skin testing leads to desensitization in naturally infected tuberculosis cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. Vet. Res. 4: 14.
- Collins, J.D. (1983). Abattoir associated zoonoses. J. Soc. Occup. Med. 33:24–7.
- Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., Orme, I.M. (1993). Disseminated tuberculosis in interferon- γ gene-depleted mice. J. Exp. Med. 178: 2243–7.
- Corner, L. A. (1994). *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40:53–63.
- Corner, L.A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet. Microbiol. 112: 303–312.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Ravignole, M.C., Fujikura, T., Cousin, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., de Kantor, I., Meslin F.X. (1998). Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. Emerging Infectious Diseases. 4: 59-70.
- Cousins, D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev. Sci. Tech. 20: 71-85.
- Daborn, C.J., Grange, J.M. (1993). HIVAIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. Br. Vet. J. 149: 405-417.
- De Lisle, G., Mackintosh, C. y Bengism R. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20: 86-111.

- Derrick, S.C., Morris, S.L. (2007). The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cellular Microbiology*. 9(6): 1547-55.
- Dietrich, J., Weldingh, K., y Andersen, P. (2006). Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 112: 163-169.
- Estrada, C.C., Mancilla, R., Arriaga, D.C., Otero, D.F. (2001). Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet. Méx.* 32(3): 207-211.
- Estrada, C.C., Díaz, O.F., Arriaga, D.C., Villegas, S.N., Pérez, G.R., González, S.D. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Vet. Mex.* 35:3.
- Flynn, J. and Chan, J. (2001). Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19:93-129.
- Gao, L.Y., Guo, S., McLaughlin, B., Morisaki, H., Engel, J.N., Brown, E.J. (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Molecular Microbiology*. 53(6): 1677-93.
- García, C.L, Milian, S.F., Anaya, E.A.M. Situación de la tuberculosis bovina en México 1990-2004. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. Memorias de XXXIX Congreso Nacional de Buiatría 2005. 11-13 de agosto de 2005. Puebla (Puebla) México. Asociación Mexicana de Medicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.
- Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S. (2001). Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81:23-41.
- Gormley, E., Doyle, M.B., McGill, K., Costello, E., Good, M., Collins, J.D. (2004). The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 102: 413-420.
- Grange, J.M., Thoen, O.C. (1995). Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection Part 1. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Steele, H. J. Iowa State University Press/Ames. Pag. 29-46.
- Gutiérrez, P.JA. (2010). Citocinas, en Inmunología veterinaria. 1a. Ed. México: Manual Moderno. pp. 77-88.
- Gyles, C.L., Prescott, F. J., Songer, G., Thoen, O. C. (2004). *Mycobacterium*. En Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals 3a. Ed. E.U.A. Wiley-Blackwell pp. 113-132.
- Hett, E.C. and Rubin, E.J. (2008). Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 72: 126-156.

- Howard GJ, Francis TJ. (1983). El género *Mycobacterium*, de Hagan y Bruner Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4ª Ed. México: Prensa Médica Mexicana, pp. 228-59.
- Hsu, T., Hingley-Wilson, S.M., Chen, B., Chen, M., Dai, A.Z., Morin, P.M. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A 100: 12420-12425.
- Jackett, P.S., Bothamley, G.H., Batra, H.V., Mistry, A., Young, D.B., Ivanyi, J. (1988). Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 26: 2313-8.
- Jiménez, V.I.N. (2011). Atlas Multimedia de la Lesión de Tuberculosis en Aparatos y Sistemas del Ganado Bovino Lechero. Tesis de Licenciatura. Ciudad Universitaria. Distrito Federal, México: FMVZ UNAM. En prensa.
- Jones, G.J., Gordon, S.V., Hewinson, R.G, Vordermeier, H.M. (2010). Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* reveals the immunodominance of the ESAT-6 protein family. Infection and immunity. 50: 1326-1332.
- Lightbody, K.A., Skuce, R.A., Neill, S.D., Pollock, J.M. (1998). Mycobacterial antigen-specific antibody responses in bovine tuberculosis: an ELISA with potential to confirm disease status. Vet. Rec. 142: 295-300.
- Lütcher FJ. (2004). Enfermedades Infecciosas de los Rumiantes. 1ª Ed. del autor. Argentina. pp. 123-136.
- Lyashchenko, K. Pollock, J. Colengeli, R. Gennaro, M. (1998). Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. Immune. 66: 5344-5349.
- McGavin, D.M. y Zachary, F.J. (2007). Pathologic basis of veterinary disease. 4ª Ed. E.U.A: Mosby/Elsevier. pp. 221-226.
- McNair, J. Corbett, D.M. Girvin, R.M. Mackie, D.P. Pollock, J.M. (2001). Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB 83 is an early target with diagnostic potential. Scand. J. Immunol. 53, 365-371.
- Medeiros, S.L., Marassi, D.C., Figueiredo, E.E. S., Lilenbaum, W. (2010). Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. Braz J Microbiology. Vol 41: 531-541.
- Método de ELISA – Sandwich. *Telmeds.org* [publicada en línea]. 2009(07). Disponible en: <http://www.telmeds.org/articulos/metodo-de-elisa-sandwich/>. Consultado 27 de ene de 2011.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F. y Quinn, P.J. (1994). The tuberculin test. Vet. Microbiol. 40: 111-124.

- Mustafa, A.S. (2002). Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Mol. Immunol.* 39:113-119.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J. y Hanna, J. (1991). A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet. Microbiol.* 28: 103-109.
- Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock, J.M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis.* 81(1/2): 79-86.
- Norma Oficial Mexicana. Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*), NOM-031-ZOO-1995. Diario oficial marzo de 1996. Disponible en: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/doc468/2004>. Consultado en abril de 2011.
- North, R.J., Jung, Y.J. (2004). Immunity to Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 599-623.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease.* 76: 1-46.
- OIE. World Organization for Animal Health. (2009). Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.07_BOVIN_E_TB.pdf. Consultado en abril de 2011.
- Okkels, L.M. (2003). PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: Strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. *Infect. Immun.* 71: 6116-6123
- Osturk, D., Pehlivanoglu, F., Kale, M., Tok, A.A., Guldali, Y., Turutoglu, H. (2010). In vitro Diagnosis of Bovine Tuberculosis by γ -Interferon Assay. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. Short Communication.*
- Pai, M. (2005). Alternatives to the tuberculin skin test: interferon-gamma assays in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian. J. Med. Microbiol* 23: 151-158.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., y Lyashchenko, K.P. (2006). Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine. Immunol.* 13: 387-394.
- Parra, A. García, N. García, A. Lacombe, A. Moreno, F. Freire, F. Moran, J. Hermosa de Mendoza, J. (2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 127: (3-4), 315-324.
- Pérez, G.R., Milían, S.F., Arriaga, D.C., Romero T.C., Escartín, C.M. (2008). Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro México. *Salud Pública de México.* 50(4): 286-91.

- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res. Vet. Sci. 74: 1-15.
- Pollock, J. M., y Andersen, P. (1997). The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. J. Infect. Dis. 175: 1251-1254.
- Pollock, M.J. y Andersen, P. (1997). Predominant Recognition of the ESAT-6 Protein in the First Phase of Infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. Infection and Immunity. 2587-2592.
- Pollock, J.M., Neill, S.D. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet. J. 163: 115-127.
- Pollock, J.M., Welsh, M.D. y McNair, J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: towards new strategies for the diagnosis and control of disease. Vet. Immunol. Immunopathol. 108: 37-43.
- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D., McNair, J. (2006). Pathogenesis of the tuberculosis: The role of experimental models of infection. Vet. Microbiol. 112: 141-150.
- Pritchard D.G. (1988). A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. J. Comp. Pathol. 99(4): 357-399.
- Ramírez, P.L. (2011). Diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina en ganado lechero del complejo agropecuario e industrial de Tizayuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. UAEH. México.
- Raviglione, M.C., Snider, D.E., Kochi, A. (1995). Global epidemiology of tuberculosis. JAMA. 273: 220-6.
- Renshaw, P.S., Panagiotidou, P., Whelan, A., Gordon, S.V., Gewinson, R.G., Williamson, R.A., y Carr, M.D. (2002). Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6-CFP-10 complex. J Biol Chem 277: 21598-21603.
- Ritacco, V., Lopez, B., De Kantor, I.N., Barrera, L., Errico, F., Nader, A. (1991). Reciprocal cellular and humoral immune-responses in bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci. 50: 365-7.
- Romero, T., Arriaga, D., Guevara, V., García, S., Torres, L. y Estrada, C. (2006). Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en in hato lechero. Vet. Mex. 37: 137-143.
- Roring, S. Hughes, M.S. Skuce, R.A. Neill, S.D. (2000). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. Vet. Microbiol. 74:(3), 227- 236.

- Rua-Domenech, R, Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S. (2006). *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81: 190-210.
- Runyon, E.H. (1970). Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *Am. J. Clin. Path.* 54: 578-586.
- Ryan, T.J., Buddle y De Lisle, G.W. (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res. Vet. Sci.* 69: 57-61.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H. M., Palmer, M. V., Harris, B.N., Orloski, N. A., Buddle, B. M., Thacker T. C., Lyashchenko K. P. y Waters W. R. (2010). Bovine Tuberculosis: A review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases.* 57: 205-220.
- Schiller, I., Vordermeier, H.M., Waters, W.R., Whelan, A., Coad, M., Gormley, E., Buddle, B.M., Palmer, M.V., Thacker, T.C., McNair, J., Welsh, M., Hewinson, R.G., Oesch, B. (2010). Bovine tuberculosis: effect of tuberculin skin test on *in vitro* interferon gamma responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136: 1-11.
- Secretaría de Salud. (2006). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Disponible en: <http://www.socmexped.org.mx/avisos/estandaresfinal.pdf>. Consultado en julio de 2011.
- Skuce, R.A., Brittain, D., Hughes, M.S. and Neill, S.D. (1996). Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2469-2474.
- Stanchi NO, Martino PE, Gentilina E, Reinoso EH, Echeverrá MG, Leardini NA, Copes JA. (2007). Micobacterias en: *Microbiología Veterinaria*. 1^a Ed. Argentina: Inter-médica. pp. 300-306.
- Steele, J.H. (1995). Regional and Country Status Report. In: Thoen, C.O., y J.H. Steele (Eds), *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa Press. pp. 169-172.
- Teixeira, H.C., Abramo, C., Munk, M.E. (2007). Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J. Bras. Pneumol.* 33(3): 323-334.
- Torres, M.X. (2011). Modelo de análisis de riesgo de la tuberculosis bovina en establos del complejo agropecuario e industrial de Tizayuca, Hidalgo. Tesis de Maestría. Departamento de Salud Pública y Medicina Preventiva. UNAM. México.

- Trejo, M., Gorociaca, P., Porras, F., Chavez, R., Lascurain, R., Zenteno, E. (2003). Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos. Revista de instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 16: 41-7.
- Trigo, F. (1996). Patología sistémica Veterinaria 3ª. Ed. México McGraw-Hill Internacional. pp: 72-73.
- Vadillo, M.S, Píriz, D.S, Mateos Y.E.M. (2002). Género *Mycobacterium* Manual de microbiología Veterinaria. 2ª. Ed. España: McGraw-Hill/Interamericana. pp: 507-518.
- Vordermeier, H.M., Cockle, P.J., Whelan, A., Rhodes, S., Palmer, N., Bakker, D., Hewinson, R.G. (1999). Development of diagnostic reagent to differentiate between *Mycoacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 6(5): 675-82.
- Vordermeyer, M. y Ewer, K. (2006). Specificity trial of the BOVIGAM® IFN-gamma test in GB cattle. Veterinary Laboratories Agency. pp: 1-29.
- Wards, B. J., Collins, D.M. y Lisle, G.W. (1995). Detection of *Mycobacterium bovis* in tissue by polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 43: 227-240.
- Welsh, M.D. Cunningham, R.T. Corbett, D.M. Girvin, R.M. McNair, J. Skuce, R.A. Bryson, D.G. Pollock, J.M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology. 114 (1): 101-111.
- Whelan, A., Clifford, D., Upadhyay, B., Breadon, E.L., McNair, J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M. (2010). Development of a DIVA Skin-Test 1 for bovine tuberculosis. 48(9): 3176-81.
- Wood, P.R., Comer, L.A. and Plackett, P. (1990). Development of a simple, rapid *in vitro* cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. Res. Vet. Sci. 49 (1): 46-49.
- Wood, P.R. and Jones, S.L. (2001). BOVIGAM®: an *in vitro* cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Harcourt Publishers Ltd. 81: 147-155.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Mapa sobre la situación zoonosanitaria actual de la TBb en México (SAGARPA, 2011).



ANEXO 2. Lineamientos generales en la revisión de protocolos de experimentación en donde se utilizan animales (AMCAL, 2006).

PRINCIPIOS BÁSICOS

- ✓ La adquisición, el transporte, el cuidado y el uso de los animales de experimentación debe acatar la legislación mexicana aplicable.
- ✓ Siempre que sea posible se reemplazara a los animales por el empleo de métodos o sistemas que no los requieran.
- ✓ Los procedimientos que involucran animales deberán diseñarse y llevarse a cabo con plena seguridad de su aplicabilidad a la salud del hombre o los animales, la generación de conocimiento y/o bienestar de la sociedad.
- ✓ Las especies animales empleadas en una experimentación debe seleccionarse con base a sus características para lograr el fin propuesto, y el número de

animales usado será el mínimo necesario, determinado por las pruebas estadísticas aplicables.

- ✓ Todos los procedimientos para el uso experimental y el cuidado de los animales debe evitar o reducir a un mínimo la incomodidad, la angustia y el dolor. Y ser compatibles con las prácticas científicas correctas.
- ✓ Los procedimientos que causen a los animales dolor o sufrimiento físico que no sea momentáneo o leve debe realizarse bajo sedación, analgesia o anestesia adecuada. Los procedimientos dolorosos no deberán llevarse a cabo en animales conscientes, sensibles o paralizados por agentes químicos.
- ✓ A los animales que padezcan dolor intenso o crónico, sufrimiento físico que no pueda ser aliviado durante el experimento, se les aplicara eutanasia.
- ✓ Las condiciones de vida que se brinden a los animales deben ser las adecuadas para la especie en cuestión, y promover su salud y bienestar. El alojamiento, la alimentación, el manejo y el cuidado de los animales deben estar a cargo de un Médico Veterinario Zootecnista acreditado en la especialidad de animales de laboratorio.
- ✓ Todas las personas involucradas en el cuidado y uso de animales deberán estar calificadas y poseer experiencia para llevar a cabo procedimientos en animales vivos. El personal técnico deberá tener capacitación certificada.
- ✓ Cuando sea necesario la exención del cumplimiento de uno o varios de estos principios, la decisión deberá recaer en el Comité Institucional de Ética.

PRINCIPIOS ESPECÍFICOS

- ✓ Posibilitar el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta, refugio o escape.
- ✓ Lograr la seguridad del confinamiento, evitando su escape o fuga, la penetración de otros animales, la exposición a daños y la ausencia de peligros.
- ✓ Las áreas de alojamiento de los animales deben de ser específicas para éste propósito y responder a los requerimientos establecidos para la actividad de que se trate.

- ✓ Se deben lograr los objetivos del experimento, ensayo o validación con el mínimo de variables de tiempo y de animales.
- ✓ El avance de los conocimientos biológicos y el desarrollo de los mejores para la protección de la salud y el bienestar, tanto del hombre como de los animales, requieren del empleo de animales vivos intactos para la experimentación.
- ✓ El hombre tiene la necesidad de utilizar animales en la búsqueda del conocimiento humano igual que para alimentarse, vestirse y trabajar. De ahí el deber de respetar al animal, ser viviente común y auxiliar de él.
- ✓ Toda persona que reproduzca o emplee los animales con fines experimentales debe tener presente que están dotados de sensibilidad y memoria, que son susceptibles al dolor y al sufrimiento y que la experimentación requiere ante todo el bienestar y protección de animal para obtener resultados válidos.
- ✓ Los sistemas matemáticos (modelos de análisis, computación y realidad virtual), los métodos microbiológicos, el análisis químico, el cultivo de células, tejidos y órganos, el uso de plantea e invertebrados, la investigación epidemiológica y la investigación controlada en humanos, deben ser utilizados cuando sean apropiados y aceptados en la disminución del número de los animales de experimentación o la sustitución de éstos.
- ✓ Las experiencias concernientes a los animales vivos y la extracción órganos, tejidos o células, a sujetos vivos con fines de investigación u otros deben ser realizadas por un profesional calificado o bajo su control directo. Los propósitos, la selección y las condiciones de mantenimiento de los animales en experimentación deben ser controladas por personal autorizado o competente.
- ✓ Todas las personas vinculadas a la cría, transporte, recepción y uso de los animales de laboratorio deben tener en cuenta los procedimientos que disminuyan el stress o la angustia, el distres y el empeoramiento del estado higiénico sanitario original, de tal forma que permita una rápida readaptación del animal para la experimentación y se observe su debida protección.
- ✓ Se deben emplear anestésico, analgésico o sedantes, para lograr la disminución o alivio del dolor y el sufrimiento; a menos que esto sea contrario a los objetivos

del estudio. En esta última situación, se permitirá solamente la más breve duración de dolor, debiendo ser aliviado posteriormente.

- ✓ Si antes, durante o después del uso, o cuando se considere apropiado, los animales sufrieran dolor crónico o severo, molestias, sufrimiento, daños o invalidez, que no puedan ser aliviados, estos deberán ser sacrificados por métodos aceptados por la ética y sin dolor (eutanasia).
- ✓ Los procedimientos invasivos, múltiples o dolorosos sobre un animal con fines de instrucción a estudiantes, o para la demostración de conocimientos científicos establecidos, o la utilización de animales en exposiciones o eventos, no justifican su utilización. Técnicas alternativas o audiovisuales deben ser empleadas para conducir tal información o instrucción.
- ✓ Por las razones éticas antes expuestas, unido al elevado valor económico de su reproducción y uso, en los estudiantes de laboratorio debe existir una probabilidad razonable de que los mismos contribuyan de manera importante a la adquisición de conocimientos que resultaran eventualmente en la mejora de la salud del hombre, animales y de las plantas.

ANEXO 3. Lineamientos generales en la revisión de protocolos de experimentación en donde se utilizan animales.

Fuente: CCAC Guidelines on: Animal Use Protocol Review (1997)
CCAC (Canadian Council on Animal Care)

Los siguientes lineamientos para la revisión del protocolo son brindados para ayudar a los miembros del CICUAE y a los investigadores en la obtención de una completa y precisa descripción del uso de animales propuesto. Como documento definitivo, el protocolo aprobado debería sustentar las premisas sobre las cuales está basada la revisión objetiva del uso de animales en la ciencia:

- ✓ Que el uso de animales en la investigación, enseñanza y constatación es aceptable solo si promete contribuir al entendimiento de principios o aspectos del

ambiente, principios biológicos fundamentales, o al desarrollo del conocimiento que de manera razonable se espere sea de beneficio para los humanos, animales o al medio ambiente.

- ✓ Que el alcanzar los estándares óptimos de cuidado y salud animal, resulte en credibilidad y reproducibilidad adecuada de los resultados experimentales.
- ✓ Que la aceptación del uso de animales en la investigación básica o aplicada depende sustancialmente de la afirmación general de la confianza en los mecanismos y procesos utilizados, lo cual asegura forzosamente, el uso humanitario y justificado de los animales.
- ✓ Que los animales deberán ser usados solo si los esfuerzos de los investigadores han fallado para encontrar una alternativa. También son requisitos, un continuo intercambio de conocimiento, revisión de la literatura y adhesión a las **Tres R's de Russell y Burch**. Aquellos que utilizan animales deberán emplear los métodos más humanitarios sobre el menor número de animales, la especie adecuada y requerida para obtener información válida.

1. PRINCIPIOS GENERALES

Los siguientes son principios generales para la revisión del protocolo. Cada comité, tiene una responsabilidad ética, científica y social para aplicar un criterio de revisión y aprobación de un protocolo de manera justa, equitativa y consistente. Esto requiere la entrega de una completa y apropiada información por el investigador. **Sin embargo, no todos los protocolos requieren el mismo nivel de revisión: la intensidad de la revisión deberá variar directamente con el nivel de intervención (grado de invasividad) de los procedimientos (de acuerdo a las categorías). Los protocolos que involucran distrés físico, psicológico o ambos (dolor, miedo) deben ser revisados completamente y requieren una fuerte justificación que esté claramente sustentada por el conocimiento actual del problema a investigar.**

Todos los aspectos del proceso de revisión del protocolo, incluyendo el estado de aprobación, correcciones, aclaraciones, modificaciones, y arreglos, deben ser documentados, sin importar la categoría de intervención.

Se debe aportar un resumen de los propósitos primarios y del uso propuesto de animales en un lenguaje comprensible para una persona lego en la materia. Esto deberá incluir una descripción de los procedimientos diseñados para asegurar que el sufrimiento de los animales será evitado o al menos minimizado. El sometimiento a revisión de secciones con propuestas que contienen detalles excesivos de procedimientos no relacionados al uso de los animales es inadecuado, pero puede ser útil si se relaciona al mérito científico o al análisis estadístico. Los miembros del comité deberán pedir a los investigadores que aporten todas las descripciones con un mínimo de palabras técnicas: **el comité está interesado primeramente en el uso responsable y humanitario de los animales.**

Cada protocolo debe ser revisado periódicamente, si es el caso, y deben considerarse cambios en estándares y lineamientos, y nuevas propuestas en el reemplazo, reducción y refinamiento del uso experimental de los animales. La renovación y/o cambios de los proyectos de investigación, deberá permitir a los comités revisar las modificaciones propuestas al protocolo original, si las hay, y la justificación para los cambios. Las principales modificaciones, incluyendo cambios en las especies animales, categoría de intervención, la naturaleza del (los) procedimiento(s) invasivo (s) o cambios significativos en el uso de anestésicos/analgésicos deben ser sometidos al mismo nivel de revisión y cumplir con los requisitos, tal como si fuera una nueva solicitud. Todas las modificaciones deben estar aprobadas y documentadas por el comité antes de que el investigador inicie el experimento. El comité no deberá revisar un protocolo más de tres veces, después de lo cual, el protocolo debe ser rediseñado y sometido a un nuevo proceso.

Un miembro conocedor del proyecto de investigación (en este caso el secretario del comité), debe estar disponible para contactarlo las veces necesarias. Los requisitos

para los permisos de estudios en vida silvestre, uso de compuestos radioactivos, riesgo biológico y otras circunstancias especiales se deben reportar en el protocolo. **Generalmente, las copias de los permisos y licencias necesarias deberán acompañar al protocolo y ser presentadas ante el comité antes de que el proyecto comience.**

2. BENEFICIO POTENCIAL DE LA INVESTIGACIÓN

Se requieren declaraciones claras sobre el propósito (objetivos científicos específicos) y el valor potencial del estudio (originalidad e importancia de la nueva información)

La información aportada dentro del formato-protocolo a revisión, deberá brindar al comité, con un claro sentido la necesidad del proyecto experimental y la relación entre el experimento propuesto y el objetivo general.

Los proyectos aprobados y financiados por algunas agencias u organizaciones, o de fondos internos y que hayan sido revisados por una comisión *ad hoc* pueden someterse a una revisión breve y no profunda.

3. ALTERNATIVAS DE REEMPLAZO AL USO DE ANIMALES

Si los objetivos científicos del estudio pueden llevarse a cabo con la utilización de modelos animales inferiores o no animales, el comité debe requerir del investigador que considere la alternativa. La ausencia de alternativas deben sostenerse con una breve descripción de los métodos y las fuentes utilizadas para determinar que las alternativas no están disponibles o no son viables, y/o una explicación de los aspectos del protocolo que excluye la utilización de modelos no animales o animales inferiores.

4. SELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

Deben ser descritas las características del modelo animal que hacen a la especie o cepa la apropiada para el estudio. Esto podría incluir características anatómicas, fisiológicas, de comportamiento, bioquímicas u otras consideraciones;

las cuales hagan al modelo, compatible con los objetivos de la investigación. Normalmente los costos no son una consideración primaria.

5. REDUCCIÓN DEL USO Y NÚMERO DE ANIMALES

La información aportada debe incluir una clara descripción del diseño experimental junto con la explicación estadística que sostenga el tamaño de la muestra, de los grupos experimentales y de control. Se puede recomendar un estudio piloto, particularmente cuando se requieran grandes cantidades de animales para un nuevo estudio, así como solicitar datos que permitan una mayor veracidad en la evaluación del grado de invasión del procedimiento y del número de animales requerido. Generalmente, el número de animales a utilizar deberá optimizarse hasta el más alto grado posible, consistente con los estándares razonables científicos y estadísticos.

6. REFINAMIENTO DE LA TÉCNICA EXPERIMENTAL.

Una vez que ha sido determinado que el uso de animales es necesario y hay una justificación apropiada del número requerido, el comité y el investigador tienen una responsabilidad compartida para asegurar que las prácticas de crianza y procedimientos experimentales empleados, minimizan o eliminan el estrés físico y/o psicológico dentro de las limitaciones impuestas por los objetivos de la investigación.

Todos los miembros del comité y todos los investigadores tienen la responsabilidad de refinar los procedimientos continuamente. Algunos ejemplos de áreas potenciales de refinamiento incluyen: constante entrenamiento del personal, enriquecimiento ambiental para animales en cautiverio, adecuada planeación del manejo, antes, durante y después del procedimiento; adecuada anestesia y analgesia; selección del punto final más humanitario, adecuados métodos de eutanasia, cirugía de baja invasión, utilización de adyuvantes menos tóxicos y apropiados métodos de transferencia y de transporte de los animales.

7. ESTABLECIMIENTO DE PUNTOS FINALES

La falta de un punto final humanitario bien definido, a menudo es un aspecto clave en la revisión del protocolo y una de las principales causas de objeción al mismo. Cuando se presupone la muerte de los animales, el comité debe considerar importante, el curso del tiempo y severidad del proceso, supervisando el entrenamiento de los encargados de los animales así como el cuidado y tratamiento de los mismos y la prevención de complicaciones inesperadas. Si la frecuencia esperada, severidad y signos de morbilidad son desconocidas, debe intentarse un estudio piloto bajo la estrecha vigilancia médica veterinaria para responder a estas dudas. **La muerte y el estado moribundo, como puntos finales, deben ser evitados.** Se aplica eutanasia a los animales en la parte mas temprana del punto final, de acuerdo con los objetivos científicos de la propuesta, y en concordancia con los criterios aceptables para la determinación de este punto.

Los procedimientos que involucran dolor severo constante y/o inevitable o privación de alimento y/o agua y el aislamiento durante períodos prolongados de animales conscientes, por ejemplo, experimentos en la categoría E, son considerados altamente cuestionables o inaceptables sin importar la trascendencia anticipada de los resultados.

8. CONTENCIÓN FÍSICA

La contención física, con la mano o en cepos u otros aparatos, a menudo se requiere para la exploración, toma de muestras y una variedad de otras manipulaciones clínicas y experimentales. La contención induce estrés y puede ser minimizado con el acondicionamiento del animal, el uso apropiado de dispositivos adecuados en tamaño y diseño para la especie y con la adecuada ejecución por personal experimentado.

La contención física que dure poco más que unos cuantos minutos solo debe ser utilizada en animales conscientes, después de que los procedimientos alternativos

han sido considerados y se encontraron inadecuados. Se debe evitar tener sentados por tiempos prolongados a los primates no humanos.

9. PROCEDIMIENTOS INVASIVOS Y MUY ESTRESANTES

Se debe aportar una descripción del régimen pre-operatorio, que incluya, una descripción de los procedimientos y de la preparación del animal, descripción de cualquier sustancia, antibiótico o tranquilizante a ser administrado, así como su dosis y vía por la cual se aplicarán, descripción de procedimientos de ventilación pulmonar e instrumentación (aplicación de catéteres). Cuando se anticipa el uso repetitivo de una metodología particular, el comité deberá pedir al investigador que desarrolle detalladamente un Procedimiento Operativo Estandarizado, para someterlo al comité.

Se debe aportar información sobre el tipo de monitorización y el criterio utilizado para juzgar el nivel de anestesia/analgesia, por ejemplo, frecuencia respiratoria y cardíaca, reflejo corneal, sensibilidad profunda, color de membranas mucosas, relajación muscular, así como una breve descripción técnica del procedimiento. Otra información que se debe incluir es la fuente, método, volumen y frecuencia del muestreo de sangre y/o tejidos. Debe existir una clara relación entre cada procedimiento y el objetivo de la investigación.

Se debe establecer el criterio para evaluar la presencia y severidad de distrés después de un procedimiento y aportar bases para la administración de analgésicos u otros procedimientos para minimizarlo o eliminarlo. **Las cirugías múltiples u otros procedimientos repetitivos altamente estresantes en un animal, generalmente son inaceptables y no se justifican por ahorro económico.** Protocolos que incluyen estos procedimientos deben sufrir una rigurosa revisión ética y de bienestar para su justificación.

10. EUTANASIA

La selección del método apropiado de eutanasia (*JAVMA Panel de Eutanasia 2000*), debe ser específico para las especies y métodos experimentales utilizados, lo menos traumática para el operario el cual debe contar con el entrenamiento y competencia adecuados. El criterio para la eutanasia, en términos de cambios de comportamiento y signos fisiológicos específicos de especies o en relación al diseño experimental, debe ser descrito claramente.

Se debe incluir una descripción de la disposición final de los animales que sobreviven durante el estudio o a su finalización.

11. MATERIALES PELIGROSOS

Antes de que inicie el proyecto, debe ser enviada al comité, la aprobación correspondiente para el uso de agentes peligrosos (materiales radioactivos, ADN y ARN recombinante patógeno humano, vegetal o animal, toxinas peligrosas, químicos carcinogénicos, éteres). Debe aportarse, como parte del protocolo o en una copia anexa de la solicitud aprobada, una breve descripción del riesgo potencial a la salud de humanos o animales, también, cuidado especial requerido hacia los animales, precauciones para el personal, requerimientos especiales de contención, almacenamiento específico, desecho y requerimientos de eliminación de animales y procedimientos de emergencia.

12. PROTOCOLOS DE ENSEÑANZA.

El uso de animales para fines educativos es diferente en sus objetivos del uso de animales en investigación y/o constatación, el objetivo del uso de animales en la enseñanza es demostrar principios ya establecidos, para adiestrar alumnos en habilidades y técnicas manuales, y no para descubrir, probar o desarrollar nuevas técnicas o hipótesis.

El uso constante de animales en este campo debe estar basado en una sólida justificación ética y en objetivos educativos que no pueden ser alcanzados con

alternativas (cultivo de tejidos, simuladores computacionales, modelos matemáticos, videos, etc.).

Todos los protocolos de enseñanza en donde se utilizan animales deberán someterse a una revisión por parte del comité, quien además podrá evaluar el grado de competencia, en cuanto al manejo de los animales y ejecución de los procedimientos, de los instructores o asistentes.

Se deberá describir, al final de la práctica, la disposición final de los animales vivos y de los cadáveres.

Los experimentos que causen dolor inevitable o en los que se efectúen procedimientos múltiples en un mismo animal guiados sólo para la instrucción de los estudiantes o para la demostración de conocimientos ya establecidos no están justificados.

13. ESTUDIOS DE CAMPO EN VIDA SILVESTRE.

Los procedimientos experimentales que involucran la captura, manejo y liberación de animales silvestres deben ejecutarse con especial cuidado: debido a que la falta de procedimientos adecuados resulta en un alto grado de estrés para estos animales. Por eso, la captura, manejo y/o administración de drogas y toma de muestras y la eutanasia deben ser claramente descritas en todos sus procedimientos. La disposición de los cadáveres de estas especies se especificará de acuerdo a la norma vigente. (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

En estas especies se debe evitar el confinamiento por períodos prolongados de tiempo.

Responsables de la traducción
MVZ Carlos Villagrán Vélez
PMVZ Roberto Aarón Ramírez Ojeda
CICUAE-FMVZ-UNAM

ANEXO 4. Preparación de la solución bufferada de fosfatos (PBS).

Fosfatos ácido de sodio (Na_2HPO_4): 10.9 g/L

Fosfato dibásico de sodio (NaH_2PO_4): 3.2 g/L

Cloruro de sodio (NaCl): 90 g/L

Para preparar 50 mL de PBS 0.1M y 10X.

Na_2HPO_4 . 0.545 g

NaH_2PO_4 . 0.16 g

NaCl . 4.5 g

Para una solución al 0.01M y 1X.

Tomar 5 mL de la solución 10X y agregar 45 mL de agua destilada. Medir el pH (7.2) y esterilizar.

4. GREEN DILUENT

Bring to room temperature and mix thoroughly. Use undiluted as plasma diluent buffer.

5. CONJUGATE

Reconstitute freeze dried **Conjugate 100X Concentrate** with 0.5 ml (2 Plate), 1.5 ml (10 Plate) or 2 ml (30 Plate) of deionised or distilled water. Ensure complete resolubilisation. Mixing should be performed with a minimum of frothing.

Conjugate 100X Concentrate MUST be kept at 35° to 46°F (2° to 8°C) at all times and used WITHIN 3 months of reconstitution.

NOTE: Excessive frothing of conjugate may cause denaturation and reduce its performance in the EIA.

FOR THE 10 PLATE BOVIGAM® KIT ONLY:

Bring **Blue Diluent (Conjugate Diluent Buffer) 5X Concentrate** to room temperature and mix thoroughly. Prepare working strength Blue Diluent (conjugate diluent buffer) by mixing one part 5X Concentrate with 4 parts deionised or distilled water. Working strength Blue Diluent may be stored at 35° to 46°F (2° to 8°C) for up to 3 months but MUST be brought to room temperature and mixed thoroughly before being used again.

FOR THE 2 AND 30 PLATE BOVIGAM® KITS ONLY:

The Blue Diluent is supplied pre-diluted and ready for use. Prepare working strength Conjugate Reagent combining appropriate volumes of working strength Blue Diluent and reconstituted Conjugate 100X Concentrate as set out in the Reagent Preparation Table (Table 1). Mix thoroughly but gently. Avoid frothing. The working strength Conjugate Reagent should be used WITHIN 5 MINUTES OF PREPARATION and unused reagent immediately discarded. Return any unused Conjugate 100X Concentrate to 35° to 46°F (2° to 8°C) immediately after use.

6. WASH BUFFER

Prepare working strength wash buffer by adding one part 20X Concentrate with 19 parts deionised or distilled water. Mix thoroughly. Working strength wash buffer may be stored at room temperature for up to 2 weeks. Unused Wash Buffer 20X Concentrate should be returned to 35° to 46°F (2° to 8°C) after use.

NOTE: Wash Buffer 20X Concentrate may contain salt crystals. Re-dissolve crystals by warming to 37°C. Mix thoroughly before dilution.

7. ENZYME SUBSTRATE SOLUTION

Bring the Enzyme Substrate Buffer and Chromogen Solution 100X Concentrate to room temperature and ensure each is thoroughly mixed before dilution. Prepare enzyme substrate solution just prior to use by combining appropriate volumes of Chromogen Solution Concentrate and Enzyme Substrate Buffer as shown in the Reagent Preparation Table (Table 1). Enzyme Substrate Solution must be completely mixed and should be colourless. Discard if blue colouration occurs. USE WITHIN 10 MINUTES OF PREPARATION.

NOTE: If possible use plastic polypropylene disposable containers sterilised by irradiation to prepare the enzyme substrate solution.

DO NOT USE POLYSTYRENE CONTAINERS OR PIPETTES. Any glassware used with the enzyme substrate reagents should be rinsed thoroughly with 1N H₂SO₄ or HCl followed by at least three washes of deionised or distilled water, ensuring no acid residue remains on the glassware.

8. SAFE DISPOSAL OF REAGENTS

All waste and unused portions of prepared reagents should be disposed of in accordance with State and local requirements.

REAGENT PREPARATION TABLE FOR DILUTING CONJUGATE AND CHROMOGEN
TABLE 1

Number of Plates	Volume of Conjugate Concentrate (100X) or Chromogen Solution Concentrate (100X)	Volume of working strength Blue Diluent or Enzyme Substrate Buffer
1	0.12 mL	12 mL
2	0.24 mL	24 mL
3	0.36 mL	36 mL
4	0.48 mL	48 mL
5	0.60 mL	60 mL
6	0.72 mL	72 mL
7	0.84 mL	84 mL
8	0.96 mL	96 mL
9	1.08 mL	108 mL
10	1.20 mL	120 mL
20	2.00 mL	200 mL
30	3.00 mL	300 mL

PROCEDURAL NOTES

- All test plasmas and reagents except the Conjugate 100X Concentrate MUST be brought to room temperature (22 ± 5°C) before use. Treated test samples should be mixed thoroughly by carefully vortexing each tube. DO NOT WARM ABOVE 37°C.

NOTE: Several hours may be required to ensure a full bottle of reagent has reached room temperature. If a shorter equilibration time is desired, an ambient temperature water bath must be used.

- All kit components are to be stored at 35° to 46°F (2° to 8°C). Return to 35° to 46°F (2° to 8°C) immediately after use. Working strength wash buffer may be stored at room temperature (22 ± 5°C) for up to 2 weeks.

3. The Conjugate 100X Concentrate must be left at 35° to 46°F (2° to 8°C) at all times, even during reconstitution.

4. Complete reconstitution of freeze dried components is essential for valid performance of the assay. To ensure this, reconstitute reagents and allow vials to air for at least 15 minutes, then mix by gently inverting each vial 4 or 5 times. A roller-rocker apparatus may be used. Mix again just prior to use.

NOTE: It is important that high quality deionised or distilled water is used to reconstitute and dilute reagents as horseradish peroxidase is readily inactivated by pollutants common in laboratory water supplies.

- 5. Once the assay has been started it should be completed without interruption.
6. Use a separate disposable tip for each sample to prevent cross contamination.
7. Test plasmas from individual animals should be added simultaneously to wells using a 12-channel pipette.
8. EIA must be performed on an inverted test-tube rack (or similar) to minimise inter-well variations.
9. Each test plasma should be assayed in duplicate in adjacent wells (e.g. rows A and B) starting at the top of column 1 of the microplate.
10. Positive and Negative Bovine IFN-gamma Controls should be assayed in triplicate in serial wells of Columns 4, 5 and 6 (e.g. row F for positive and row E for negative controls).

Following these recommendations allow 45 test plasmas from 15 animals to be assayed in duplicate per EIA microplate.

TEST PROCEDURE
STAGE ONE - WHOLE BLOOD CULTURE METHOD

1. Blood Collection:
STEP:
1. Collect blood from cattle receding positively to the single intradermal skin test.
2. Collect a minimum volume of 5 mL of blood from each animal into a blood collection tube containing heparin as anti-coagulant and gently mix blood by inversion several times to dissolve the heparin. Blood samples should be transported to the laboratory at ambient temperature (22 ± 5°C, avoid freezing) and stored in the dark for a maximum of 30 hours of collection. Unused circumstances should blood be stored in refrigerator.
2. Dispensing Blood:
Blood samples must be evenly mixed before aliquoting. Use a roller-rocker or gently invert tubes about 10 times immediately prior to dispensing.

3. Assay:
1. Prepare enzyme substrate solution as in Step 3.
2. Prepare enzyme substrate solution to wells. Mix thoroughly as in Step 3.
3. Cover each plate with a lid and incubate as in Step 4 for 30 minutes. Protect from direct sunlight.
NOTE: Commence incubation time as you add substrate to the first well(s).
4. Read the absorbance of each well within 5 minutes of terminating the reaction using a 450 nm filter with a 620-650 nm release filter. The absorbance values must be used to calculate results.

STAGE TWO - BOVINE IFN-gamma EIA

1. Reconstitute freeze dried components, if required, while equilibrating other components at room temperature (22 ± 5°C).
2. Add 50 µL of Green Diluent to the required wells.
3. Add 50 µL of test and control samples to the appropriate wells containing Green Diluent. Control samples should be added last to each plate. Mix thoroughly by vortexing plates for 1 minute on a microplate shaker, or if not available, by pipetting up and down 5 times.
4. Cover each plate with a lid and incubate at room temperature (22 ± 5°C) for 60 ± 5 minutes.
5. Shake out contents and wash wells 6 times at room temperature. Fill wells with wash buffer taking care not to cross contaminate adjacent wells. Shake out wash liquid and repeat operation a further 5 times. After the sixth wash, add 100 µL of substrate solution to each well. Incubate for 5 minutes. Read absorbance several times over absorbent paper to remove as much remaining wash buffer as possible.

samples have been transferred, are used for assaying positive and negative controls supplied with the EIA kit.

Plasmas in row A of the storage rack should be assayed in duplicate. Plasmas in row B of the EIA microplate, row B to C and D, should be assayed in duplicate. The samples in one full storage rack will require two EIA microplates to assay.

Table with 12 columns (1-12) and 8 rows (A-H) showing the recommended plasma storage layout. Row A: 1B, 2A, 3N, 4S, 5B, 6A, 7X, 8, 9, 10, 11, 12. Row B: 5N, 6S, 7A, 8N, 9B, 10A, 11N, 12B. Row C: 9N, 10S, 11A, 12N, 13B, 14A, 15N, 16B. Row D: 13N, 14S, 15A, 16N, 17B, 18A, 19N, 20B. Row E: 17N, 18S, 19A, 20N, 21B, 22A, 23N, 24B. Row F: 23N, 24S, 25A, 26N, 27B, 28A, 29N, 30B. Row G: 27N, 28S, 29A, 30N, 31B, 32A, 33N, 34B. Row H: 33N, 34S, 35A, 36N, 37B, 38A, 39N, 40B.

RECOMMENDED PLASMA STORAGE LAYOUT

Plasma Storage:
Plasmas should be stored at 35° to 46°F (2° to 8°C) for up to 7 days if not required for assays on the day of collection. Each microplate must be sealed with an appropriate cap before storage. Label sample racks with all relevant information including date, operator initials, tube contents and animal numbers and herd details. For longer periods, samples may be stored frozen at -20°C for several months.

NOTE: Samples must be allowed to equilibrate to room temperature prior to testing by EIA. Carefully vortex each tube several times immediately prior to assay for IFN-gamma.

CAUTION:
Plasmas may clot during thawing. Clots do not affect the ELISA, as long as there is no leakage to the volume of plasma being assayed by the pipette.

STAGE TWO - BOVINE IFN-gamma EIA

1. Reconstitute freeze dried components, if required, while equilibrating other components at room temperature (22 ± 5°C).
2. Add 50 µL of Green Diluent to the required wells.
3. Add 50 µL of test and control samples to the appropriate wells containing Green Diluent. Control samples should be added last to each plate. Mix thoroughly by vortexing plates for 1 minute on a microplate shaker, or if not available, by pipetting up and down 5 times.
4. Cover each plate with a lid and incubate at room temperature (22 ± 5°C) for 60 ± 5 minutes.
5. Shake out contents and wash wells 6 times at room temperature. Fill wells with wash buffer taking care not to cross contaminate adjacent wells. Shake out wash liquid and repeat operation a further 5 times. After the sixth wash, add 100 µL of substrate solution to each well. Incubate for 5 minutes. Read absorbance several times over absorbent paper to remove as much remaining wash buffer as possible.

Automatic microplate washers may be used providing the number of wash cycles and the delay period between each wash has been optimised to remove background reactions. Ensure that unbound conjugate has been adequately removed from the wells to prevent invalid results.

NOTE: The enzyme substrate solution is best prepared after this wash step.
10. Cover each plate with a lid and incubate as in Step 4 for 30 minutes. Protect from direct sunlight.
NOTE: Commence incubation time as you add substrate to the first well(s).
11. Read the absorbance of each well within 5 minutes of terminating the reaction using a 450 nm filter with a 620-650 nm release filter. The absorbance values must be used to calculate results.

Table with 12 columns (1-12) and 8 rows (A-H) showing the recommended plasma storage layout. Row A: 1B, 2A, 3N, 4S, 5B, 6A, 7X, 8, 9, 10, 11, 12. Row B: 5N, 6S, 7A, 8N, 9B, 10A, 11N, 12B. Row C: 9N, 10S, 11A, 12N, 13B, 14A, 15N, 16B. Row D: 13N, 14S, 15A, 16N, 17B, 18A, 19N, 20B. Row E: 17N, 18S, 19A, 20N, 21B, 22A, 23N, 24B. Row F: 23N, 24S, 25A, 26N, 27B, 28A, 29N, 30B. Row G: 27N, 28S, 29A, 30N, 31B, 32A, 33N, 34B. Row H: 33N, 34S, 35A, 36N, 37B, 38A, 39N, 40B.

RECOMMENDED PLASMA STORAGE LAYOUT

Plasma Storage:
Plasmas should be stored at 35° to 46°F (2° to 8°C) for up to 7 days if not required for assays on the day of collection. Each microplate must be sealed with an appropriate cap before storage. Label sample racks with all relevant information including date, operator initials, tube contents and animal numbers and herd details. For longer periods, samples may be stored frozen at -20°C for several months.

NOTE: Samples must be allowed to equilibrate to room temperature prior to testing by EIA. Carefully vortex each tube several times immediately prior to assay for IFN-gamma.

CAUTION:
Plasmas may clot during thawing. Clots do not affect the ELISA, as long as there is no leakage to the volume of plasma being assayed by the pipette.

STAGE TWO - BOVINE IFN-gamma EIA

1. Reconstitute freeze dried components, if required, while equilibrating other components at room temperature (22 ± 5°C).
2. Add 50 µL of Green Diluent to the required wells.
3. Add 50 µL of test and control samples to the appropriate wells containing Green Diluent. Control samples should be added last to each plate. Mix thoroughly by vortexing plates for 1 minute on a microplate shaker, or if not available, by pipetting up and down 5 times.
4. Cover each plate with a lid and incubate at room temperature (22 ± 5°C) for 60 ± 5 minutes.
5. Shake out contents and wash wells 6 times at room temperature. Fill wells with wash buffer taking care not to cross contaminate adjacent wells. Shake out wash liquid and repeat operation a further 5 times. After the sixth wash, add 100 µL of substrate solution to each well. Incubate for 5 minutes. Read absorbance several times over absorbent paper to remove as much remaining wash buffer as possible.

Automatic microplate washers may be used providing the number of wash cycles and the delay period between each wash has been optimised to remove background reactions. Ensure that unbound conjugate has been adequately removed from the wells to prevent invalid results.

NOTE: The enzyme substrate solution is best prepared after this wash step.
10. Cover each plate with a lid and incubate as in Step 4 for 30 minutes. Protect from direct sunlight.
NOTE: Commence incubation time as you add substrate to the first well(s).
11. Read the absorbance of each well within 5 minutes of terminating the reaction using a 450 nm filter with a 620-650 nm release filter. The absorbance values must be used to calculate results.

Table with 12 columns (1-12) and 8 rows (A-H) showing the recommended plasma storage layout. Row A: 1B, 2A, 3N, 4S, 5B, 6A, 7X, 8, 9, 10, 11, 12. Row B: 5N, 6S, 7A, 8N, 9B, 10A, 11N, 12B. Row C: 9N, 10S, 11A, 12N, 13B, 14A, 15N, 16B. Row D: 13N, 14S, 15A, 16N, 17B, 18A, 19N, 20B. Row E: 17N, 18S, 19A, 20N, 21B, 22A, 23N, 24B. Row F: 23N, 24S, 25A, 26N, 27B, 28A, 29N, 30B. Row G: 27N, 28S, 29A, 30N, 31B, 32A, 33N, 34B. Row H: 33N, 34S, 35A, 36N, 37B, 38A, 39N, 40B.

RECOMMENDED PLASMA STORAGE LAYOUT

Plasma Storage:
Plasmas should be stored at 35° to 46°F (2° to 8°C) for up to 7 days if not required for assays on the day of collection. Each microplate must be sealed with an appropriate cap before storage. Label sample racks with all relevant information including date, operator initials, tube contents and animal numbers and herd details. For longer periods, samples may be stored frozen at -20°C for several months.

NOTE: Samples must be allowed to equilibrate to room temperature prior to testing by EIA. Carefully vortex each tube several times immediately prior to assay for IFN-gamma.

CAUTION:
Plasmas may clot during thawing. Clots do not affect the ELISA, as long as there is no leakage to the volume of plasma being assayed by the pipette.

STAGE TWO - BOVINE IFN-gamma EIA

1. Reconstitute freeze dried components, if required, while equilibrating other components at room temperature (22 ± 5°C).
2. Add 50 µL of Green Diluent to the required wells.
3. Add 50 µL of test and control samples to the appropriate wells containing Green Diluent. Control samples should be added last to each plate. Mix thoroughly by vortexing plates for 1 minute on a microplate shaker, or if not available, by pipetting up and down 5 times.
4. Cover each plate with a lid and incubate at room temperature (22 ± 5°C) for 60 ± 5 minutes.
5. Shake out contents and wash wells 6 times at room temperature. Fill wells with wash buffer taking care not to cross contaminate adjacent wells. Shake out wash liquid and repeat operation a further 5 times. After the sixth wash, add 100 µL of substrate solution to each well. Incubate for 5 minutes. Read absorbance several times over absorbent paper to remove as much remaining wash buffer as possible.