

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



TESIS

***“COMPARACIÓN ANTIGÉNICA DE DERIVADOS
PROTEICOS DE *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium
avium* Y *Mycobacterium smegmatis*.”***

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA
JESUS ALEJANDRO BORBOA OLIVAS**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO**

**CO-DIRECTOR
M.C. HÉCTOR LÓPEZ PÉREZ**

CULIACAN, SINALOA, ENERO DE 2011.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



TESIS

***“COMPARACIÓN ANTIGÉNICA DE DERIVADOS
PROTEICOS DE *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium
avium* Y *Mycobacterium smegmatis*.”***

***PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS***

***PRESENTA
JESUS ALEJANDRO BORBOA OLIVAS***

***DIRECTORA DE TESIS
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO***

***CO-DIRECTOR
M.C. HÉCTOR LÓPEZ PÉREZ***

CULIACAN, SINALOA, ENERO DE 2011.

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JESÚS ALEJANDRO BORBOA OLIVAS**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA; Y HA
SIDO APROBADA POR EL MISMO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

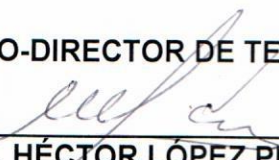
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS



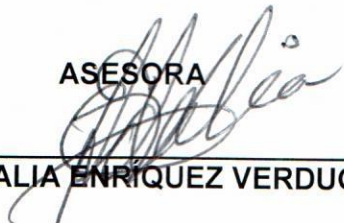
DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTOR DE TESIS



MC. HÉCTOR LÓPEZ PÉREZ

ASESORA



DRA. IDALIA ENRIQUEZ VERDUGO

ASESORA



MC. NOHEMI CASTRO DEL CAMPO

CULIACÁN, SINALOA, ENERO DE 2011.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que nada a Dios, por permitirme transitar por ésta vida en busca de un propósito, esperando que el uso de mis mejores capacidades en servicio del avance del conocimiento sea digno de dicho camino.

Agradezco a mis padres por traerme aquí, hacer de mí lo que soy y apoyarme siempre, a su manera, en mi búsqueda de realización personal.

Agradezco también a las personas que forman parte de mi historia, aunque ya no se encuentren en mi vida, pues debido a ellas estoy aquí hoy.

Agradezco a mi hijo Jesús Erubiel por traer significado a mi vida siendo yo muy joven, y por ser el motor que me impulsa a ser mejor siempre.

Agradezco por supuesto a la Dra. Soila Maribel Gaxiola y el MC. Héctor López por su apoyo durante la realización de este trabajo, y agradezco con un especial cariño a la Dra. Idalia Enríquez por valioso apoyo durante todo éste proceso.

También agradezco el apoyo de mis compañeros de laboratorio; MVZ. Claudia Barraza y MVZ. Daniel Solis; sin su apoyo y ánimos las cosas no serían las mismas. Por supuesto lo mismo vale para mi compañero MVZ. Miguel Angel Rodríguez, de antaño compañero y esperemos que por mucho tiempo más.

Debo agradecer también al equipo de patología: Dr. Felipe Juárez Barranco, MC. Martín López y MSP. Gaby Silva que, sin ser parte de este proyecto, siempre me han brindado su apoyo y consejo en esta travesía.

Se agradece también el apoyo económico brindado al programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI). A todo el personal que conforma el posgrado y también la administración.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo, y en general a la Universidad Autónoma de Sinaloa, institución a la cual debo gran parte de mi educación y por la cual siento un especial cariño por darme la oportunidad de superarme a pesar de las limitaciones socioeconómicas que muchas veces nos determinan.

Y agradezco a todos los que me han acompañado y apoyado, si es que omito algún nombre me disculpo, les agradezco por haber estado aquí.

ÍNDICE

	RESUMEN.....	iv
	ABSTRACT.....	v
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
	2.1 La tuberculosis bovina.....	2
	2.1.1 Definición de la enfermedad y signos clínicos.....	2
	2.1.2 Lesiones.....	2
	2.1.3 Transmisión y patogenia.....	3
	2.1.4 Epidemiología y distribución.....	4
	2.1.5 Importancia.....	6
	2.2 Diagnóstico.....	8
	2.2.1 Aislamiento.....	8
	2.2.2 Posmortem.....	9
	2.2.3 Tuberculinización.....	9
	2.2.4 Interferón-Gamma.....	10
	2.2.5 Serología.....	10
	2.3 Características de <i>M. bovis</i> y <i>M. smegmatis</i>	11
	2.3.1 Características de <i>M. bovis</i>	11
	2.3.2 Características de <i>M. smegmatis</i>	11
	2.3.3 Similitudes entre <i>M. bovis</i> y <i>M. smegmatis</i>	11
	2.4 Antecedentes.....	12
III.	HIPÓTESIS.....	13
IV.	OBJETIVOS.....	14
	4.1 Objetivo general.....	14
	4.2 Objetivos específicos.....	14
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
	5.1 Cultivo de <i>M. smegmatis</i>	15
	5.2 Extracción de proteínas.....	15
	5.3 Producción de sueros hiperinmunes.....	16
	5.4 Electroforesis y Western Blot.....	17
	5.5 Análisis de datos.....	18
VI.	RESULTADOS.....	19
	6.1 Obtención de proteínas.....	19
	6.2 Verificación del suero hiperinmune.....	20
	6.3 Identificación de proteínas de reacción cruzada (PPDb).....	21
	6.4 Identificación de proteínas de reacción cruzada (PPDa).....	22
VII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	23
VIII.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	24

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Contenido de los inóculos.....	16
Cuadro 2. Descripción de los animales usados para la producción de anticuerpos.....	17
Figura 1. Situación actual de la Tuberculosis Bovina.....	6
Figura 2. Clasificación de la USDA.....	7
Figura 3. Gel de Poliacrilamida (12%) teñido con azul de Coomasie.....	19
Figura 4. Proteínas totales reaccionando con su suero homólogo. Transferencia en membrana de nitrocelulosa.....	20
Figura 5. Proteínas de <i>M. smegmatis</i> reaccionando con suero anti-PPD bovina. Transferencia en membrana de nitrocelulosa.....	21
Figura 6. Proteínas de <i>M. smegmatis</i> reaccionando con suero anti-PPD aviar. Transferencia en membrana de nitrocelulosa.....	22

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis*, y se caracteriza por la formación de granulomas nodulares. Es una enfermedad cosmopolita que afecta principalmente el tracto respiratorio. Causa pérdidas importantes en la producción. Está contemplada para su erradicación mediante campaña nacional. Tradicionalmente se ha diagnosticado mediante la prueba intradérmica de la tuberculina, pero se siguen buscando nuevos métodos que mejoren la sensibilidad, especificidad y rapidez del diagnóstico para coadyuvar a su erradicación. *M. smegmatis* es una micobacteria no patógena de crecimiento rápido, utilizada como modelo de estudio de las micobacterias patógenas, con las cuales comparte muchas características. El objetivo de este trabajo es buscar antígenos de *M. smegmatis* que posean reactividad cruzada con *M. bovis* para su empleo en el desarrollo de pruebas diagnósticas *In Vitro*. Se utilizó un análisis comparativo simple mediante pruebas de Western-Blot. Para obtener los antígenos de *M. smegmatis* se utilizó la cepa mc²155 cultivada en agitación en medio líquido 7H9, se hizo extracción de proteínas totales y del sobrenadante, estas se visualizaron en geles SDS-PAGE para comprobar su integridad; se utilizaron como controles PPD bovina y PPD aviar. Se inocularon 4 grupos de cabras con cada uno de los antígenos para producir sueros hiperinmunes. Los antígenos obtenidos de *M. smegmatis* fueron incubados con los diferentes sueros para monitorear mediante las reacciones cruzadas su especificidad y su antigenicidad con la intensidad de la reacción. Los resultados indican que existen dos proteínas antigénicas con reactividad cruzada con potencial de utilidad diagnóstica en la tuberculosis bovina.

Palabras claves: Tuberculosis bovina, *M. smegmatis*, Proteínas antigénicas, Western-Blot, Diagnóstico.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium bovis*. It is characterized by the formation of nodular granulomas. It is a cosmopolitan disease that primarily affects the respiratory tract. It causes significant losses in production. It is contemplated for its eradication through national campaign. It has traditionally been diagnosed by tuberculin skin test, but continue to seek new methods to improve the sensitivity, specificity and rapidity of diagnosis to contribute to its eradication. *M. smegmatis* is a fast-growing non-pathogenic mycobacteria, used as a model for the study of pathogenic mycobacteria, with which it shares many features. The aim of this work is to find antigens of *M. smegmatis* having cross reactivity with *M bovis* antigens for use in the development of in vitro diagnostic tests. We used a simple comparative analysis by Western-Blot test. Antigens for *M. smegmatis* mc2155 strain was used cultured in 7H9 liquid medium with agitation, total and supernatant proteins were extracted, and these were visualized on SDS-PAGE gels for integrity, bovine PPD and avian PPD were used as controls. 4 groups of goats were inoculated with each of the antigens to produce hyperimmune sera. The antigens obtained from *M. smegmatis* were incubated with different sera for monitoring their specificity by cross-reactions and antigenicity with the intensity of the reaction. The results indicate that there are two cross-reactive antigenic proteins with potential diagnostic utility in bovine tuberculosis.

Keywords: Bovine tuberculosis, *M. smegmatis*, antigenic proteins, Western-Blot, Diagnostics.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa de curso crónico, causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, se caracteriza por lesiones granulomatosas en los pulmones y ganglios mediastínicos, traqueales y retrofaríngeos principalmente; aunque puede haber presentaciones digestivas o diseminadas. Se propaga principalmente por vía aérea, aunque también la vía oral es importante. Es una enfermedad de distribución mundial, aunque varios países ya han logrado erradicarla y otros como México, están haciendo esfuerzos para conseguirlo. También es considerada una zoonosis (OIE, 2009; Thoen y Barletta, 2004).

Debido a las regulaciones en materia zoonosanitaria, constituye una barrera importante para el tráfico internacional de ganado, provocando pérdidas en la economía tanto por sus efectos en la producción como en el comercio. En México, el gobierno federal implementa una campaña nacional contra la tuberculosis bovina, NOM-031-zoo-1996 (SENASICA, 2009).

Recientemente se ha elaborado un proyecto de modificación a dicha norma; que refleje los avances de la campaña, regule las partes donde la norma anterior no era clara y se ajuste a la información científica más reciente en materia de epidemiología y diagnóstico (Diario Oficial de la Federación, 2007).

En Sinaloa la ganadería es una actividad económica relevante, y el mejoramiento del estatus zoonosanitario del estado puede verse ayudado del desarrollo de pruebas diagnósticas adecuadas para nuestro entorno.

En el caso particular para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, el uso de técnicas de biología molecular puede ayudar a desarrollar dichas tecnologías.

M. bovis es un organismo de crecimiento lento y patógeno para el ser humano, *M. smegmatis* es una micobacteria no patógena, de crecimiento rápido, que comparte muchas características morfológicas y genéticas con las micobacterias patógenas (Wang et al, 2005).

El propósito de este estudio es la caracterización antigénica de derivados proteicos de *M. smegmatis* de reacción cruzada con *M. bovis* y *M. avium*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 La Tuberculosis Bovina.

Definición de la Enfermedad y Signos Clínicos. La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium bovis* y se caracteriza normalmente por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos. Aunque se suele definir como una enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina puede presentar en ocasiones un curso agudo, rápido y progresivo. Cualquier tejido puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos (sobre todo de la cabeza y tórax), pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo (OIE).

En países con programas de erradicación de la tuberculosis, raramente se observa evidencia clínica de tuberculosis en el ganado, porque la prueba intradérmica de la tuberculina posibilita el diagnóstico y la eliminación de los animales infectados antes de que aparezcan los síntomas. Sin embargo, antes de las campañas nacionales de erradicación de la tuberculosis, se observaban con frecuencia los síntomas asociados con la tuberculosis (Cousins, 2001).

Estos síntomas varían según la distribución de los tubérculos en el cuerpo pero, con pocas excepciones, el curso de la enfermedad es crónico. En muchos casos faltan síntomas característicos, incluso en fases avanzadas de la enfermedad cuando están afectados muchos órganos. La implicación de los pulmones puede originar tos, que se puede inducir por cambios de temperatura o por presión manual sobre la tráquea. La disnea y otros síntomas de neumonía de grado bajo también evidencian la disfunción pulmonar. En casos avanzados, los ganglios linfáticos a menudo están muy dilatados y pueden obstruir las vías respiratorias, el tracto alimentario o los vasos sanguíneos. Los ganglios linfáticos de la cabeza y del cuello pueden llegar a estar afectados a simple vista y a veces se rompen y drenan. La implicación del tracto digestivo se manifiesta por la presencia de diarreas intermitentes y en algunos casos, por estreñimiento. (OIE, 2009; Quinn, et al, 2002)

Lesiones. En las necropsias, los tubérculos se ven con más frecuencia en los ganglios linfáticos retrofaríngeos, bronquiales mediastínicos, craneales y portales,

que pueden ser el único tejido infectado. Además se suelen ver afectados los pulmones, el hígado, el bazo y las superficies de las cavidades del cuerpo. Otros lugares anatómicos se pueden considerar como potencialmente infectables. Un granuloma tuberculoso suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa, caseo-calcárea o calcificada. Ocasionalmente pueden ser purulentos. Normalmente, el centro caseoso es seco, firme, y está cubierto con una cápsula fibrosa conjuntiva de grosor variable. Los tejidos fijados de un tubérculo no se extraen intactos con facilidad, como ocurre con algunos granulomas no tuberculosos. El tamaño de las lesiones varía, desde tan pequeñas que pueden pasar desapercibidas a simple vista, hasta ocupar gran parte de un órgano. El corte seriado de órganos y tejidos resulta vital para detectar las lesiones contenidas en un tejido (Neill et al, 1994; Thoen y Barletta, 2004).

La formación del granuloma es un intento del hospedador para localizar la infección y permitir a los mecanismos inflamatorio e inmune destruir el bacilo. Algunas lesiones pueden aparecer en regresión, siendo encapsuladas por tejido conectivo organizado; dichas lesiones pueden contener bacilos viables. Típicamente la apariencia microscópica de un granuloma es focal y consta de una zona central de material necrótico, rodeado de una zona de células epiteliales, linfocitos y algunos granulocitos; puede existir mineralización. La zona cercana al área necrótica presenta frecuentemente células gigantes multinucleadas; usualmente se presenta una capa de tejido conectivo fibroso entre las lesiones y el tejido normal. Ocasionalmente el tejido conectivo no aparece y la lesión asume una apariencia más difusa (Thoen y Barletta, 2004; Palmer et al, 2007)

Transmisión y Patogenia. El bacilo de *Mycobacterium bovis* principalmente es eliminado vía aerosol, el cual es inhalado pasando hacia pulmón en donde los macrófagos alveolares fagocitan las micobacterias, que se multiplican dentro de estos, pasando a ganglios linfáticos lo cual forma un granuloma donde intervienen linfocitos T dando cabida a la creación del tubérculo causando una hipersensibilidad de tipo retardado (30 días post-infección), puede haber inmunidad celular eficaz o ineficaz, en la eficaz los macrófagos se encargan de fagocitar y destruir a *Mycobacterium* evitando así la transmisión. Cuando la inmunidad es ineficaz, la lesión se extiende provocando una tuberculosis pulmonar activa o incluso generalizada, lo cual causa que su eliminación pueda ser por aerosol, heces, orina y leche (Quinn, 2002; Thoen y Barletta, 2004).

Epidemiología y Distribución. Aunque se considera que el ganado vacuno es el verdadero hospedador de *M. bovis*, se ha descrito la enfermedad en muchos animales domésticos y silvestres (OIE, 2009). Algunos hospedadores de mantenimiento que se conocen son las zarigüellas de cola de cepillo (y posiblemente los hurones) en Nueva Zelanda, los tejones en Irlanda y el Reino Unido, bisones y alces en Canadá así como kudús y búfalos africanos en el Sur de África. El venado cola blanca en los USA (Michigan) ha sido clasificado como hospedero de mantenimiento, aunque algunos autores piensan que puede ser un hospedero incidental que mantiene al organismo sólo cuando su densidad de población es elevada. Otras especies reportadas como hospederos incidentales son los ovinos, caprinos, caballos, cerdos, perros, gatos, hurones, camellos, llamas, muchas especies de ruminantes silvestres incluyendo venados y alces, elefantes, rinocerontes, zorros, coyotes, visones, primates, zarigüeyas, focas, nutrias, liebres, mapaches, osos, grandes felinos y varias especies de roedores; la mayoría de los mamíferos podría ser susceptible.

M. bovis puede infectar al humano, principalmente por la ingestión de productos no pasteurizados, pero también mediante aerosoles o heridas en la piel. La carne cruda o insuficientemente cocida también puede ser fuente de infección. La transmisión de persona a persona es rara en individuos inmunocompetentes, pero ha sucedido ocasionalmente en pequeños grupos de personas, particularmente alcohólicos y VIH-positivos. Los humanos raramente infectan al ganado (OIE, 2009).

Los signos usualmente tardan años para desarrollarse en el ganado. La infección también puede permanecer oculta por años y reactivarse durante periodos de estrés o en edad avanzada. *M. bovis* puede sobrevivir varios meses en el ambiente, particularmente en condiciones de frío, humedad y obscuridad. De 12 a 24 °C el tiempo de supervivencia varía de 1 a 332 días, dependiendo de la exposición a la luz solar. Aunque puede ser cultivado de muestras conservadas artificialmente por cerca de dos años bajo ciertas condiciones, parece ser que en praderas naturales sobrevive a lo mucho por algunas semanas.

Aunque la tuberculosis bovina alguna vez estuvo presente en todo el mundo, actualmente ha sido eliminada o casi erradicada de los animales domésticos en muchos países. Entre las naciones consideradas como libres de tuberculosis se encuentran Australia, Finlandia, Dinamarca, Suiza, Noruega, Islandia, Austria,

Suecia, Luxemburgo, Latvia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, República Checa, Canada, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel. Existen programas de erradicación en progreso en otros países europeos, Japón, Nueva Zelanda, México y algunos países de América Central y Sudamérica. Aunque la TBb ha sido erradicada de la mayoría de los estados de EUA, algunos hatos infectados siguen siendo reportados, y algunos estados pueden perder su estatus libre periódicamente (OIE, 2009).

En México, el Gobierno Federal, a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, tomando en consideración las pérdidas económicas generadas por dicha enfermedad; tanto en la disminución de la producción, como en el comercio internacional debido al estatus zoosanitario que demandan los países importadores, así como el impacto en la salud pública; expidió la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA (*Mycobacterium bovis*). El propósito de la campaña consiste en establecer el diagnóstico, prevención y control para la erradicación de la enfermedad en bovinos.

Para efectos de campaña, el diagnóstico de la tuberculosis se llevará a cabo por medio de: tuberculinización, análisis bacteriológico e histopatológico, y otros que determine la Secretaría. La campaña contempla las siguientes fases de operación: Control, Erradicación y Libre (Diario Oficial de la Federación).

En lo que respecta a la tuberculosis en bovinos, en un estudio realizado en el 2004 donde se revisaron un total de 296 registros de publicaciones realizadas en 23 estados; los resultados obtenidos marcan en que nueve de 23 estados tuvieron una prevalencia promedio del 10% y 3 fueron negativos; Michoacán con un 9% resultó con 183 positivas; Tamaulipas de una muestra de 371 animales y una prevalencia promedio de 17% se obtuvo 63 casos positivos y en Baja California de 200,000 muestras se obtuvieron 24,000 positivas con un 12% de prevalencia promedio (García, 2004). Actualmente se encuentran en fase de erradicación 10 Estados y 15 con una prevalencia menor a 2 %: Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Hidalgo y Zacatecas; en control, prevalencia mayor al 2 % o desconocida: el resto del País. Sin embargo la prevalencia real de tuberculosis es menor al 2 % en

muchas regiones del País esto se puede observar en el figura 1 (SENASICA, 2009).

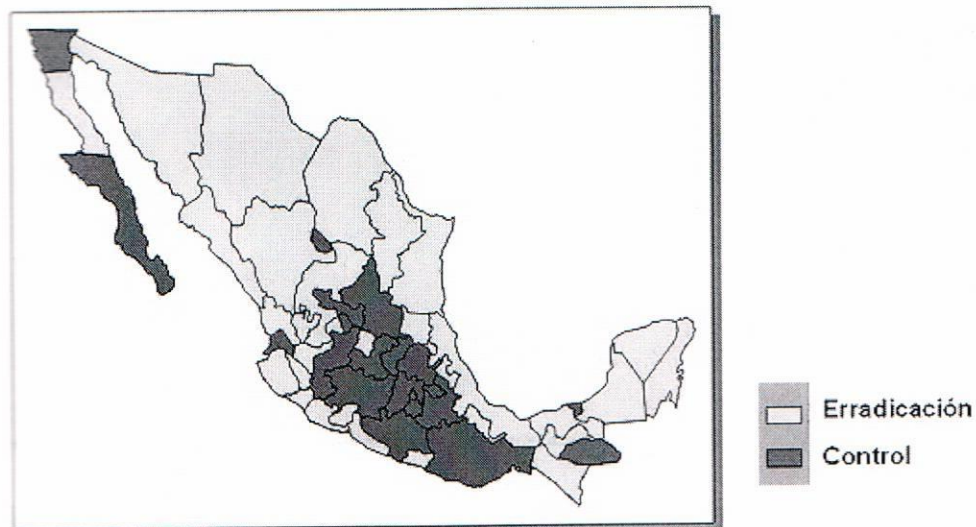


Figura 1. Situación actual contra tuberculosis bovina (SENASICA, 2009).

La clasificación de la USDA es la siguiente: acreditado modificado avanzado, prevalencia menor al 0.01 %: norte de Sonora; acreditado modificado, prevalencia menor a 0.1 %: sur de Sonora, las regiones clasificadas en la categoría "A" de los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Jalisco- Zacatecas, Nayarit, Nuevo León, Puebla y Veracruz; adicionalmente todo el territorio de los estados de Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas y Yucatán; acreditado preparatoria, prevalencia menor a 0.5 %: las regiones clasificadas en la categoría "A" de los Estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Michoacán y Tabasco. Adicionalmente todo el territorio del Estado de Colima; no acreditado, prevalencia mayor a 0.5 % o desconocida: resto del País observándose en la figura 2. (SENASICA, 2009).

Importancia. En el 2007 SAGARPA, dio un dictamen total final sobre el anteproyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-031-ZOO-1995, justificando este cambio a los reportes encontrados hasta ese año; la cual mencionaba que la presencia de la enfermedad causa efectos adversos al sector

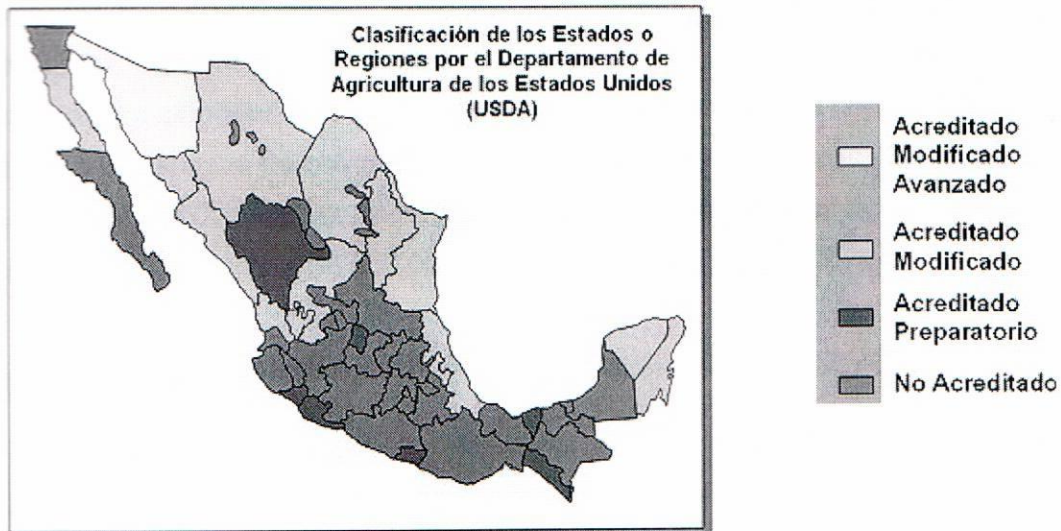


Figura 2. Clasificación de la USDA. (SENASICA, 2009).

pecuario disminuyendo la producción láctea hasta un 17 % (2,018'454,240 litros de leche al año), lo cual considerando que el precio de un litro de leche en promedio es de 3.50 pesos para el productor, representan pérdidas equivalentes a 7,064'589,840 pesos al año, también en el decomiso de bovinos infectados por tuberculosis en rastro y mataderos se tiene una cifra de 140'332,870 kilos de carne de bovinos al año, estimando un precio de 30 pesos por kilo en canal, representaría una pérdida equivalente a 4,290'686,100 pesos al año y en las pérdidas ocasionadas por la presencia de tuberculosis bovina (1'200,000 cabezas de bovinos exportadas, de 400 libras en promedio por animal), considerando un precio un precio de 1.40 dólares por libra, representa pérdidas equivalente a 7,392'000,000 de pesos.

Con respecto a la tuberculosis bovina, en el Estado de Sinaloa para el año 2002 los hatos infectados en cuarentenas eran 27 con aproximadamente 14,800 cabezas.

Con la finalidad de reactivar la comercialización de animales sanos, del 2002 al 2008 se han tenido 4 visitas de revisión técnica de los trabajos de la campaña por parte del Grupo Técnico Binacional México-EUA. Los cuales llevan a cabo el diagnóstico utilizando la prueba de rutina de la tuberculosis bovina. Mediante esta prueba –tuberculina- se efectúan los decomisos de canales de bovinos infectados por tuberculosis en rastro y mataderos, que para el periodo mencionado el

volumen es de 140'332,870 kilos, que estimada en un valor de 30 pesos por kilo en canal, representaría una pérdida equivalente a 4,209'986,100 de pesos. En ese mismo periodo, debido a los riesgos de salud, se ha dejado de exportar 1'200,000 cabezas de bovinos de Sinaloa hacia los EUA. Por lo que si se estima un peso de 400 libras por animal, a un precio de 1.40 dólares la libra, representa pérdidas equivalente a 36'000,000 de dólares (COFEMER ,2007).

2.2 Diagnóstico.

Aislamiento. La presencia de *M. bovis* en las muestras clínicas y en las obtenidas post-mortem puede demostrarse mediante el examen de frotis teñidos, y tal presencia puede confirmarse cultivando el microorganismo en un medio para el aislamiento primario. Los recipientes de las muestras deben estar limpios y con preferencia estériles (el uso de recipientes contaminados con micobacterias ambientales puede ocasionar errores en la identificación de la infección por *M. bovis* debido al rápido crecimiento de las micobacterias ambientales). La entrega rápida de las muestras al laboratorio aumenta las posibilidades de recuperar *M. bovis* en cultivo, pero si se prevén retrasos las muestras se deben refrigerar o congelar para retrasar en crecimiento de contaminantes y conservar las micobacterias. En condiciones de ambientes cálidos, cuando no es posible la refrigeración, se puede añadir como agente bacteriostático ácido bórico (concentración final de 0,5% [p/v]), pero solo por períodos limitados, inferiores a 1 semana. Al procesar las muestras para cultivo, primero se homogeniza el tejido utilizando un mortero, homogenizador y después se descontamina con un ácido o un álcali, como 5% de ácido oxálico o 2-4% de hidróxido sódico. La muestra se agita 10 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, se neutraliza. Se centrifuga la suspensión, se elimina el sobrenadante, y se utiliza el sedimento para cultivo y para examen microscópico.

Para el aislamiento primario, el sedimento se inocular por lo general en varios medios sólidos con huevo como el de Lowestein-Jensen, el medio base de Coletsos o el medio de Stonebrinks; estos medios deben contener piruvato o glicerol, o ambos. También se debería utilizar un medio con agar como el de Middlebrook 7H10 ó 7H11.

Los cultivos se incuban durante 8 semanas a 37°C con y sin CO₂. Se deben utilizar los medios en tubos con cierre hermético, para evitar la desecación. Los cultivos se examinan a intervalos durante el período de incubación para observar el posible crecimiento macroscópico. Cuando el crecimiento es visible, se preparan frotis y se tiñen por la técnica de Ziehl-Neelsen. Generalmente, el crecimiento de *M. bovis* se aprecia a las 3-6 semanas de incubación. *M. bovis* crece en medio de Lowenstein-Jensen sin piruvato, y crece peor cuando se añade glicerol. Los modelos característicos de crecimiento y de morfología de las colonias pueden suministrar un diagnóstico preliminar de *M. bovis*, que puede confirmarse por técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de la región de repeticiones directas (RFLP).

Postmortem. *M. bovis* se puede demostrar microscópicamente en frotis directos de muestras clínicas y en materiales tisulares preparados. La resistencia al ácido de *M. bovis* se suele demostrar con la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, aunque también puede utilizarse una tinción fluorescente de resistencia al ácido. También pueden dar resultados satisfactorios las técnicas con inmuno-peroxidasa. El diagnóstico preliminar de micobacteriosis se puede hacer si el tejido muestra lesiones histológicas características (necrosis caseosa, mineralización, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y macrófagos). La presencia en secciones histológicas de microorganismos ácido-resistentes puede no detectarse aunque *M. bovis* se pueda aislar del cultivo (OIE, 2009).

Tuberculinización. El método estándar para la detección de la tuberculosis bovina es la prueba de la tuberculina, que comprende la inyección intradérmica de tuberculina PPD bovina y la consiguiente detección de hinchazón (hipersensibilidad retardada) en el sitio de la inoculación 3 días después. Esto se puede llevar a cabo utilizando sólo tuberculina bovina o, en una prueba comparativa, con tuberculina aviar y bovina.

La reacción a la Tuberculina por parte del ganado infectado es una reacción de hipersensibilidad retardada, que alcanza su punto máximo aproximadamente 72 horas después de la inyección de la tuberculina (Monaghan, De la Rua, Adams) Aunque las tuberculinas PPD (Derivado Proteínico Purificado) son descritas como "puras", en realidad consisten en una mezcla compleja de proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos incluyendo una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales son comunes a varias especies de micobacterias.

En los Países Europeos, la prueba de la tuberculina se realiza en el medio del cuello, pero también se puede realizar en el pliegue caudal de la cola. La piel del cuello es más sensible a la tuberculina que la de la cola. Para compensar esta diferencia, se pueden utilizar mayores dosis de tuberculina en la cola. Ésta es la técnica más común América y Oceanía (Monaghan, et al; 1994).

La prueba intradérmica comparativa de la tuberculina se utiliza para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina bovina por exposición a otras micobacterias. Esta sensibilización se debe a la gran reactividad cruzada existente entre especies de micobacterias y géneros relacionados. La prueba consta de la inyección intradérmica de tuberculina bovina y de tuberculina aviar en sitios diferentes, por lo general, en el mismo lado del cuello, y la medida de la respuesta 3 días después. Se estima que la sensibilidad de la prueba de la tuberculina varía en un rango que va de 68 a 95%, mientras que la especificidad es de 96 a 99% (Monaghan, 1994; De la Rúa, 2006; Adams, 2001; Cousins, 2001).

IFN-gamma. En esta prueba se mide la liberación de una linfocina (interferón gamma) en un sistema de cultivo de sangre completa. El ensayo se basa en la liberación de interferón gamma por linfocitos sensibilizados durante un período de incubación de 16-24 horas con antígeno específico (tuberculina PPD). Esta prueba compara la producción de interferón gamma tras la estimulación con PPD bovina y aviar. La cuantificación del interferón gamma se realiza por un ELISA "sandwich" que utiliza dos anticuerpos monoclonales contra el interferón gamma bovino. La muestra se debe transportar al laboratorio y se debe realizar el ensayo entre 24-30 horas después de la obtención. Comparada con la prueba cutánea, la prueba posee una sensibilidad elevada pero parece menos específica en varios casos. No obstante, el uso de antígenos definidos de micobacterias promete mejorar la especificidad. Para animales de manejo difícil o peligroso, como el ganado excitado u otros bóvidos, presenta la ventaja sobre la prueba cutánea de que sólo necesitan ser capturados una vez (Gormley, 2006; Adams, 2001; Cousins, 2001; De la Rúa-Domenech, 2006).

Serología. Una prueba serológica sensible y específica para detectar anticuerpos contra *M. bovis* sería muy útil como reemplazo o suplemento de la prueba intradérmica. En general, la producción de anticuerpos contra las micobacterias es pobre, con variaciones entre individuos y generalmente detectable sólo en

etapas avanzadas de la enfermedad. La sensibilidad y especificidad de la mayoría de las pruebas serológicas hasta el momento desarrolladas, incluyendo una gran variedad de ELISAs con diferentes antígenos hasta ahora conocidos, han sido poco promisorias. Esto se atribuye al alto grado de polimorfismo en los patrones de reconocimiento antigénico en el ganado infectado, una cinética variable en la respuesta humoral, posible heterogeneidad de *M. bovis*, y alto grado de reacción cruzada entre especies de micobacterias. Sin embargo, no se desaniman los esfuerzos para mejorar este tipo de pruebas, pues son baratas, rápidas y fáciles de realizar. Probablemente la identificación de antígenos específicos mediante técnicas de biología molecular pueda mejorar la sensibilidad y especificidad de estas pruebas (Wood y Rothel, 1994; Adams, 2001; De la Rúa, 2006).

2.3 Características de *Mycobacterium bovis* y *M. smegmatis*.

***Mycobacterium bovis*.** Es un bacilo aerobio, no formador de spora, inmóvil, delgado y de hasta 4µm de longitud; en medios artificiales se observan cocoides y filamentosas con morfología variable de una especie a otra, se caracterizan por ser "acidorresistentes"; es decir que estos no se pueden decolorar con soluciones ácidas cuando han sido teñidos. La bacteria es un parásito intracelular facultativo, por lo general de los macrófagos, y tiene un lento tiempo de generación, 15-20 horas, una característica fisiológica que pueden contribuir a su virulencia (Quinn et al, 2002; Thoen y Barletta, 2004).

***Mycobacterium smegmatis*.** *M. smegmatis* fue la primera especie de micobacteria reconocida después de *M. tuberculosis*, es un bacilo ácido-alcohol resistente delgado, la colonia es habitualmente elevada, rugosa y de bordes festoneados; *M. smegmatis* fue aislada inicialmente de exudados de chancros en 1884 y de secreciones genitales en 1885, posteriormente no ha sido nunca recuperada a partir de esas mismas fuentes, aislándose del suelo y del agua, considerándose un microorganismo ambiental, por lo que, durante muchos años ha sido vista como una micobacteria no patógena y saprófita para algunos autores (Tyagui y Sharma 2002).

Similitudes entre *M. bovis* y *M. smegmatis*. *M. smegmatis* ha sido utilizado ampliamente como modelo para estudiar el sistema genético de las micobacterias

debido a su crecimiento rápido y a que no se le considera patógeno (Wang et al, 2005; Spratt et al, 2003). Asimismo se le ha utilizado como modelo de estudio de la tuberculosis (*M. tuberculosis*), pues se ha encontrado que posee un gran número de genes homólogos (Tyagi y Sharma, 2002; Converse y Cox, 2005; Wang et al, 2005). *M. tuberculosis* y *M. bovis* comparten el 99.95% de su genoma, de tal manera que las diferencias se deberían fundamentalmente a la expresión diferencial de los genes (Garnier et al, 2003). Por lo tanto *M. smegmatis* puede ser también un buen modelo para estudiar aspectos relacionados con *M. bovis*.

2.4 Antecedentes.

El inmunodiagnóstico preciso de la tuberculosis bovina es obstaculizado entre otras cosas por la falta de antígenos específicos. Una de las preparaciones de antígenos más frecuentemente utilizada es el Derivado Proteico Purificado (PPD), también conocido como tuberculina.

A pesar de ser ampliamente utilizado, el PPD está pobremente caracterizado. Muchas proteínas micobacterianas son extensamente desnaturalizadas por el procedimiento utilizado en su preparación, lo cual explica las dificultades para identificar constituyentes del PPD para caracterizar su comportamiento en cuanto a inmunogenicidad humoral y celular (Borsuk et al, 2009).

Dicho extracto crudo posee limitaciones cuando es utilizado en ensayos diagnósticos debido a la presencia de antígenos de reactividad cruzada, Santema y colaboradores en el 2009, plantearon el uso de herramientas proteómicas y genómicas combinadas partiendo de mezclas complejas de proteínas como las tuberculinas puede revelar nuevas proteínas ayudando al diagnóstico de enfermedades micobacterianas.

En 1994 se caracterizaron antígenos purificados de *M. bovis* donde observaron que aun puros variaban en su reconocimiento con sueros de animales enfermos, lo que una comprensión detallada de su inmunogenicidad ayudaría en el desarrollo de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas (Fifis et al, 1994).

A éste respecto Meikle y colaboradores (2009) utilizaron geles de doble dimensión y espectometría de masas, encontraron 11 fracciones protéicas, de las cuales las correspondientes a los genes *EsxI* y *HspX* fueron las más reconocidas en pruebas de IFN-gamma.

III. HIPÓTESIS

M. smegmatis presenta proteínas antigénicas de reacción cruzada con sueros hiperinmunes de derivados proteicos totales bovino y aviar, por lo que una comprensión detallada de su inmunogenicidad ayudaría en el desarrollo de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas en la tuberculosis bovina.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterización antigénica de derivados proteicos de *M. smegmatis* de reacción cruzada con PPD bovino PPD aviar.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtención de proteínas totales y sobrenadante de *M. smegmatis*.
2. Producción de sueros hiperinmunes contra derivados proteicos bovino, aviar y *smegmatis*.
3. Identificar proteínas de *M. smegmatis* de reacción cruzada con los PPD bovino y aviar.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Cultivo de *M. smegmatis*.

La cepa del *M. smegmatis* que se utilizó es la mc²155, tipo campo. Esta se cultivó en un medio sólido 7H11 (Difco BD), complementado con Tween 80 al 0.05% (v/v) y 0.2% de glicerol. Las placas se incubaron a una temperatura de 37° C, de este medio se inoculó una sola colonia a un medio de cultivo líquido 7H9 (Difco BD) al cual se le adicionó 0.05% (v/v) de Tween 80 y 0.2% (v/v) de glicerol, y se incubaron a 37°C. El crecimiento a media fase en el medio líquido se consideró como precultivo, a una densidad óptica de 600 nm (OD₆₀₀), 0.6 a 0.8 medido a través de un densitómetro (Fisher Scientific). Este precultivo se obtuvo por 30 h a 37°C en un agitador orbital (150 rpm) en 150 ml de medio de cultivo líquido. Después del precultivo las bacterias se depositaron en el medio Harman de Bont (HoeB) (Shleeva et al., 2004), que contenía 11.8 g de NaHPO₄·12H₂O, 1.7 g ácido cítrico, 20 g de (NH₄)₂SO₄, 30 ml de glicerol, 0.05% de Tween 80 y 10 ml de elementos traza que se diluyeron previamente por separado y se aforó a un litro de agua. Durante su preparación las sales se adicionaron en el orden de la lista propuesta: se diluyó en 965 ml de H₂O (EDTA [0.01 g], MgCl₂·6H₂O [0.1 g], CaCl₂·2H₂O [1 mg], NaMoO₄·2H₂O [0.2 mg], CoCl₂·6H₂O [0.4 mg], MnCl₂·2H₂O [1 mg], ZnSO₄·7H₂O [2 mg], FeSO₄·7H₂O [5 mg], CuSO₄·5H₂O [0.2 mg]). Por último se ajustó el pH a 7.

5.2 Extracción de proteínas.

Una vez que el cultivo entra en fase estacionaria a una densidad óptica de 2.5 a 600 nm. El sobrenadante de cultivo (SN) y las células bacterianas se separaron a 2.500 x g 15 min a 4° C, donde el SN se le agregó 5 volúmenes de etanol absoluto y se congelaron a -20°C por 24 horas, después se obtuvieron proteínas del SN centrifugando a 12 000 rpm por 1 hora a 4°C y en el precipitado obtenemos los antígenos del SN. Por otro lado, las células bacterianas, se lavaron, se suspendieron en HEPES 10 mM pH 7.4, se fraccionaron con un sonicador al 50% de capacidad máxima, dándole de 6 ciclos de 60 segundos con descanso de 30 seg., en baño de hielo, los desechos se separaron a 2500 x g 20 min y en el sobrenadante se obtuvieron las proteínas totales de la bacteria (antígenos totales) (Rapp et-al, 1986).

La cuantificación de proteínas se determinó por la técnica de micro Bradford, haciendo una curva tipo con BSA (albumina sérica bovina) como estándar; en una

placa de ELISA de 96 pozos se colocaron 150 μ L de PBS + 10 μ L de BSA a diferentes concentraciones (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, y 0.156 μ g) + 40 μ L de Bradford 5 X, de igual manera se cuantificaron las proteínas obtenidas del cultivo bacteriano (150 μ L de PBS + 10 μ L de proteínas + 40 μ L de Bradford 5X) cada muestra se realizó por triplicado y después se leyó a una densidad óptica a 600 nm en un lector de ELISA (Bradford, 1976).

5.3 Producción de sueros hiperinmunes.

Los Derivados Proteicos Purificados de bovino y aviar que se utilizaron se obtuvieron por donación por parte del Comité Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina en el Estado de Sinaloa. Estos son producidos por el laboratorio Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, con el registro de SAGAR No. B0653-035. Los lotes de estas tuberculinas son 3320083 con fecha de caducidad febrero del 2011 y 3120653 con fecha de caducidad diciembre de 2009, respectivamente.

Para la obtención de sueros hiperinmunes, se produjeron a partir de los antígenos derivado proteicos purificados bovino y aviar (PPDb y PPDa, respectivamente), proteínas de secreción y totales de *M. smegmatis*. A 12 cabras con edades de 8 a 18 meses de edad. La vía de inyección elegida fue la subcutánea con las siguientes dosis y preparación:

A cuatro lotes de 3 cabras se les aplicó PPD bovino, PPD aviar, Proteínas totales de *M. smegmatis* (PTMs) y las proteínas de secreción del sobrenadante (PSMs) de *M. smegmatis*. La dosis utilizada se describe en el cuadro 1.

Las fechas de inmunización fueron las siguientes:

5/6/9, 13/6/9, 19/6/9 y 27/6/9

Cuadro 1. Contenido de los reactivos inyectados.

Reactivo	Dosis
PPDb	10 μ g/kg
PPDa	10 μ g/kg
PTMs	10 μ g/kg
PSMs	10 μ g/kg
A cada dosis se añadió	
dodecilsulfato de sodio al 2%	0.82 μ g/kg
β -mercaptoetanol	0.21 μ g/kg
AIOH	Se agrega una parte proporcional a la cantidad de líquido formado por la mezcla de antígenos y conservadores

Cuadro 2. Descripción de los animales usados para la producción de antígenos.

No. pro. y sexo	No. Arete	Descripción	Edad
H1 ^a	4427	Baya, manchada con blanco y motilona 10 kg	8 m
H2 ^b	4428	Alazana con raya de mula y con cuernos 12 kg	10 m
H3 ^b	4426	Prieta, franjas blancas en la cara, vientre blanco, motilona 16 kg	10 m
H4 ^a	4429	Prieta con panza blanca y una mancha en flanco derecho con cuernos 18 kg	16 m
H5 ^a	4430	Baya, cola negra, frente negra, con cuernos 27 kg	18 m
H6 ^a	4431	Baya, motilona, manchas claras, y peluda de los cuartos traseros 10 kg	8 m
H7 ^{PTMs}	S/A	Macho, blanco, con cuernos y sin orejas 24 kg	10 m
H8 ^{PTMs}	4432	Alazana, con cuernos, peluda de los cuartos traseros 18 kg	16 m
H9 ^{PTMs}	4433	Prieta, con un cuerno mocho, vientre blanco con rayas en la cara 12 kg	10 m
H10 ^{PSMs}	14	Manchada payasa con un peso de 30 kg amarillo	24 m
H11 ^{PSMs}	245	Café con un peso de 25 kg naranja	24 m
H12 ^{PSMs}	13	Blanca con cuernos de 30 kg amarillo	24 m

Claves usadas: H corresponde a la identificación del sexo hembra o M a macho, seguido de un número progresivo, las letras exponenciales corresponden al tipo de antígeno utilizado; i.e. ^b, tuberculina bovina; ^a, tuberculina aviar; ^{PTMs}, Proteínas totales de *M. smegmatis*; ^{PSMs}, proteínas de la secreción en el sobrenadante de *M. smegmatis*.

Se obtuvieron sueros preinmunes antes de inocular a cada animal y los sueros hiperinmunes se obtuvieron a las 5 semanas, sangrando al animal de la vena yugular.

5.4 Electroforesis y Western blot.

Los sueros hiperinmunes producidos en cabras se evaluaron al reaccionar con sus propios antígenos, los antígenos fueron separados en gel de poliacrilamida al 12% y transferidos a papel de nitocelulosa, e incubados con cada suero hiperinmune (los cuales fueron diluidos 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000 y 1:10 000), después se le realizó el reconocimiento por medio de Western blot.

La identificación de proteínas antigénicas de reacción cruzada de PTMs y PSMs con los sueros hiperinmunes se realizó de la siguiente manera: Las PTMs y PSMs fueron separadas en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio, estas fueron transferidas a papel de nitocelulosa e incubados con sueros

hiperinmunes de PPD_b, PPD_a y PTMs (1:100), la reacción se identifica al agregar proteína A peroxidada (1:1000) y revelada con diaminobencidina (Towbin et al, 1979).

5.5 Análisis de los datos.

Los datos obtenidos serán procesados mediante comparación simple.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

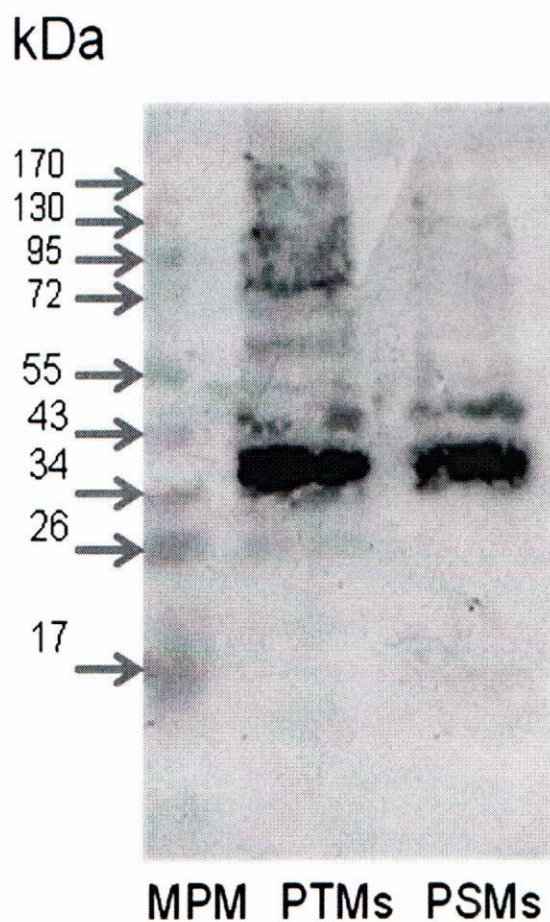


Fig. 3 Gel de poliacrilamida (12%) teñido con azul de Coomassie. **MPM:** marcador de peso molecular, **PTMs:** proteínas totales de *M. smegmatis*, **PSMs:** proteínas del sobrenadante de *M. smegmatis*.

Para comprobar la integridad de las proteínas se corrieron muestras de proteínas totales y proteínas de sobrenadante en electroforesis para separarlas según su peso molecular y se tiñeron con azul de coomasie para identificar las bandas principales y asegurar que no hubo degradación (Rapp et al, 1986).

6.2. VERIFICACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE

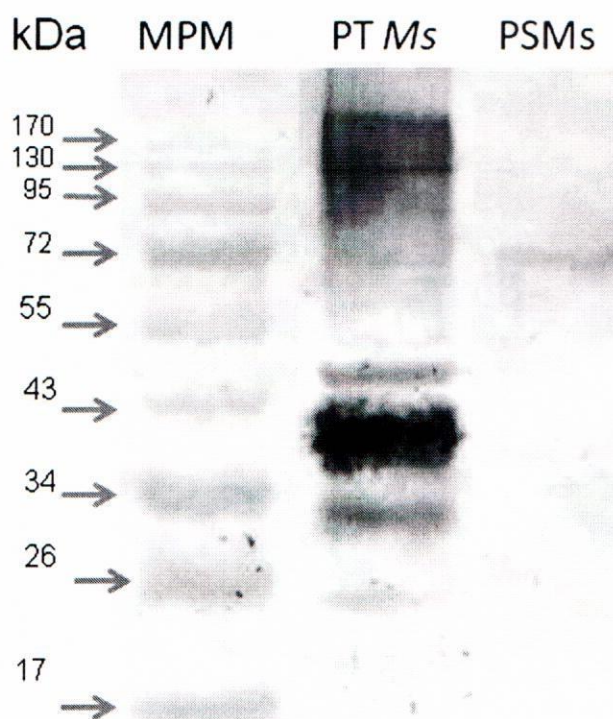


FIG. 4 Proteínas totales reaccionando con su suero homólogo. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, revelado con diaminobenzidina. MPM: marcador de peso molecular, PTMs: proteínas totales de *M. smegmatis*, PSMs: proteínas del sobrenadante de *M. smegmatis*.

Para encontrar los sueros más apropiados en cuanto a su reactividad, se llevo a cabo el desafío contra los antígenos utilizados en la inmunización. Al mismo tiempo se buscaba encontrar la dilución óptima de trabajo, según lo reportado por Garbaccio y Cataldi (2010), la cual fue 1:100.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE REACCIÓN CRUZADA.

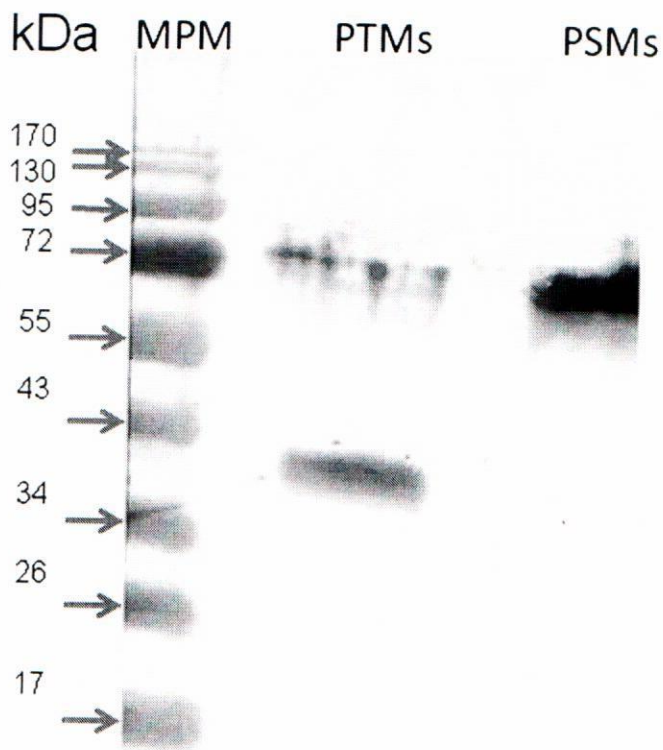


FIG. 5 Proteínas de *M. smegmatis* reaccionando con suero anti-PPD bovina. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, revelado con diaminobenzidina. MPM: marcador de peso molecular, PTMs: proteínas totales de *M. smegmatis*, PSMs: proteínas del sobrenadante de *M. smegmatis*.

Se puede observar que se encontraron dos bandas; una entre los 34 y 43 kDa presente únicamente en la fracción de proteínas totales y otra cercana a los 72 kDa tanto en proteínas totales como de sobrenadante. Éstas son las principales proteínas de reacción cruzada entre *M. smegmatis* y *M. bovis*.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE REACCIÓN CRUZADA.

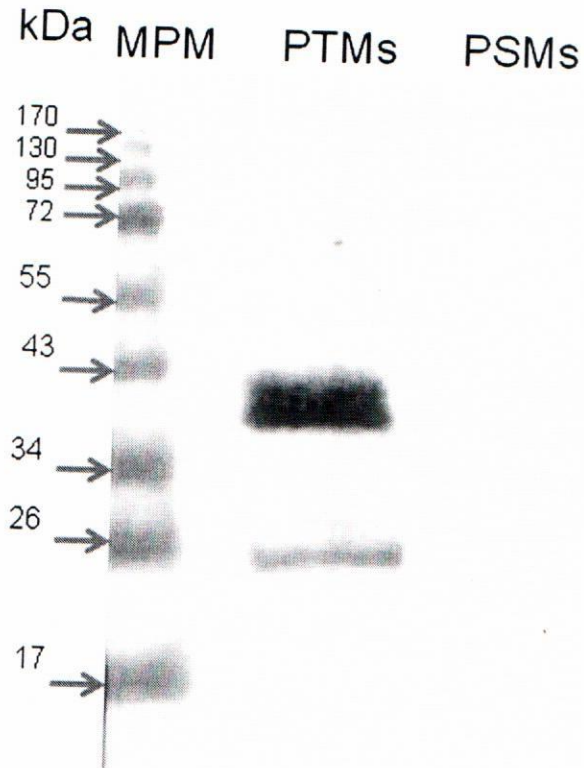


FIG. 6 Proteínas de *M. smegmatis* reaccionando con suero anti-PPD aviar. Transferencia en membrana de nitrocelulosa, revelado con diaminobenzidina. MPM: marcador de peso molecular, PTMs: proteínas totales de *M. smegmatis*, PSMs: proteínas del sobrenadante de *M. smegmatis*.

Se puede observar que se encontraron dos bandas; una entre los 34 y 43 kDa, y otra cercana a los 26 kDa, presentes únicamente en la fracción de proteínas totales. Éstas son las principales proteínas de reacción cruzada entre *M. smegmatis* y *M. avium*.

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Se presentan 2 bandas de reacción cruzada en PTMs de aproximadamente 72 y 39 kDa, y en el SMs sólo una de 72 kDa.

Se presentan 2 proteínas de reacción cruzada en PTMs de 39 y 26 kDa, y en el SMs no se presentó.

Esto nos indica que las proteínas de 72 kDa de Ms puede identificar *M. bovis* Y la de 26 kDa puede identificar específicamente *M. avium*.

La proteína de 39 kDa que es la que reconocen los sueros anti-PPD bovina y aviar, podría ser probada como un antígeno a utilizarse como inmunógeno en general contra micobacterias, debido a su fuerte inmunogenicidad.

Estudios previos se han centrado en antígenos específicos, sin embargo las bandas reportadas aquí no coinciden con las principales proteínas estudiadas en dichos estudios, que se refieren principalmente a proteínas de bajo peso molecular como ESAT-6 y CPF- 10*, u otras de mayor peso molecular como los antígenos 80 y 85* (Harboe et al, 1992; koo et al 1995) .

Se concluye que se debería seguir indagando en la caracterización de dichos grupos de proteínas para explorar sus posibilidades como antígenos para diagnóstico o inmunógenos.

*NOTA: Los números coinciden con su peso molecular en kDa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, L.,G. (2001) In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 20(1),304-324.
- Borsuk, S., Newcombe, J., Mendum, T.A., Dellagostin, O. A., Mc Fadden, J. (2009) Identification of proteins from tuberculin purified derivative (PPD) by LC-MS/MS. Tuberculosis (Edinb). 2009 Nov;89(6):423-30.
- COFEMER -Comisión Federal de Mejora Regulatoria- (2007), disponible en: <http://www.cofemermir.gob.mx/.../13553.66.59.1.MIR-NOM-TB-ADEC-COFEM-JUN-07.doc>
- Converse, S.E. and Cox J.S. (2005) A protein secretion pathway critical for *Mycobacterium tuberculosis* is conserved and functional in *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology. Vol.187, No.4, 1238-1245.
- Cousins, D.V. (2001) infection and control in domestic livestock. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 20(1), 71-85.
- De la Rua-Domenech, R., Goodchild , A.T., Vordemeier, 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, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Research in Veterinary Science. 81 , 190-210.
- Diario Oficial de la Federación (2007). Proyecto de Modificación a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-ZOO-1995, CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA (*Mycobacterium bovis*). Disponible en <http://www.dof.gob.mx/documentos/2963/sagarpa/sagarpa.htm>
- Fifis, T., Rothel, J.S., Wood, P.R. (1994) Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation. Vet Microbiol. Mayo;40(1-2):65-81.
- García C. L., Millán, S.F., Anaya E. A. (2005) Situación de la tuberculosis bovina en México, 1990-2004. XXIX Congreso Nacional de Buiatría; AMMVEB., 25-31, Puebla, Mex.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G. (2003) The

- complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS, June 24, vol. 100, no. 13, 7877–7882.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzimons, T., McGill, K., Collins, J.D. (2006) Diagnosis of *Mycobacterium bovis* in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology*. 112, 171-179.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Nagai, S. (1992) Protein antigens of Mycobacteria studied by quantitative immunologic techniques. *Clinical Infectious Diseases*. Vol 14, No. 1, 313-319.
- Koo, H.C., Park Y.H., Ahn, J., Waters, W.R., Palmer, M.V., Hamilton, M.J., Barrington, G., Mosaad, A.A., Park, K.T., Jung, W.K., Hwang, I.Y., Cho, S.N., Shin, S.J., y Davis W.C. (2005) Use of rMPB70 protein and ESAT-6 Peptide as antigens for Comparison of the enzyme-linked immunosorbent, immunocromatographic, and latex bead agglutination assays for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 44:498-4506.
- Meikle, V., Alito, A., Llera, A.S., Gioffré, A., Peralta, A., Buddle, B.M., Cataldi, A. (2009) Identification of novel *Mycobacterium bovis* antigens by dissection of crude protein fractions. *Clin Vaccine Immunol*. Sep;16(9):1352-9.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.P., Quinn, P.J. (1994) The tuberculin test. *Vet Microbiol*. May;40(1-2):111-24.
- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J. (1994) Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol*. 40, 41–52.
- OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. Tuberculosis Bovina. http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.03_Tuberculosis_bovina.pdf. Acceso el día 24 de julio del 2009.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C. (2007) Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Pathology*, 44: 863-874.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (2002) *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. 3ra ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Santema, W., Overdijk, M., Barends, J., Krijgsveld, J., Rutten, V., Koets, A. (2009) Searching for proteins of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diagnostic potential by comparative qualitative

- proteomic analysis of mycobacterial tuberculins. *Vet Microbiol.* Jul 2;138(1-2):191-6.
- SENASICA. (2009) Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible en <http://148.243.71.63/default.asp?id=801> acceso el 28 de julio del 2009.
- Smeulders, M.J., Keer, J., Speight, R.A., Williams, H.D. (1999) Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *Journal of Bacteriology.* Jan, Vol.181, No.1, 270-283.
- Spratt, J.M., Britton, W.J., Triccas, J.A. (2003) Identification of strong promoter elements of *Mycobacterium smegmatis* and their utility for foreign gene expression in mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters.*224, 139-142.
- Thoen, C.O., and Barletta, R.G. (2004) *Mycobacterium* En: Pathogenesis of bacterial infections in animals / edited by Carlton L. Gyles ... [et al.].3rd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp 69-76.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Biochemistry*, Vol.76, No.9, 4350-4354.
- Tyagui, J.S., Sharma, D. (2002). *Mycobacterium smegmatis* and tuberculosis. Carta al editor. *Trends in Microbiology.* Vol.10 No.2.
- Wang, R., Prince, J.T., Marcotte, E.M. (2005) Mass spectrometry of the *M. smegmatis* proteome: protein expression levels correlate with function, operons and codon bias. *Genome Research*, 1:1118-1126.
- Weber, K., and Osborne, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol.244, No.16, 4406-4412.
- Wood, P.R., and Rothel, J.S. (1994) In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 40, 125-135.