

Evaluación de la protección e interferencias diagnósticas en la vacunación parental de cabras con vacuna de *Mycobacterium bovis* inactivado por calor



Tania Perálvarez Puerta

Máster Universitario en Zoonosis y Una Sola Salud

Curso 2016-2017

Director: Bernat Pérez de Val

CReSa

ÍNDICE

Apartado	Página
1. Abstract	1
2. Introducción	2
2.1. Tuberculosis humana: Etiología y epidemiología	2
2.2. Tuberculosis zoonótica	2
2.2.1 <i>M. bovis</i>	3
2.2.2 <i>M. caprae</i>	4
2.3. Estrategias de control y erradicación	5
2.3.1 Necesidad de vacunación	6
2.3.2 BCG	7
2.3.3 Vacuna <i>M. bovis</i> inactivada (MBI)	8
2.4. Diagnóstico	9
2.4.1 Diagnóstico DIVA: ESAT-6 y CFP-10 (EC)	9
3. Objetivos	10
4. Material y métodos	10
4.1 Animales y diseño experimental	10
4.2 Declaración de ética	11
4.3 Vacunas	11
4.4 Desafío con <i>M. caprae</i>	12
4.5 Prueba de liberación de IFN- γ	12
4.6 Detección de anticuerpos frente a CMT	12
4.7 Necropsia	13
4.7.1 Examen post-mortem	13
4.7.2 Bacteriología	13
4.8. Análisis de datos	13
5. Resultados	14
5.1 Signos clínicos y condición corporal	14
5.1.1 Temperatura corporal	14
5.1.2 Evolución del peso corporal	15
5.2 Respuesta inmunológica tras la vacunación y la infección	16
5.2.1 Prueba de liberación de IFN- γ	16
5.2.1.1 Resultados cuantitativos	16

5.2.1.2 Resultados cualitativos	18
5.2.2 Detección de anticuerpos frente a complejo <i>M. tuberculosis</i>	19
5.3 Patología	20
5.3.1 Volumen de lesiones en linfonodos pulmonares	20
5.3.2 Lesiones extrapulmonares	21
5.3.3 Carga bacteriana	21
6. Discusión	22
7. Conclusiones	25
8. Bibliografía	27

1.Abstract

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que causa gran mortalidad y morbilidad globalmente en la especie humana. *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* son las principales micobacterias patógenas para los animales, y por lo tanto las de mayor potencial zoonótico. Es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que incrementen el control de la TB en animales, y la vacunación preventiva se considera una de las mejores opciones alternativas o complementarias a la estrategia de prueba y sacrificio. En este trabajo se evalúa la eficacia de la vacunación parenteral con una vacuna de *M. bovis* inactivado por calor (MBI) en cabras y sus interferencias diagnósticas. Para ello, se disponía de tres grupos de cabras (N=7 cada uno): un grupo control, un grupo vacunado con BCG, y otro grupo vacunado con MBI. Posteriormente, a todas las cabras se les inoculó *M. caprae* por vía endobronquial. Finalmente, los resultados de signos clínicos, las pruebas de interferón-gamma (IFN- γ) y detección de anticuerpos, la evaluación cuantitativa de lesiones tuberculosas y carga bacteriana de los tres grupos se compararon. Los resultados sugieren que la vacuna MBI protege las cabras frente a la infección, y además que la vacuna interfiere en el diagnóstico de la TB mediante la prueba del IFN- γ basada en tuberculinas, aunque esta interferencia prácticamente desaparece cuando se utilizan reactivos DIVA.

2. Introducción

2.1. Tuberculosis humana: Etiología y epidemiología

La tuberculosis (TB) es una enfermedad reemergente y un problema de salud causada por miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Este grupo de organismos incluye patógenos para el ser humano y los animales como *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* y *M. caprae* (Esteban and Muñoz-Egea, 2016).

La TB es una importante causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Sotgiu et al., 2017). Se estiman 1,5 millones de muertes anuales (Dürr et al., 2013) y además un tercio de la población mundial podría tener una infección tuberculosa latente (WHO., 2016). Es difícil estimar la incidencia real de TB, debido a las dificultades al identificar casos, sobretodo en casos extrapulmonares o casos pulmonares con baja carga bacilar, y también las infecciones latentes. Según el informe global de la OMS publicado en 2016, en 2015 se produjeron 10,4 millones de casos incidentes (WHO., 2016).

La OMS implementó desde 1993 varias estrategias de salud pública para la erradicación de TB. Esto tuvo un gran impacto epidemiológico y ayudó a disminuir los nuevos casos y muertes, pero otros factores, como la coinfección con VIH y las resistencias de antibióticos han retrasado la eliminación de la TB hasta 2050 (Sotgiu et al., 2017).

2.2. Tuberculosis zoonótica

Se define como tuberculosis zoonótica, aquella TB que se transmite de forma natural de los animales al ser humano. Los principales agentes causantes de la TB en animales son *M. bovis* y *M. caprae*. La transmisión de estos microorganismos a humanos se produce por ingestión mediante consumo de productos lácteos no pasteurizados y por el contacto directo con animales infectados, ya sea por inhalación o contacto de mucosas y heridas. Normalmente, está relacionada a una exposición profesional (De La Rúa-Domenech, 2006; Rodríguez et al., 2009).

Recientemente se ha evaluado la prevalencia global de casos de TB humana contraída por fuentes animales mediante un meta-análisis. Se ha determinado que la proporción de TB zoonótica es de $\leq 1,4\%$ en países fuera de África y $2,8\%$ de media en países africanos (Prodinger et al., 2014).

Otros estudios han estimado que la incidencia actual de *M. bovis* en humanos sería de entorno a un 3% de los casos de TB humana que se producen en el mundo, aunque en países en vías de desarrollo puede alcanzar el 10% y algunos países como Tanzania se ha detectado hasta un 16% (Esteban and Muñoz-Egea, 2016). Por otro lado, la incidencia de infección en humanos con *M. caprae* no excedería el 0,3% del total de casos de TB y la mayoría se centrarían en Europa (Nebreda et al., 2016).

No obstante, la incidencia real de TB zoonótica todavía se desconoce debido a que en muchos países no existe una vigilancia rutinaria, sobre todo en los de renta baja donde la TB es endémica. Otra dificultad es que las técnicas diagnósticas rutinarias de TB no pueden diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis* (Olea-Popelka et al., 2016). Además, la tuberculosis zoonótica también puede estar relacionada con infección extrapulmonar y cursar sin sintomatología respiratoria, y debido a estas características, la enfermedad podría estar infradiagnosticada (Dürr et al., 2013; Nebreda et al., 2016).

En cuanto a la TB en los animales, se estima que hay más de 50 millones de animales de producción infectados en el mundo. Esto supone un coste de 3 billones de dólares anuales. Estas pérdidas económicas, que afectan sobre todo a la industria ganadera, incluyen costes asociados con el diagnóstico, sacrificio de los animales infectados, pérdidas de acuerdos comerciales, restricciones de movimiento, indemnizaciones y el mantenimiento de los programas de control (Waters et al., 2012).

2.2.1 M. bovis

M. bovis es miembro del CMT y presenta un amplio rango de huéspedes (De La Rua-Domenech, 2006). Es el principal agente causante de la TB bovina, una enfermedad importante en el ganado bovino, pero también se ha aislado en muchas especies de mamíferos como cabras, ciervos, cerdos, gatos, perros, caballos y ovinos (Esteban and Muñoz-Egea, 2016; Olea-Popelka et al., 2016).

M. bovis también afecta a humanos, y es considerado la principal causa de tuberculosis zoonótica globalmente. Es resistente en el ambiente pudiendo llegar a sobrevivir hasta varios meses, y esto potencia el riesgo de infección. Pocas veces se considera una transmisión de humano a humano, pero se han reportado algunos casos (Sunder et al., 2009). Se ha aislado *M. bovis* en muestras pulmonares y esputos humanos, y esto puede

indicar que la transmisión por aerosol entre humanos es posible (Esteban J, Muñoz-Egea M. 2016). También se han descrito brotes nosocomiales con alta mortalidad de *M. bovis* multiresistente en personas infectadas por el VIH (Rodríguez et al., 2009).

Poder distinguir los diferentes miembros de CMT es esencial para la investigación epidemiológica de casos humanos y para el tratamiento adecuado de los pacientes. La mayoría de de cepas de *M. bovis* son resistentes a la pirazinamida, y por lo tanto este antibiótico no podría usarse en caso de sospecha de tuberculosis zoonótica (De La Rúa-Domenech, 2006; Olea-Popelka et al., 2016).

Aunque hay algunas diferencias morfológicas y bioquímicas entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, ambos organismos están muy estrechamente relacionados y la enfermedad que producen en humanos es indistinguible clínicamente, radiológicamente, patológicamente o por microscopía. La diferenciación entre estos organismos sólo es posible con técnicas de cultivo y tipificación molecular. Es necesario cultivar la micobacteria y diferenciar los organismos aislados según las propiedades de crecimiento en el cultivo, tests bioquímicos y técnicas moleculares. Diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* requiere el uso de métodos basados en marcadores moleculares específicos, ya que los miembros de CMT tienen un 99.9% de similitud a nivel de genoma e idénticas secuencias de ARN (De La Rúa-Domenech, 2006).

2.2.2 *M. caprae*

En 1999, debido al patrón bioquímico y molecular que presentaban los aislados de CMT a partir de muestras de tejido patológico en caprinos en España, se propuso la denominación taxonómica *M. tuberculosis* subespecie *caprae*. Posteriormente en 2003, tras una mayor caracterización de sus propiedades bioquímicas, moleculares y de su perfil de susceptibilidad a antimicrobianos, se le elevó al rango de especie como *M. caprae* (Aranaz et al., 2003).

M. caprae presenta una combinación específica de características fenotípicas, bioquímicas, genéticas i genómicas, algunas de las cuales también están presentes en otros miembros del CMT. Por ejemplo, sus colonias tienen la misma morfología que las de *M. bovis* y también comparten características bioquímicas (no acumulan niacina). Por otro lado, varias características distinguen *M. caprae* de *M. bovis*. *M. caprae* es

evolutivamente más antiguo y no está globalmente distribuido, y además es sensible a la pirazinamida (Aranaz et al., 2003; Prodinge et al., 2014).

M. caprae ha sido aislado en muchas especies animales, pero la infección en bovino es la más ampliamente distribuida geográficamente. Las especies salvajes también pueden ser huéspedes, como el ciervo rojo y el jabalí. Se transmite a humanos a través del ganado, principalmente cabras y bovinos; y, aunque se trata de un patógeno zoonótico, todavía no se ha reportado la transmisión entre humanos. Las infecciones en humanos con *M. caprae* son escasas globalmente gracias a las campañas de erradicación y las medidas preventivas en contra la TB bovina. No obstante, en regiones de Europa central donde *M. caprae* es el principal agente causante de TB en el ganado, también es el principal patógeno causante de TB zoonótica. (Nebreda et al., 2016; Prodinge et al., 2014).

Hay evidencia de que los rebaños de cabras infectados con TB son un riesgo para los bovinos vecinos. La proporción de *M. caprae* aislada en ganado bovino ha aumentado en los últimos años, especialmente en zonas con alta densidad de caprinos (Napp et al., 2013).

En los últimos años, *M. caprae* ha recibido más atención por dos razones. Por un lado, ha sido aislado en países no europeos por primera vez y esto demuestra que tiene una distribución más amplia de lo que se esperaba. Por otro lado, los brotes en animales domésticos y salvajes tienen más interés debido a la transmisión zoonótica y el riesgo para los humanos (Prodinge et al., 2014).

2.3. Estrategias de control y erradicación

Son necesarios más esfuerzos para disminuir globalmente la TB y se requiere un compromiso político tanto global como nacionalmente para llegar a aplicar las recomendaciones de diagnóstico, tratamiento y prevención. Un nuevo diagnóstico más rápido, tratamientos efectivos y una vacuna preventiva efectiva podrían suponer la solución (Sotgiu et al., 2017).

En cuanto a la TB zoonótica es necesario evaluar la prevalencia real en humanos. Para llevarlo a cabo se deben implementar estrategias efectivas rutinarias para la vigilancia de los casos y ampliar el uso de las técnicas diagnósticas apropiadas. Serán necesarias

nuevas directrices para establecer prioridades y campañas de salud pública para educar a la población y profesionales sanitarios para prevenir, diagnosticar y tratar la enfermedad (Olea-Popelka et al., 2016).

Para el éxito de estas acciones a corto y largo plazo es necesaria la colaboración entre clínicos, investigadores, médicos y profesionales de la salud pública en ciencias médicas, veterinarias, sociales y económicas (Olea-Popelka et al., 2016).

2.3.1 Necesidad de vacunación

El concepto *One Health* insiste en la necesidad de estrategias para controlar la TB humana y animal basándose en sus puntos en común, como sería el desarrollo de vacunas universales (Pérez De Val et al., 2013). La investigación para una vacuna preventiva de TB, que sea aplicable profilácticamente y/o post-exposición, es una necesidad urgente (Cardona and Williams, 2017).

En muchos países se ha erradicado la TB bovina gracias a los programas de control que se basan en la Intradermotuberculización (IDT) y sacrificio de animales positivos, en la vigilancia postmortem en mataderos y el control de movimientos de los rebaños (Vordermeier et al., 2016). Aún así, las cabras infectadas pueden ser una fuente de infección para el bovino y en la Unión Europea no existe una campaña de control de la TB caprina. Los programas de erradicación que se basan en el sacrificio de animales positivos suponen pérdidas económicas para los productores y el sector público; y reducir la prevalencia de la enfermedad mediante la vacunación ayudaría a disminuir estos costes (Pérez De Val et al., 2013).

Existen muchos reservorios salvajes de los miembros del CMT que tienen una distribución global, y por lo tanto las estrategias rutinarias de control basadas en la IDT no son suficientes y la prevalencia de la enfermedad se mantiene en muchos países. Por este motivo, el desarrollo de nuevas herramientas de control de la TB en fauna salvaje y el ganado doméstico son muy necesarias (Waters et al., 2012). Se han realizado estudios para el control de la TB en fauna salvaje, y se ha visto que su vacunación es una buena herramienta para reducir la infección de *M. bovis* (Garrido et al., 2011).

2.3.2 BCG

La vacunación contra TB ha sido estudiada en humanos y en modelos animales con vacunas vivas atenuadas como el *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), BCG recombinantes, cepas mutantes de micobacterias o vacunas de subunidades proteicas; y también con vacunas basadas en cepas virulentas inactivadas (Garrido et al., 2011).

Se ha descrito que la vacunación es el mejor método para controlar la TB en el ganado a largo plazo (Pérez De Val et al., 2013). Con relación al ganado bovino existe un interés en el uso de vacunas de TB debido al impacto que tiene en el sector agroalimentario y la dificultad de controlar la enfermedad. No obstante, no hay vacunas específicas para los animales domésticos, sólo está disponible la vacuna humana BCG, que de hecho es una cepa atenuada de *M. bovis* (Buddle et al., 2016). Esta vacuna ha sido muy utilizada contra la TB en humanos, aunque tiene una eficacia variable.

La vacuna BCG tiene varios aspectos positivos, por ejemplo, es segura y barata de producir. Pero por otro lado, en el ganado bovino, aunque se ha observado que induce niveles significantes de protección en un ámbito experimental, en pruebas de campo los resultados no han sido tan favorables (Buddle et al., 2005). Esto puede ser debido diversos factores como el uso de diferentes cepas de BCG administradas, una exposición previa a micobacterias ambientales o una falta de inmunidad protectora a largo plazo. Según varios estudios de eficacia en terneros, la vacuna es efectiva cuando se administra en dosis relativamente bajas por vía subcutánea, o en dosis altas por vía oral. Además es mejor vacunar los animales cuando son jóvenes (< 1 mes de edad), ya que se inducen niveles más altos de protección (Vordermeier et al., 2016).

Otro de los problemas al vacunar el ganado son las posibles interferencias con el diagnóstico de la enfermedad, ya que podrían volver sensibles a los animales a las pruebas para detectar la TB (Buddle et al., 2016; Jones et al., 2016). Por este motivo, la vacunación de ganado con BCG está prohibida en la UE (Pérez de Val et al., 2016).

Se ha estudiado el efecto que producía la vacunación oral de ganado bovino con BCG sobre la IDT, y se observó que genera un porcentaje de animales positivos a la prueba. En cambio, pocos animales vacunados tenían respuesta positiva a la tuberculina comparada y al IFN- γ (Buddle et al., 2005).

En relación a la seguridad de la vacuna, solo se han reportado reacciones locales en tejones y algunas reacciones sistémicas en ganado, pero depende de la cepa, la dosis y la vía de administración (Beltrán-Beck et al., 2014). También se ha estudiado la supervivencia de BCG en los tejidos, para evaluar el riesgo de la carne o productos lácteos de los animales vacunados. Algunos estudios sugieren que no hay bacilos viables en los tejidos tras varias semanas post-vacunación (Pérez de Val et al., 2016).

2.3.3 Vacuna *M. bovis* inactivada (MBI)

Actualmente, la vacuna BCG es la única disponible para prevenir la TB en animales, pero se están desarrollando nuevas vacunas para mejorar la eficacia y bioseguridad (Beltrán-Beck et al., 2014).

Estudios en jabalí demostraron que la vacunación oral y parenteral con vacuna basada en una cepa de *M. bovis* inactivada (MBI) produce una respuesta de anticuerpos similar a la vacunación con BCG y a la infección natural con *M. bovis*, y por lo tanto les protege de la enfermedad (Garrido et al., 2011).

La vacuna inactivada por calor reduce la prevalencia de lesiones compatibles con TB en lechones de jabalí. Esto sugiere que protege de la infección en vez de la progresión de la enfermedad y también que podría evitar que las infecciones latentes evolucionen a enfermedad (Díez-Delgado et al., 2016).

Es importante evaluar si los antígenos de la vacuna sensibilizan los animales y causan falsos positivos en el diagnóstico de TB. En un estudio, se demostró que la administración oral en ciervos no causaba falsos positivos en la IDT. Previamente, se observó que jabalís inmunizados oralmente no eran positivos en la prueba del IFN- γ ni al ELISA de anticuerpos antes de ser desafiados con *M. bovis* (Lopez et al., 2016).

Pero por vía intramuscular, la respuesta de IFN- γ era diferente, ya que los jabalís vacunados presentaron una respuesta de IFN- γ inmediata tras la vacunación y mantuvieron los niveles más altos hasta el final del estudio (Garrido et al., 2011).

Además, no se ha demostrado que la vacuna inactivada produzca reacciones adversas en los animales, esto sugiere que es segura (Beltrán-Beck et al., 2014).

2.4. Diagnóstico

Las infecciones de TB en animales son normalmente crónicas y pueden permanecer subclínicas durante mucho tiempo. Por eso es importante un diagnóstico antemortem temprano, que se puede llevar a cabo con técnicas inmunológicas (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Solo en estados avanzados de infección, cuando se desarrolla una patología tuberculosa, se generan niveles altos de anticuerpos contra *M. bovis*. Pero con las técnicas que se basan en la inmunidad celular se puede detectar la infección más tempranamente. Las principales técnicas basadas en la inmunidad celular son la IDT y el ensayo de IFN- γ . La IDT es la técnica estándar internacional para el diagnóstico de TB antemortem; y es la usada en los programas de erradicación de TB. También es la técnica prescrita por la OIE para el comercio internacional de ganado (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Si se combina en paralelo con la técnica del IFN- γ aumenta la sensibilidad ya que esta técnica es capaz de detectar la infección en un estadio más temprano, y por lo tanto hay más probabilidad de detectar animales tuberculosos (Sinclair et al., 2016).

2.4.1 Diagnóstico DIVA: ESAT-6 y CFP-10 (EC)

Debido a las nuevas estrategias de control basadas en la vacunación de animales se requiere del desarrollo de métodos diagnósticos que puedan diferenciar animales vacunados de los infectados (Vordermeier et al., 2016), esta estrategia se denomina DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*).

Investigaciones recientes han puesto de relieve que el problema de la interferencia diagnóstica con las vacunas se podría solucionar usando técnicas que puedan diferenciar animales infectados de vacunados, es decir, técnicas de diagnóstico DIVA (Buddle et al., 2016). Se trata de usar antígenos específicos que expresan las micobacterias patógenas del CMT pero no BCG, que se pueden usar en la prueba del IFN- γ y en la IDT (Buddle et al., 2005).

Análisis genéticos han revelado que los genes que codifican para los antígenos del CMT ESAT-6 y CFP-10 han sido eliminados en BCG. Teniendo esta información, ha sido

demostrado que cócteles proteicos que contengan estos antígenos pueden ser utilizados para distinguir animales vacunados con BCG de los infectados con *M. bovis* (Vordermeier et al., 2001).

Estos reactivos DIVA se han estudiado recientemente en caprinos (Pérez de Val et al., 2016; Pérez De Val et al., 2013; Pérez de Val et al., 2011). El resultado es de un 100% de especificidad en el diagnóstico de animales vacunados cuando se usaban los antígenos ESAT-6 y CFP-10 en la técnica del IFN- γ . Por lo tanto, estos reactivos son los mejores candidatos para ser usados en las campañas de vacunación. No obstante, la sensibilidad todavía debe ser evaluada en estudios a mayor escala y en condiciones de campo (Pérez de Val et al., 2016).

3. Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo, siguiendo un enfoque integral de *One Health* es el de contribuir a la mejora del conocimiento en dos campos fundamentales de la investigación en TB: la vacunación y el diagnóstico. El estudio planteado se dirige a evaluar la eficacia de una nueva vacuna y sus efectos sobre el diagnóstico en caprinos desafiados con *M. caprae*.

Para alcanzar este propósito se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar la eficacia de la vacunación con MBI en cabritos desafiados con *M. caprae*. La eficacia se evalúa a través de los signos clínicos, lesiones y la carga bacteriana.
- 2) Evaluar las posibles interferencias diagnósticas de esta vacuna y la utilidad del uso de reactivos de diagnóstico DIVA en la prueba del IFN- γ .

4. Material y métodos

4.1 Animales y diseño experimental

Para el estudio se han usado 21 cabritos (11 machos y 10 hembras) de entre 4-7 semanas de edad de raza Murciano-Granadina. Eran procedentes de una granja libre de TB y, adicionalmente, se comprobó mediante la prueba de IFN- γ (ID Screen® Ruminant IFN-g, ID.vet, Grabels, France) que eran animales negativos. Los animales

fueron divididos en tres grupos lo más homogéneos posible de 7 animales, teniendo en cuenta peso y sexo: El grupo control sin vacunar (4 machos y 3 hembras); el grupo BCG, vacunados con *M. bovis* BCG subcutáneamente (4 machos y 3 hembras); y el grupo MBI, vacunados con la vacuna basada en *M. bovis* inactivado por calor por vía parenteral (3 machos y 4 hembras), en este caso, con el fin de evaluar las reacciones adversas de esta vacuna, 1 macho y 2 hembras se vacunaron por vía subcutánea, mientras que otros 2 machos y 2 hembras por vía intramuscular.

Siete semanas después de la vacunación (Vacunación en semana 0), los animales se trasladaron a la Unidad de Biocontención de Nivel 3 del IRTA-CReSA y se dividieron en 2 boxes experimentales (Grupo control en un box y grupos BCG y MBI en otro box). Tras 3 días de aclimatación todos los animales fueron desafiados con *M. caprae* (semana 7) y tras 9 semanas (semana 16) se realizó el sacrificio y necropsia de todos los animales.

Durante todo el experimento se tomaron muestras de sangre completa en tubos con heparina (semanas 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 16). El peso corporal de cada animal se tomó las semanas 0, 7, 10, 12, 14 y 16; y la temperatura rectal de los animales se tomó desde la semana 7 a la 16, cada semana.

4.2 Declaración de ética

Todos los procedimientos se emprendieron de acuerdo con las Leyes de la Unión Europea para la protección de animales usados en la experimentación (86/609). Los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Ética en la Experimentación Animal y Humana de la *Universitat Autònoma de Barcelona* (CEEAH) y la *Comissió d'Ética en Experimentació Animal* (CEA) de la Generalitat de Cataluña (Nº de procedimiento: 8697).

4.3 Vacunas

a) Vacuna *M. bovis* BCG: Se utiliza la cepa Danesa 1331 de *M. bovis* BCG (ATCC, Ref. 35733TM) previamente titulada y almacenada a -70° C en el cepario del IRTA-CReSA. Para la vacunación se utiliza una suspensión de 10^6 UFC/ml (en PBS), de la cual se administra a cada animal del grupo BCG una dosis 0,5ml por vía subcutánea (cada animal recibe una dosis aproximada de 5×10^5 UFC).

b) Vacuna MBI: Se trata de una cepa de campo de *M. bovis* que ha sido inactivada por calor y adyuvada (Garrido et al., 2011). La vacuna fue suministrada por el laboratorio productor de la misma (NEIKER, Derio, España) a la concentración de uso, y se administró a cada animal 1ml por vía parenteral tal y como se describe arriba.

4.4 Desafío con *M. caprae*

Para el desafío experimental con *M. caprae* los cabritos se anestesiaron como se describe en (Pérez de Val et al., 2011). Una vez anestesiados, los animales se colocaron en decúbito lateral derecho y se les inoculó por vía endobronquial (tal y como se describe en (Pérez de Val et al., 2011)) 0,5ml de una suspensión de 2×10^4 UFC/ml (cada cabrito recibió una dosis aproximada de 10^4 UFC).

4.5 Prueba de liberación de IFN- γ

Un mililitro de sangre completa obtenida a partir de cada animal se estimuló, en placas de cultivo celular de 96 pocillos, con tuberculina aviar (PPD-A a 10 μ g/ml, CZV, Porriño, España), otro mililitro con tuberculina bovina (PPD-B 10 μ g/ml, CZV), un tercer mililitro con un cóctel antigénico de ESAT-6/CFP-10 (EC, 10 μ g/ml, Lionex, Braunschweig, Alemania), mientras que a otro mililitro se le añadió PBS (control sin estimular). Se incubó *overnight* a 37°C con 5% CO₂. Pasado este tiempo se realizó una ELISA de detección de IFN- γ y la interpretación de los resultados siguiendo las instrucciones del kit comercial ID Screen® Ruminant IFN- γ (ID. vet).

4.6 Detección de anticuerpos frente a CMT

Las muestras fueron procesadas por duplicado para detectar anticuerpos frente CMT mediante un ELISA casero. Se antigenaron placas de cultivo celular de 96 pocillos con la lipoproteína de superficie celular MPB83 (Lionex, 0.5 μ g/ml) diluida en un buffer de carbonato/bicarbonato, y se incubaron *overnight* a 4 °C. Después del bloqueo durante 45 minutos a 37°C con PBS con 0,05% de Tween 20 (PBS-T20) y 0,5% de caseína bovina; las muestras de plasma (en dilución 1/200 en PBS-T20 con 1% de caseína) se añadieron por duplicado y se incubaron durante 1 h a 37 °C. A continuación, después de 6 lavados con PBS-T20, se añadió una combinación de proteína A y proteína G conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a una concentración final de 50 ng/ml y 100 ng/ml respectivamente. Tras 6 lavados más con PBS-T20 las placas se rebelaron

con TMB (Sigma-Aldrich), a los 20 minutos se paró la reacción con H₂SO₄ 0,5 M y finalmente se leyeron a 450 nm en un espectrofotómetro (BioTek PowerWave XS). Posteriormente se calculó la densidad óptica (DO) corregida (DO de pocillos antigenados menos DO de pocillos no antigenados).

4.7 Necropsia

4.7.1 Examen post-mortem

En la semana 16 del estudio (semana 9 post-desafío), se eutanasió a los cabritos mediante una sobredosis de pentobarbital sódico intravenoso. Se realizó una necropsia completa para detectar lesiones macroscópicas compatibles con TB. Se extrajeron de manera aséptica los linfonodos mediastínicos caudal y craneal, traqueobronquial y retrofaríngeos derecho e izquierdo de cada animal y posteriormente se filetearon en láminas o piezas más pequeñas para detectar y medir las lesiones que presentaban y posteriormente inferir el volumen de las mismas. El volumen de las lesiones de los linfonodos se aproximó, teniendo en cuenta la forma geométrica más similar a su morfología. También se inspeccionaban los pulmones y se realizó una descripción de las lesiones. Luego los pulmones se fijaron con una solución de formalina 10% por perfusión a través de la tráquea y pasado un mes se analizaron las lesiones mediante tomografía axial computarizada (estos resultados no se incluyen en el presente trabajo). Por último, se anotó la presencia de lesiones extrapulmonares, que posteriormente se confirmaron por histopatología (tinción de hematoxilina y eosina).

4.7.2 Bacteriología

Después de la evaluación macroscópica, los linfonodos pulmonares fueron homogenizados y descontaminados tal como se describe en (Pérez de Val et al., 2011). Para poder realizar el recuento total de bacterias viables se hicieron diluciones seriadas 1/10 de los linfonodos homogenizados y se inoculó 0,1 ml de cada dilución en placas con Agar 7H11. Las placas se incubaron a 37 °C durante 28 días, y pasado este tiempo se calculó el total de UFC presentes en cada linfonodo.

4.8. Análisis de datos

Se ha utilizado test de ANOVA de una vía junto a la prueba T-Student (para comparaciones por pares) o el test no paramétrico Kruskal-Wallis junto con el test de

suma de rangos de Wilcoxon en función de si los datos seguían una distribución normal (tras el test de Shapiro-Wilk) y si existía homogeneidad de varianzas en los grupos experimentales (tras el test de Levene). Se ha considerado un resultado estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se ha realizado con R-Deducer versión 2.15.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Austria).

5. Resultados

5.1 Signos clínicos y condición corporal

No se observaron reacciones adversas a la vacunación con MBI (ni s.c ni i.m) o BCG (s.c). Todos los demás animales presentaron tos ocasional en algún momento durante el estudio tras el desafío con *M. caprae*.

5.1.1 Temperatura corporal

Todos los animales del estudio manifestaron un aumento de temperatura corporal después del desafío con *M. caprae* (Figura 1).

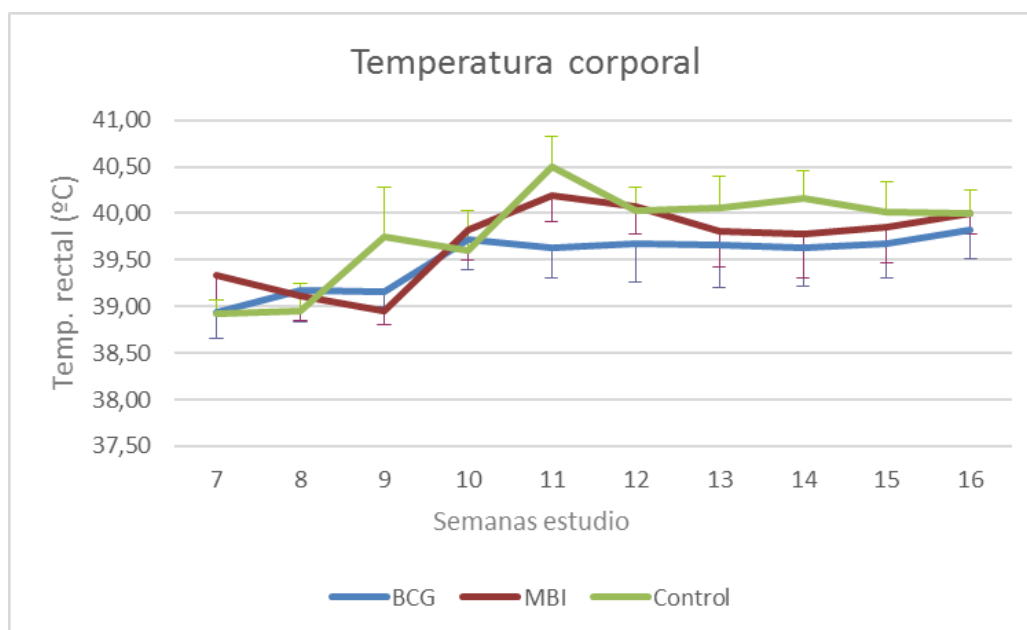


Figura 1. Evolución de la temperatura rectal media tras el desafío con *M. caprae* (semana7) para cada uno de los 3 grupos experimentales. Las barras de error representan el Intervalo de Confianza (IC) del 95%.

En los grupos control y MBI se observa un aumento importante de la temperatura media hasta la semana 11, donde se produce el pico de temperatura. En el grupo control aparecen las temperaturas más elevadas, sobrepasando los 40 °C en la semana 11 (6 de 7 animales), y en general se mantuvieron más altas en comparación a los otros grupos. Entre los grupos vacunados, en el grupo BCG se registraron, en general, las temperaturas más bajas. En el grupo MBI se observan oscilaciones: entre semanas 7-9 se produjo incluso una disminución, y luego aumentó hasta su máximo a la semana 11. En este punto (semana 11) existen diferencias significativas ente grupo control y BCG ($p = 0,00102$) y grupo BCG y MBI ($p = 0,02085$); en cambio no existen diferencias significativas ente los grupos control y MBI ($p = 0,18408$). En las semanas anteriores no se encontraron diferencias significativas.

A partir de la semana 11 la temperatura corporal se mantuvo a niveles elevados, observándose un ligero aumento de la semana 14 a la 16 en los grupos vacunados. Al final del estudio tampoco hay diferencias significativas entre los grupos.

5.1.2 Evolución de peso corporal

Después del desafío, en todos los grupos se produjo una pérdida de peso medio, siendo esta pérdida más marcada en el grupo MBI (Figura 2).

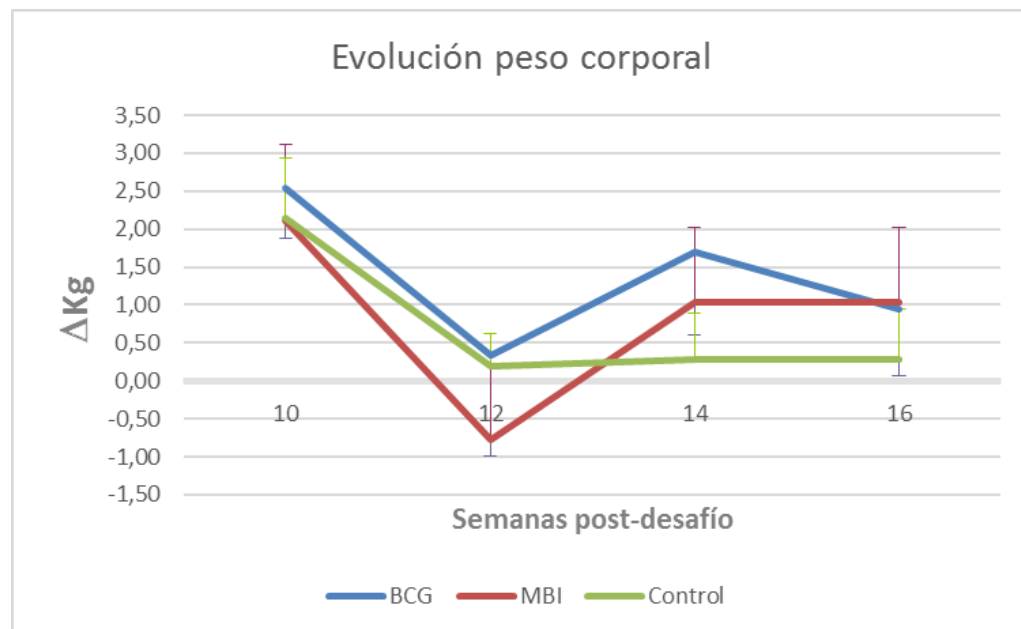


Figura 2. Evolución de peso corporal medio (ΔKg) entre cada punto tiempo tras el desafío con *M. caprae* para cada uno de los grupos. Las barras de error representan el IC 95%.

A partir de la semana 12, los animales de los grupos vacunados incrementaron su peso y la semana 16 ambos grupos presentaron pesos medios similares. Por otro lado, en el grupo control no se produjo ningún incremento de peso medio y no recuperaron la pérdida de peso de las semanas anteriores, manteniéndose en un peso similar hasta el final del estudio.

Solo se obtuvieron diferencias significativas de incremento de peso entre el grupo control y BCG en la semana 14 ($p = 0,0294$).

5.2 Respuesta inmunológica tras la vacunación y la infección

5.2.1 Prueba de liberación de IFN- γ

5.2.1.1 Resultados cuantitativos

1) Técnica basada en tuberculinas (PPD-B – PBS)

En la Figura 3 se muestra la cinética de la respuesta específica de IFN- γ frente a PPD-B.

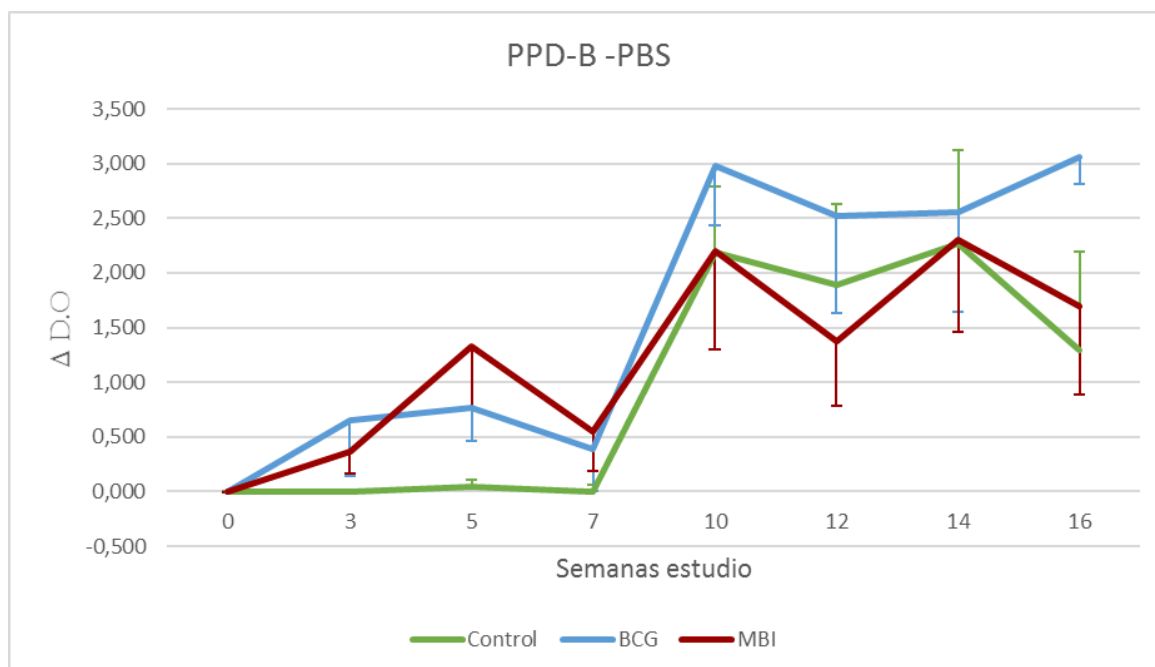


Figura 3. Respuesta de IFN- γ (DO PPD-B – DO PBS) media por grupo tras la vacunación (semana 0) y el desafío con *M. caprae* (semana 7). Las barras de error representan el IC 95%.

En la semana 3 del estudio según la respuesta de IFN- γ a la PPD-B la mayoría de los animales de los grupos BCG y MBI reaccionaron a la vacunación, sin diferencias significativas entre estos grupos ($p = 0,535$) pero sí de ambos con respecto al grupo control ($p = 0,0021$; $p = 0,0021$). La respuesta media a las vacunas fue aumentando en los dos grupos, produciéndose un pico de respuesta en la semana 5, siendo este pico más pronunciado en el grupo MBI. En el grupo control no se observó ninguna respuesta en las semanas pre-desafío con *M. caprae*. Cabe resaltar que en un animal del grupo MBI no se observó respuesta hasta después del desafío (datos individuales no mostrados).

Después del desafío con *M. caprae* (semana 7) todos los animales del estudio presentaron respuesta debido a la infección, con diferencias significativas entre grupo control y MBI en esta semana ($p = 0,0041$). Entre la semana 7 y 10 se produjo un gran incremento de la respuesta de IFN- γ a PPD-B en los tres grupos. Posteriormente se mantuvo elevada hasta el final del estudio, existiendo algunas oscilaciones: disminuyó en los tres grupos en semana 12, y en la última semana del estudio observamos un aumento de respuesta en el grupo BCG. En la semana 12 hay diferencias significativas entre grupos vacunados ($p = 0,0472$); y en la semana 16 entre grupo control y BCG ($p = 0,026$), y grupo BCG y MBI ($p = 0,038$)

2) Técnica basada en EC

Hasta la semana 7 no se observó ninguna respuesta de IFN- γ frente a EC destacable en ningún animal de los 3 grupos (Figura 4).

Después del desafío los 3 grupos presentaron una fuerte respuesta, la cual alcanzó su máximo en la semana 12 en el caso de los grupos vacunados, siendo el grupo BCG el que mostró la respuesta más elevada; y por otro lado en la semana 14, en el grupo control. Posteriormente la respuesta disminuyó en todos los grupos hasta la semana 16. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguna semana.

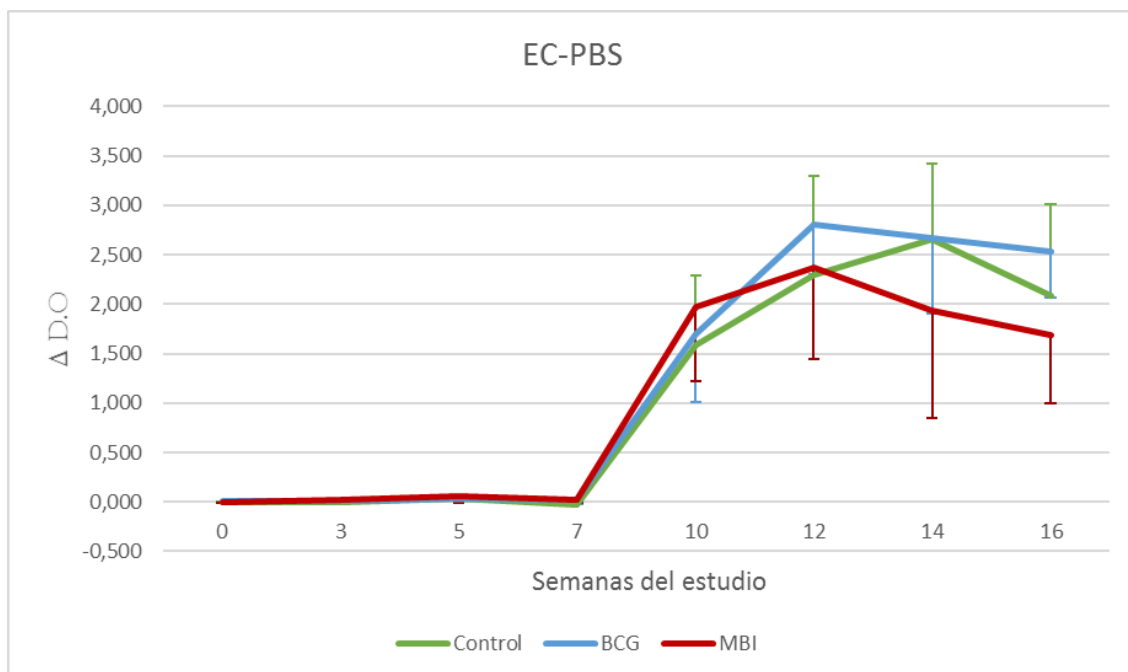


Figura 4. Respuesta de IFN- γ media a los antígenos EC por grupo tras la vacunación y el desafío con *M. caprae* (semana 7). Las barras de error representan el IC 95%.

5.2.1.2 Resultados cualitativos

Los resultados cualitativos de la prueba del IFN- γ basada en tuberculinas (PPD-B – PBS) siguiendo el criterio de interpretación del Kit comercial se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Número de animales positivos en la prueba del IFN- γ basada en tuberculinas (PPD-B – PBS) por grupo en las semanas muestreadas.

SEMANA	0	3	5	7	10	12	14	16
CONTROL	0/7	0/7	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	6/7
BCG	0/7	2/7	3/7	1/7	7/7	7/7	6/7	7/7
MBI	0/7	1/7	4/7	2/7	6/7	6/7	6/7	6/7

5.2.2 Detección de anticuerpos frente a complejo *M. tuberculosis*

Los resultados del ELISA de detección de anticuerpos frente CMT se representan en la Figura 5.

Todos los animales mostraron respuesta en la serología tras la infección. Tras la vacunación (semana 0), solo se detectaron anticuerpos específicos frente a CMT en el grupo MBI a partir de la semana 3, manteniéndose los niveles hasta el desafío. No obstante, en este grupo hubo un animal que no presentó respuesta hasta después del desafío. Las diferencias fueron significativas en la semana 3, entre el grupo control y MBI ($p = 0,017$) y grupo BCG y MBI ($p = 0,025$).

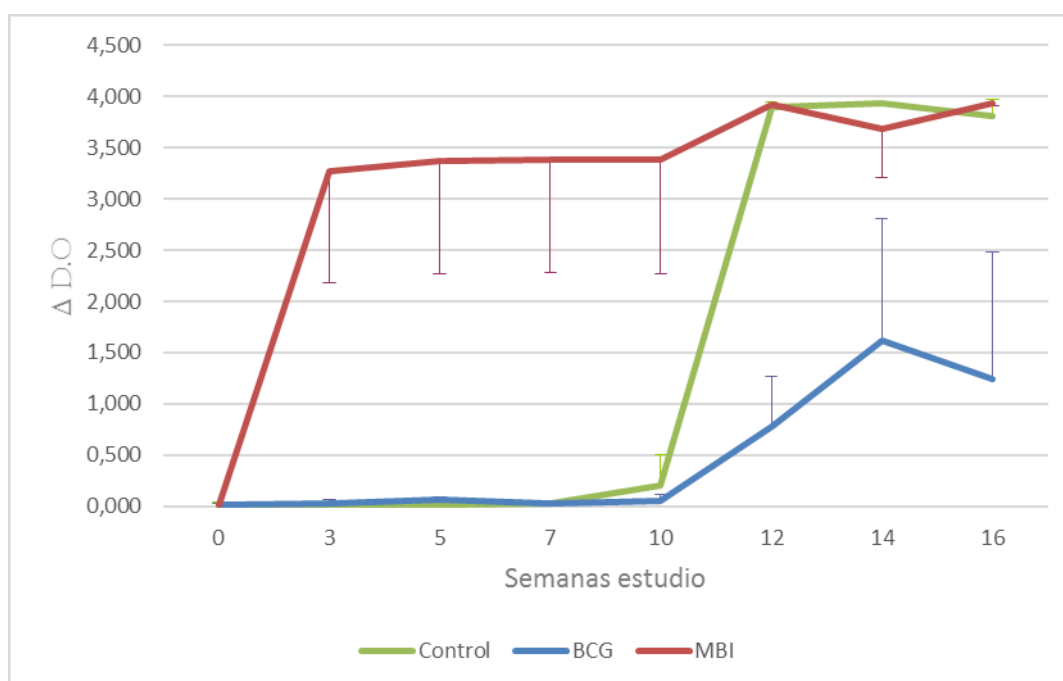


Figura 5. Detección de anticuerpos frente a MPB83 por grupo tras la vacunación y el desafío con *M. caprae* (semana 7). Las barras de error representan el IC 95%.

A partir de la semana 10, se detectaron anticuerpos en todos los grupos debido a la infección. El grupo MBI, el cual tenía los niveles medios más elevados, sufrió un leve aumento hasta el final del estudio. En el grupo control, los anticuerpos se dispararon de la semana 10 a la 12 existiendo diferencias significativas entre grupo control y BCG

($p = 0,00058$) y BCG y MBI ($p = 0,00058$). La respuesta media de anticuerpos del grupo control alcanzó el mismo nivel que el grupo MBI, y se mantienen hasta el final del estudio. En cambio, en el grupo BCG aumentó de la semana 10 a 14 pero se mantuvo por debajo de los otros grupos; y finalmente disminuyó hasta la semana 16.

En la semana 14, hubo diferencias significativas entre grupo control y BCG ($p = 0,003$), grupo control y MBI ($p = 0,025$), y entre grupos vacunados ($p = 0,0111$). Y en la semana 16, hay diferencias significativas entre grupo control y BCG ($p = 0,0041$) y grupo BCG y MBI ($p = 0,0033$).

5.3 Patología

5.3.1 Volumen de lesiones en linfonodos pulmonares

Todos los animales presentaron lesiones macroscópicas compatibles con TB, observándose diferente volumen medio de éstas según el grupo al cual pertenecía el animal. El volumen de las lesiones en cada grupo se representa en la Figura 6:

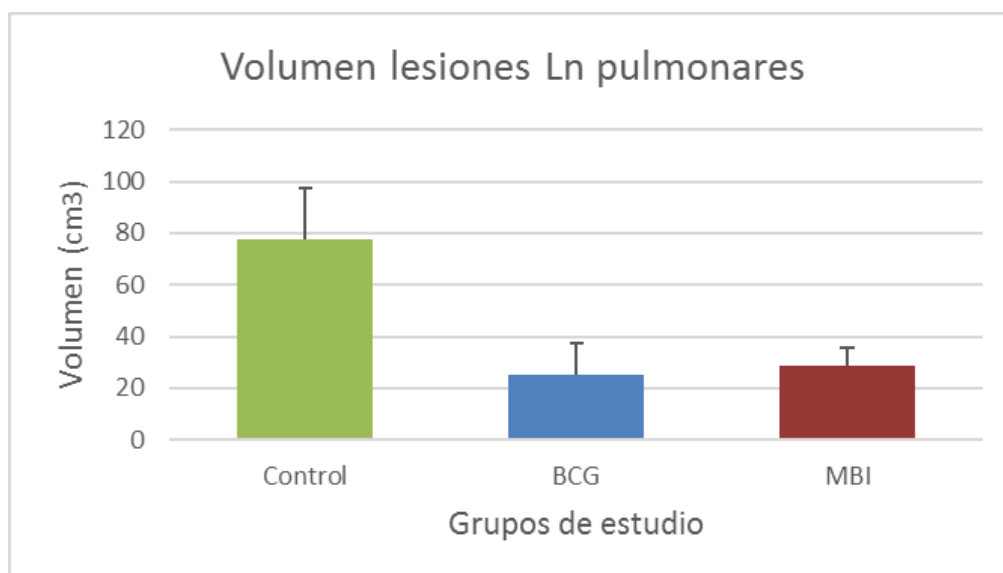


Figura 6. Volumen medio de lesiones en linfonodos (Ln) pulmonares para cada grupo del estudio. Las barras de error representan el IC 95%.

Los grupos vacunados mostraron un volumen medio de las lesiones significativamente menor en comparación con el grupo control ($p = 0,0012$), sin diferencias significativas entre el grupo BCG y MBI ($p = 0,62$). Dentro del grupo MBI no se observaron diferencias entre los animales según la vía de inoculación de la vacuna (s.c o i.m, datos no mostrados).

5.3.2 Lesiones extrapulmonares

Cuatro animales del grupo control, uno del grupo BCG y uno del grupo MBI (s.c) presentaron lesiones extrapulmonares. La localización de las lesiones en los animales de cada grupo se resume en la Tabla 2:

Tabla 2: Localización de lesiones extrapulmonares en los distintos grupos.

	LnRF	LnRH	Hígado	LnHP	LnGS	Bazo	LnMS
Control	1/7	1/7	1/7	0/7	1/7	2/7	4/7
BCG	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7
MBI	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7

Ln: Linfonodo. RF: Retrofaríngeo, RH: Retrohepático, HP: Hepatopancreático, GS: Gastroesplénico, MS: Mesentérico.

5.3.3 Carga bacteriana

Los resultados obtenidos mediante el cultivo de linfonodos pulmonares y, posteriormente el recuento de UFC/linfonodos se representan en la Figura 7.

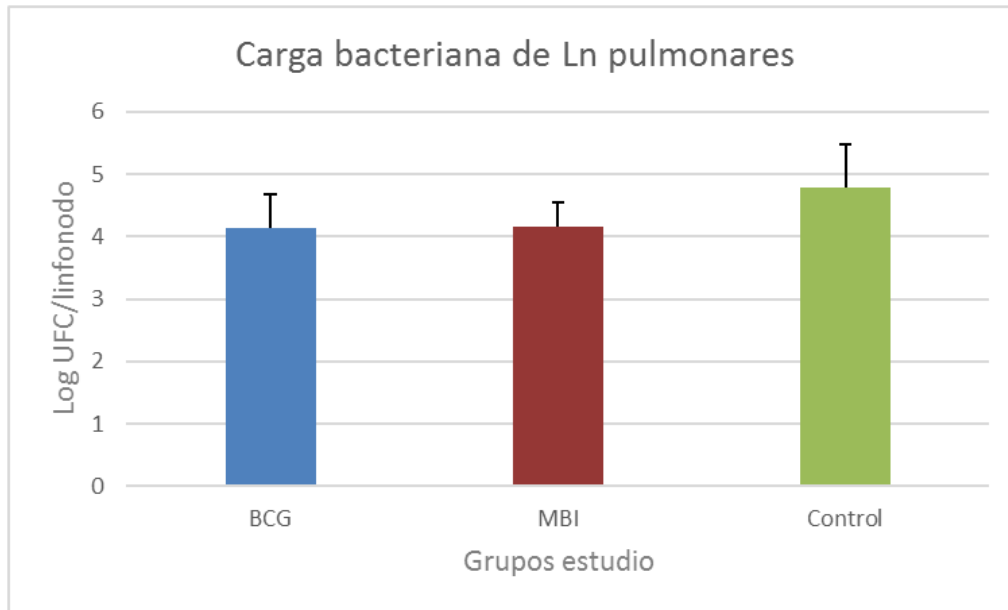


Figura 7. Carga bacteriana media obtenida en el cultivo de linfonodos pulmonares para cada uno de los grupos. Las barras de error representan el IC 95%.

La carga media bacteriana fue superior en el grupo control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos vacunados ($p = 0,90$), entre grupo control y BCG ($p = 0,26$) y grupo control y MBI ($p = 0,16$).

6. Discusión

En nuestro estudio hemos evaluado la eficacia de la vacuna MBI en cabritos en relación con la vacuna de referencia (BCG) y con animales no vacunados. Los resultados obtenidos de signos clínicos, lesiones y, en menor medida, carga bacteriana, indican que las vacunas protegen de la enfermedad.

El grupo control registró la temperatura corporal más elevada en las primeras semanas tras la infección (aunque sin diferencias significativas con grupo vacunado con MBI). Estos resultados son consistentes con los descritos previamente en cabras desafiadas experimentalmente con *M. caprae* (Pérez de Val et al., 2011). No obstante, al final del estudio, los cabritos de los tres grupos presentaban temperatura corporal elevada. Este hecho podría deberse a que en el presente estudio se inoculó una dosis infectiva más elevada en el desafío de *M. caprae* que en estudios previos (Pérez de Val et al.,

2011, 2012) de manera que los animales vacunados también acabaron desarrollando signos clínicos.

El volumen medio de las lesiones en linfonodos pulmonares era significativamente menor en los grupos vacunados en comparación con el grupo control. Además, en el grupo control se encontraron más lesiones extrapulmonares, lo que indica una diseminación hematógica de la infección. En estudios previos, también se habían observado lesiones extrapulmonares en una proporción de animales no vacunados (Pérez de Val et al., 2012). En el presente estudio, a diferencia de lo hallado en estudios anteriores de vacunación en cabras (Pérez De Val et al., 2013; 2012), en un animal de cada uno de los grupos vacunados se encontraron lesiones en el bazo, probablemente debido también a la mayor dosis infectiva.

En la carga bacteriana no había diferencias estadísticamente significativas entre grupos, pero cuantitativamente el grupo control fue en el que aparecieron más UFC por linfonodo; sugiriendo también un efecto de las vacunas frente a la progresión de la infección. Este resultado es similar al obtenido en estudios anteriores, en los cuales los animales más protegidos mostraron una carga bacteriana inferior respecto los grupos control (Pérez de Val et al., 2011; Pérez De Val et al., 2013).

La eficacia de la vacuna BCG ya ha sido demostrada anteriormente en ganado bovino (Buddle et al., 2016, 2005), caprino (Pérez De Val et al., 2013; 2012) y ovino (Balseiro et al., 2017). En estudios anteriores se observó que la vacunación inducía niveles de protección experimentalmente, y en nuestro estudio pudimos observar resultados similares pese a la mayor dosis infectiva (10^4 UFC respecto 10^3 UFC).

También se han llevado a cabo estudios sobre la vacuna de MBI, sobre todo en fauna salvaje, demostrando ciertos niveles de protección frente a la tuberculosis (Díez-Delgado et al., 2016; Garrido et al., 2011). En los estudios realizados en jabalí observaron que la vacuna MBI confería una protección similar a la vacunación con BCG (Garrido et al., 2011). En el presente estudio se han observado niveles de protección similares entre ambas vacunas. Por el contrario, en estudios con ovino la vacunación por vía oral no demostró ser efectiva (Balseiro et al., 2017), y por lo tanto la eficacia de la vacuna de MBI por vía oral en rumiantes debe estudiarse con más profundidad.

Uno de los principales problemas a la hora de vacunar animales es la interferencia diagnóstica con las pruebas habituales basadas en tuberculinas (IDT o IFN- γ). Por este motivo, en el estudio se ha evaluado la posible interferencia diagnóstica de las vacunas y el uso de antígenos DIVA en la técnica del IFN- γ . Como era esperable, la mayoría de animales vacunados con BCG y MBI resultaron positivos a la prueba de IFN- γ basada en tuberculinas tras la vacunación y antes del desafío con *M. caprae* (semanas 3-7).

Los antígenos DIVA utilizados (ESAT-6 y CFP-10) son expresados por las micobacterias patógenas del CMT, pero no en BCG (Vordermeier et al., 2001). No es el caso de la vacuna MBI, ya que las secuencias de ADN que codifican para estos antígenos están presentes en el genoma de *M. bovis*. No obstante, al tratarse de una cepa inactiva, no los excretaría, o los excretaría en cantidades muy bajas.

Efectivamente, no se observó ninguna respuesta relevante de IFN- γ en ningún animal vacunado MBI con los antígenos DIVA antes del desafío con *M. caprae*. No obstante, se ha observado en bovinos que esta vacuna podría comprometer el diagnóstico incluso utilizando esta técnica DIVA (Jones et al., 2016). Por lo tanto, hacen falta más estudios con una N más grande para investigar más a fondo este punto.

En estudios anteriores realizados en infecciones experimentales realizados en bovino, ovino y caprino (Lyashchenko et al., 2004; Pérez de Val et al., 2012; Balseiro et al., 2017) se observó una menor respuesta a EC tras la infección en los vacunados, de manera que la intensidad de la respuesta a EC era menor en los animales protegidos. Por lo tanto, era de esperar que en el presente estudio, los animales más protegidos mostraran una respuesta menor a EC, ya que esta es una respuesta específica a la infección, independientemente de la vacuna. Por lo contrario, no se han observado diferencias significativas en la respuesta frente a EC entre los tres grupos. Este resultado se puede explicar de nuevo por la mayor dosis infectiva utilizada en este estudio y por lo tanto la mayor exposición de los animales a este antígeno, generando una respuesta muy elevada en todos ellos, de manera que estos antígenos no se pueden utilizar como marcadores de protección en el modelo utilizado.

Respecto a los resultados de detección de anticuerpos se observó que en el grupo MBI los animales presentaron una respuesta humoral muy intensa después de la vacunación, y mantuvo los niveles elevados de anticuerpos durante todo el estudio. Este resultado indicaría que los animales reaccionaron frente a la vacuna, pero no nos permite tener evidencias esta respuesta tenga una relación directa con la protección.

Por el contrario, el grupo BCG presentó una reducción significativa de anticuerpos en comparación con los otros grupos después del desafío con *M. caprae*. Unos títulos menores de anticuerpos podrían estar relacionados con un menor grado de infección, como se ha descrito en estudios anteriores en ganado bovino (Lyashchenko et al., 2004) y caprino (Pérez de Val et al., 2011). El hecho de que la vacuna MBI ya induzca una respuesta humoral pudo influir en el hecho que el grupo MBI no presentara esta reducción.

Otro aspecto a tener en cuenta, debido al diseño del estudio, es el caso de una cabra del grupo MBI que no mostró ninguno tipo de respuesta tras la vacunación con MBI (ni a anticuerpos ni IFN- γ), siendo al final del estudio el animal del grupo que mayor volumen de lesiones en linfonodos presentó y el único del grupo MBI con lesiones extrapulmonares. Este hecho se podría explicar debido a que se trataba de un animal de menor edad en el momento de la vacunación (4 semanas de vida comparado con las 6-7 semanas del resto de animales), por este motivo su sistema inmunológico podría no estar desarrollado para poder responder adecuadamente. Este hallazgo debería tenerse en cuenta para futuros estudios con esta vacuna en relación a su administración.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que la vacunación de caprinos con MBI puede ser un nuevo instrumento eficaz para el control de la TB, pero es necesario realizar estudios adicionales con un mayor número de animales y también en condiciones de campo para confirmar los hallazgos obtenidos en el presente estudio.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el estudio y su interpretación y discusión podemos llegar a dos conclusiones principales, que corresponden a nuestros objetivos iniciales:

- 1) La vacunación parenteral con MBI protege a caprinos frente a la infección experimental con *M. caprae*. Los animales vacunados con MBI mostraron signos clínicos más leves, menor volumen en lesiones de linfonodos y menor carga bacteriana en comparación con los animales no vacunados y a unos niveles similares que los animales vacunados con BCG.

- 2) La vacuna MBI, del mismo modo que la vacuna BCG, interfiere en el diagnóstico de la TB mediante la prueba del IFN- γ basada en tuberculinas tras la vacunación. Por otro lado, las respuestas de los animales vacunados con MBI a la prueba basada en antígenos DIVA, tras la vacunación y antes del desafío, son indistinguibles de los animales no vacunados o vacunados con BCG.

8. Bibliografía

- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1785–1789. doi:10.1099/ijs.0.02532-0
- Balseiro, A., Vidal, E., Moll, X., Espada, Y., Juste, A., Prieto, M., 2017. Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep 1–16.
- Beltrán-Beck, B., Romero, B., Sevilla, I.A., Barasona, J.A., Garrido, J.M., González-Barrio, D., Díez-Delgado, I., Minguijón, E., Casal, C., Vicente, J., Gortázar, C., Aranaz, A., 2014. Assessment of an oral *mycobacterium bovis* BCG vaccine and an inactivated *M. bovis* preparation for wild boar in terms of adverse reactions, vaccine strain survival, and uptake by nontarget species. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 12–20. doi:10.1128/CVI.00488-13
- Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Wedlock, D.N., 2005. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* 23, 3581–9. doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.150
- Buddle, B.M., Shu, D., Parlane, N.A., Subharat, S., Heiser, A., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Wedlock, D.N., 2016a. Vaccination of cattle with a high dose of BCG vaccine 3 weeks after experimental infection with *Mycobacterium bovis* increased the inflammatory response, but not tuberculous pathology. *Tuberculosis* 99, 120–127. doi:10.1016/j.tube.2016.05.004
- Cardona, P., Williams, A., 2017. Experimental Animal modelling for TB vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.* 56, 268–273. doi:10.1016/j.ijid.2017.01.030
- De La Rúa-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86, 77–109. doi:10.1016/j.tube.2005.05.002

- De la Rúa-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 other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* 81, 190–210. doi:10.1016/j.rvsc.2005.11.005
- Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., Gortázar, C., 2016. Parenteral Vaccination with Heat-Inactivated *Mycobacterium Bovis* Reduces the Prevalence of Tuberculosis-Compatible Lesions in Farmed Wild Boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 2012–2015. doi:10.1111/tbed.12526
- Dürr, S., Müller, B., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J.M., van Helden, P.D., Zinsstag, J., 2013. Differences in Primary Sites of Infection between Zoonotic and Human Tuberculosis: Results from a Worldwide Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. doi:10.1371/journal.pntd.0002399
- Esteban, J., Muñoz-Egea, M.-C., 2016. *Mycobacterium bovis* and Other Uncommon Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Microbiol. Spectr.* 4. doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016
- Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Romero, B., Geijo, M.V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R.A., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Protection against tuberculosis in eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *mycobacterium bovis*. *PLoS One* 6, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0024905
- Jones, G.J., Steinbach, S., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R., Vordermeier, H.M., 2016a. Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 182, 85–88. doi:10.1016/j.vetimm.2016.10.010
- López, V., González-Barrio, D., Lima-Barbero, J.F., Ortiz, J.A., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Alberdi, P., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2016. Oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the response of farmed red deer to avian and bovine tuberculin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*

172, 21–25. doi:10.1016/j.vetimm.2016.03.003

- Lyashchenko, K., Whelan, A.O., Greenwald, R., Pollock, J.M., Andersen, P., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2004. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and Infected with *M. bovis* 72, 2462–2467. doi:10.1128/IAI.72.5.2462
- Napp, S., Allepuz, a, Mercader, I., Nofrarías, M., López-Soria, S., Domingo, M., Romero, B., Bezos, J., Pérez de Val, B., 2013. Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* 172, 663. doi:10.1136/vr.101347
- Nebreda, T., Álvarez-Prida, E., Blanco, B., Remacha, M.A., Samper, S., Jiménez, M.S., 2016. Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. *IDCases* 4, 50–52. doi:10.1016/j.idcr.2016.02.010
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A.S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B.J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBue, P., Fujiwara, P.I., 2016. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*-a call for action. *Lancet Infect. Dis.* 3099, 1–5. doi:10.1016/S1473-3099(16)30139-6
- Pérez de Val, B., Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raeber, A., Domingo, M., 2016. Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine* 34, 881–886. doi:10.1016/j.vaccine.2016.01.004
- Pérez De Val, B., Lo, S., Nofrarías, M., Martín, M., Vordermeier, H.M., Villarreal-ramos, B., Romera, N., Escobar, M., Solanes, D., Cardona, P., Domingo, M., 2011. Experimental Model of Tuberculosis in the Domestic Goat after Endobronchial Infection with *Mycobacterium caprae* 18, 1872–1881. doi:10.1128/CVI.05323-11
- Pérez De Val, B., Villarreal-ramos, B., Nofrarías, M., López-soria, S., Romera, N., Singh, M., 2012. Goats Primed with *Mycobacterium bovis* BCG and Boosted with a Recombinant Adenovirus Expressing Ag85A Show Enhanced 19, 1339–1347. doi:10.1128/CVI.00275-12

- Pérez De Val, B., Vidal, E., Villarreal-Ramos, B., Gilbert, S.C., Andaluz, A., Moll, X., Martín, M., Nofrarías, M., McShane, H., Vordermeier, H.M., Domingo, M., 2013. A multi-antigenic adenoviral-vectored vaccine improves BCG-induced protection of goats against pulmonary tuberculosis infection and prevents disease progression. *PLoS One* 8, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0081317
- Prodinger, W.M., Indra, A., Koksalan, O.K., Kilicaslan, Z., Richter, E., 2014. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1501–13. doi:10.1586/14787210.2014.974560
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J., 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 1536–1541.
- Sinclair, J.A., Dawson, K.L., Buddle, B.M., 2016. The effectiveness of parallel gamma-interferon testing in New Zealand’s bovine tuberculosis eradication programme. *Prev. Vet. Med.* 127, 94–99. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.03.020
- Sotgiu, G., Sulis, G., Matteelli, A., 2017. Tuberculosis—a World Health Organization Perspective. *Microbiol. Spectr.* 5. doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0036-2016
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirolì, M.L., Besnier, J.M., 2009. Human-to-Human Transmission of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in Immunocompetent Patients □ 47, 1249–1251. doi:10.1128/JCM.02042-08
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2016. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 87–109. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111311
- Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., 2001. Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle 8, 571–578. doi:10.1128/CDLI.8.3.571

Waters, W.R., Palmer, M. V, Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611–2622. doi:10.1016/j.vaccine.2012.02.018

WHO Publication. *Global Tuberculosis Report 2016*. (2016). p. 1–214. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/