



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto del quitosano sobre la respuesta inmune a la vacunación contra la tuberculosis bovina en un modelo caprino

TESIS INDIVIDUAL

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

P R E S E N T A:

Mónica Iveth Ramos Núñez

Dirigida por:

MSPAS. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

Querétaro, Qro., 29 Octubre de 2021



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

Efecto del quitosano sobre la respuesta inmune a la vacunación contra la tuberculosis bovina en un modelo caprino

TESIS INDIVIDUAL

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

PRESENTA:

Mónica Iveth Ramos Núñez

Directora de tesis

MSPAS. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

SINODALES

MSPAS. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes
Presidente



FIRMA

Dra. Isabel Bárcenas Reyes
Asesor



FIRMA

Dr. Feliciano Milián Suazo
Vocal



FIRMA

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal



FIRMA

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre 2021
México

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad crónica infecciosa que representa un serio problema a la ganadería en todo el mundo, especialmente en ganado especializado en leche en países en vías de desarrollo, donde la estrategia de prueba-y-sacrificio no es económicamente viable. La prevalencia de la TBb en ganado para leche es especialmente alta; por lo tanto, la estrategia de prueba y sacrificio representa un costo muy alto para las ganaderías de este tipo, por lo que la práctica resulta imposible de implementar. Últimamente, una de las alternativas que se han recomendado para reducir la incidencia y la prevalencia de esta enfermedad en animales ha sido el uso de la vacuna BCG, sola o en combinación con algunas proteínas. La vacuna BCG ha sido utilizada en humanos por casi un siglo; sin embargo, a la fecha no ha sido utilizado en ganado. La vacunación en bovinos y otras especies animales ha sido evaluada de manera experimental por los últimos 20 años. Se ha probado en bovinos, venado cola blanca, tejones de al menos dos especies, cabras y ratones. Incrementar la eficacia de la vacuna es determinante antes de correr pruebas clínicas de campo, que resultan costosas y son a largo plazo. Diversos estudios han demostrado que protocolos de vacunación con la incorporación de refuerzos con proteínas incrementan la eficacia de la vacuna. El uso de polímeros tales como el quitosano incrementan la respuesta inmune contra diferentes enfermedades al elevar la interacción de antígenos con el sistema inmune celular y modulando la respuesta inmune del hospedero. Este estudio demuestra que la primo vacunación con la BCG Phipps, reforzada con un filtrado proteico purificado, solo o en combinación con quitosano, tiene el potencial para reducir la diseminación de la tuberculosis al reducir el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal, y el tamaño de las lesiones en animales vacunados, comparado con animales no vacunados o los vacunados con la BCG sola. Los grupos vacunados mostraron significativamente mayores niveles de IFN- γ en sangre comparados con el grupo control, grupo no vacunado, después de la vacunación, el refuerzo, y el desafío con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

(Palabras clave: Quitosano, Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*).

ABSTRACT

Bovine Tuberculosis (bTB) represents a problem for livestock worldwide, especially in dairy cattle in developing countries, where the strategy of “test-and-slaughter” is not economically viable. The prevalence of bTB in dairy cattle in not developed countries is especially high; therefore, the testing and disposing of cattle represents high costs to dairy farms, making this practice impossible. Lately, one of the alternatives recommended for reducing the incidence and the prevalence of this disease in animals has been the use of the vaccine BCG, alone or in combination with some proteins. BCG has been used in humans for nearly a century; however, up to now, it has not been used in cattle. Vaccinating cattle and other animal species has been evaluated experimentally for the last 20 years. It has been tested in cattle whitetail deer, badgers, brushtail possums, goats and mice. Improving the vaccine efficacy is essential prior to running long-lasting and expensive field trials. Studies have shown that vaccine protocols utilizing boosting with proteins improve the vaccine efficacy. The use of polymers such as chitosan improves the immune response against different diseases by improving the interaction of antigens with the cellular immune system and modulating the host immune response. This study shows that the prime BCG vaccination, boosted with a culture filtrate protein (CFP), alone or in combination with chitosan, have the potential to reduce tuberculosis (TB) dissemination by reducing the number of animals with lesions, the number of lesions per animal, and the size of the lesions in vaccinated animals, compared with those not vaccinated or those vaccinated with BCG alone. The vaccinated groups showed significantly higher Interferon- γ levels in blood compared to the control, nonvaccinated group after vaccination, after boosting, and after challenging with a wild-type *Mycobacterium bovis* strain.

(Key words: Chitosan, bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*).

DEDICATORIA

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.2 Importancia de la tuberculosis bovina	5
2.3 Patogenia de la tuberculosis bovina	6
2.4 Distribución de la tuberculosis bovina	6
2.5 La tuberculosis bovina y la salud pública	8
2.6 Transmisión de la tuberculosis bovina entre el ganado	9
2.7 Control y erradicación de la tuberculosis bovina	9
2.8 Vacunación contra la tuberculosis bovina en el ganado	10
2.9 Las nanoparticulas y las vacunas	12
2.9.1 Adyuvantes	13
2.9.2 Quitosano	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
V. HIPÓTESIS	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Animales experimentales	18
6.2 Crecimiento de la cepa BCG Phipps de <i>M. bovis</i>	18
6.3 Preparación de quitosano para recubrimiento de BCG	19
6.3.1 Recubrimiento de BCG con quitosano	19
6.4 Vacunación, refuerzo y desafío	19

6.5 Toma de muestras de sangre y estimulación de antígenos-----	20
6.6 Sacrificio, clasificación de lesiones y toma de muestras-----	21
6.7 Análisis estadístico-----	23
VII. RESULTADOS-----	24
7.1 Respuesta de IFN- γ en sangre-----	24
7.2 Lesiones en los animales -----	25
VIII.DISCUSIÓN-----	27
IX. CONCLUSIÓN -----	30
X. LITERATURA CITADA-----	31

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Formulación vacunal por cada grupo experimental.....	20
Cuadro 2	Definición de la clasificación de los animales experimentales de acuerdo a la severidad de las lesiones observadas al sacrificio de cabras vacunadas contra TB con diferentes protocolos vacunales con la cepa BCG Phipps y desafiados con una cepa de campo de <i>Mycobacterium bovis</i>	22
Cuadro 3	Número y proporción de animales con lesiones visibles, promedio, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para calificaciones de lesiones después de la vacunación contra TB y el desafío con cepa de campo de <i>Mycobacterium bovis</i> en un modelo caprino.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Situación de la tuberculosis bovina en el territorio nacional mexicano.....	7
Figura 2	Atenuación de las cepas de <i>M. bovis</i> mayormente distribuidas en el mundo	12
Figura 3	Ilustración de valores de calificación de animales experimentales vacunados contra tuberculosis (TB) con diferentes protocolos de vacunación y desafiados con una cepa de campo de <i>Mycobacterium bovis</i>	22
Figura 4	Concentración de interferon gamma (IFN- γ) en sangre en cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de <i>Mycobacterium bovis</i>	25

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium bovis*, patógeno que igual que *Mycobacterium tuberculosis* es miembro del complejo M. tuberculosis (Garnier *et al.*, 2003). En México, como en otras partes del mundo, la TBb afecta al ganado bovino, sin embargo, en algunos países se ha diseminado a fauna silvestre, haciendo aún más difícil su control (de Kantor, LoBue & Thoen., 2010; Zanella *et al.*, 2008). *M. bovis* constituye también un serio problema de salud pública, las personas se pueden infectar por consumo de leche bronca de vacas enfermas, y una persona infectada puede transmitir la enfermedad directamente a una susceptible (Michel *et al.*, 2010; Milián-Suazo *et al.*, 2010; Pérez-Guerrero *et al.*, 2008). En México, la prevalencia de TBb es menor al 0.5% en 85% del territorio, pero en el resto es mayor al 2%, el problema radica principalmente en los establos lecheros (Milián-Suazo *et al.*, 2010), donde la prevalencia es de alrededor del 20%. Por su importancia en salud pública, esta última es la población blanco de esta investigación. Las principales vías de infección de la TBb son: la aérea, mediante la formación e inhalación de aerosoles, que causan lesiones características en pulmones y nódulos linfáticos de cabeza y tórax, y a través de la ingestión de productos lácteos y sus derivados no pasteurizados, que causan lesiones en el tracto gastrointestinal (O'Reilly & Daborn., 1995; Goodchild & Clifton-Hadley., 2001).

México mantiene una campaña de control y erradicación basada en la estrategia de prueba y sacrificio, con resultados exitosos en ganadería para producción de carne, pero sin éxito en ganadería para producción de leche. Esto debido a lo costoso que resulta sacrificar animales de este tipo y a la pobre confiabilidad en las pruebas de diagnóstico. No obstante, por razones de salud pública y económica, la erradicación de la TBb en México es una prioridad.

El inventario ganadero nacional es de alrededor de 30 millones de cabezas, de las cuales el 91% se dedica a la producción de carne y doble propósito, y aproximadamente el 9% restante (2, 700,000 cabezas), es ganado especializado en la producción de leche; población que actualmente está en riesgo y que representa un riesgo de salud pública, y que es, por lo tanto, el beneficiario directo de una vacuna, que sería integrada a la campaña ya establecida.

La vacunación con BCG se ha probado experimentalmente. Se ha determinado que dosis bajas tienen una eficacia mayor que dosis altas (Buddle *et al.*, 1995). La cepa *M. bovis* BCG Pasteur 11732P2 a dosis de 10^6 ha sido la más utilizada en becerros de 4-6 meses de edad desafiados intranasalmente con cepas virulentas a dosis de 10^3 (Buddle *et al.*, 1995; Wedlock *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007). Se reporta una eficacia mayor al 60% en promedio con base a la cantidad y el tamaño de las lesiones granulomatosas, así como por el número de bacilos viables dentro de las mismas (Vordermeier *et al.*, 2002). Se ha reportado además mejor efecto en animales al nacimiento o en becerros menores de 4 meses (Hope *et al.*, 2005). Y que el uso de refuerzos con subunidades de proteínas del filtrado de cultivo (CFP) mejora la protección (De Lisle *et al.*, 2001). La vacunación con BCG y/o CFP no induce respuesta de IFN-gama (IFN- γ) a los antígenos de bajo peso molecular CFP10 y ESAT6, por lo que el diagnóstico diferencial es también factible (Vordermeier *et al.*, 2001; Denis *et al.*, 2007). En un experimento de nuestro grupo, utilizando la cepa vacunal Phipps, cepa poco utilizada pero que tiene un genoma con menos deleciones que otras cepas vacunales como la Pasteur o la Danesa, se encontró que un protocolo de vacunación con refuerzo, pre-inmunizando con la BCG y luego reforzando con filtrado de cultivo + un adyuvante, tuvo una eficacia de alrededor del 70% en la reducción del número de lesiones, el tamaño de las lesiones y el número de bacilos por lesión de animales vacunados comparado con no vacunados (Cantó-Alarcón *et al.*, 2013). Se demostró además que la vacuna tiene la misma eficacia en vaquillas gestantes, y que es totalmente inocua (Milián-Suazo *et al.*, 2011).

La formulación de la BCG con refuerzos subunitarios de filtrado proteico de cultivo (FPC), más un adyuvante, incrementa la protección (Vordermeier *et al.*, 2004). Se ha reportado, en estudios en humanos y en ganado, que existen diversos estimuladores y moduladores de la respuesta inmune que incrementan la eficacia de las vacunas (Coffman *et al.*, 2010). Para tener una mejor respuesta funcional de las células CD8+T, se sugiere utilizar adyuvantes con una proteína formulada de tal manera que facilite la entrada al camino del complejo de histocompatibilidad de la clase I, para estimular la proliferación y activación de células dendríticas e inducir la producción de interferón tipo I (Vordermeier *et al.*, 2004). Adyuvantes como MF59, complejos inmunoestimuladores (ISCOMs) y TLR2 y TLR5 mejoran la respuesta de células T, sin alterar el balance Th1/Th2. TLR9 es una molécula que media y potencializa la respuesta inmune contra bacterias y virus (Blasius & Beutler., 2010; Coffman *et al.*, 2010). Secuencias con CpG han demostrado este efecto, con una mejor acción cuando se combina con oligonucleótidos (ODN) de 18 a 25 pb. Los epítopes CpG ODN interaccionan con los receptores TLR9 para inducir la maduración de células dendríticas a presentadoras de antígenos para iniciar la respuesta inmune primaria. En especial los CpG inducen la respuesta Th1, considerada la mejor respuesta contra la tuberculosis.

Es claro que los protocolos de vacunación son importantes, donde la mejor opción es la combinación de la vacunación con cepa viva BCG y luego un refuerzo con filtrado proteico de cultivo (Buddle *et al.*, 2005; Vordermeier *et al.*, 2001). Trabajos experimentales demuestran que la dosis de filtrado es importante. Varios tipos de proteínas (HSP65, MPB70, HSP70 y APA) se han probado con resultados variables (Skiner *et al.*, 2003). Nuestra intención es estudiar esta estrategia con diferentes tipos de adyuvantes, solos o en combinación con diferentes dosis de filtrado proteico purificado, elaborado en nuestro laboratorio, en un modelo caprino. Este modelo ya ha sido utilizado en trabajos experimentales, tanto en México como en otros países, con buenos resultados y costo más bajo comparado con trabajos utilizando bovinos.

Una estrategia de vacunación en ganado es mucho más simple que la que se utiliza en humanos, primero porque el ganado es mucho más fácil de manejar y controlar, y segundo porque el periodo de vida es mucho más corto, por lo que no tenemos que preocuparnos de problemas de latencia de la bacteria y otros problemas que se presentan en humanos. La becerro cuando nace generalmente es libre de la enfermedad, y dado que crece en corrales separados a los de las vacas adultas se mantiene sana hasta la edad de vaquillas, aproximadamente a los dos años de vida, cuando ya están gestantes son llevadas a los corrales del hato adulto, hato en producción y generalmente infectado, para el parto y el inicio de la producción de leche. Es precisamente en este periodo que la vaquilla tiene el riesgo de infectarse, por lo que la vacuna aplicada antes del parto y antes de su entrada al hato de adultos tiene su mayor probabilidad de éxito. Esto asemeja a lo que ocurre en humanos, donde se vacuna a los niños para protegerlos en la etapa de mayor riesgo de sufrir una tuberculosis miliar. Experimentos de nuestro grupo indican que el pico de respuesta inmune a la vacuna se obtiene entre los 30 y los 60 días pos-vacunación, y tiene una duración descendiente por aproximadamente dos años, por lo que las vaquillas vacunadas pueden estar protegidas en las etapas de mayor riesgo y periodos de estrés: en el posparto y el inicio de la lactancia.

II. ANTECEDENTES

2.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) incluye a las especies de *Mycobacterium* que causan enfermedad en el humano: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. leprae*, *M. Canetti*, *M. orygis*, *M. mungi* y *M. suricattae* (Alexander *et al.*, 2010; Dippenaar *et al.*, 2015; Pérez-Morote *et al.*, 2020). Estas especies comparten algunas características fundamentales como son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y el ser ácido-alcohol resistentes (Kleeberg., 1984; Thoen & Barletta., 2006;). Los miembros del complejo tienen un 99.9 % de similitud genética a nivel de nucleótidos (Huard *et al.*, 2006).

La micobacterias del complejo *M. tuberculosis* son de crecimiento lento, 4 a 8 semanas (Pollock & Neill., 2002; Biet *et al.*, 2005), a diferencia de las micobacterias ambientales que son de crecimiento rápido, y producen colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días (Tortoli., 2009; Castilho *et al.*, 2015). Dentro de las micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de especies saprofitas de vida libre, que también pueden causar enfermedad en situaciones de inmunodepresión.

2.2 Importancia de la tuberculosis bovina

La TBb es una enfermedad infecciosa, crónica, granulomatosa de notificación obligatoria (OIE, 2018; OIE, 2021). Es frecuente en el ganado en países en vías de desarrollo y en la fauna silvestre en algunos países desarrollados. La enfermedad es causada por *Mycobacterium bovis*, que además de afectar al ganado afecta a la fauna silvestre, como ha ocurrido en África, donde fue diagnosticada por primera vez en fauna silvestre en 1990 en un búfalo africano (*Syncerus caffer*) en el Parque Nacional Kruger (KNP, por siglas en inglés) de Sudáfrica, más tarde fue documentado el contagio a leones (*Panthera leo*), papión chacma (*Papio ursinus*), potamóquero de río (*Potamochoerus porcus*), kudú

(*Tragelaphus strepsiceros*), chita (*Acinonyx jubatus*) y leopardo (*Panthera pardus*) (Bengis *et al.*, 1996; De Vos *et al.*, 2001).

2.3 Patogenia de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina es una infección transmitida principalmente por aerosoles. Las tasas de transmisión aumentan cuando los animales se mantienen hacinados y/o confinados en establos. Una vez inhalado, *M. bovis* es fagocitado por macrófagos alveolares, donde inicia su multiplicación. La infección focal del tejido pulmonar progresa con el tiempo y, finalmente, la infección se disemina a los ganglios linfáticos regionales, en el mediastino del pulmón u otros ganglios linfáticos en la región de la cabeza y el tórax. El hospedero animal genera una respuesta inmune mediada por células, lo que resulta en una acumulación constante de macrófagos y linfocitos T en el sitio de la infección. Esta respuesta inflamatoria mononuclear focal se organiza en una lesión conocida como granuloma o tubérculo (Viena-Niero *et al.*, 2006). Los granulomas están circunscritos por tejido conectivo fibroso y tienen una estructura laminar que se asemeja a la superficie cortada de una cebolla. Con el tiempo, las células del centro del granuloma mueren y los restos celulares muertos adquieren la apariencia y la consistencia del requesón seco. El término patológico para esto es necrosis caseosa (Thoen, Lobue & de Kantor., 2006; Viena-Niero *et al.*, 2006). Las lesiones pueden localizarse en ganglios linfáticos y en diferentes órganos, en forma de granuloma o tubérculo de material purulento-caseoso, de color amarillento, cuyo tamaño y cantidad varían. Las lesiones histológicamente se diferencian de la respuesta inflamatoria aguda clásica, porque la población de células que la infiltra es mayoritariamente mononuclear (macrófagos y linfocitos), aunque en las etapas tempranas se observa acumulación transitoria de neutrófilos (Thoen *et al.*, 2006).

2.4 Distribución de la tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina es una enfermedad que afecta a la ganadería de muchos países, de acuerdo a datos de la Organización Internacional de Epizootias

(OIE), el 44 % de los países padecen la enfermedad, especialmente en el ganado, otros la padecen también en la fauna silvestre, lo que hace más difícil su control y su erradicación. Actualmente las estrategias de la campaña de control de la TBb se basan en reducir la prevalencia de la enfermedad, minimizando el riesgo de que los animales expuestos sean llevados a zonas de baja prevalencia, sobre todo en situaciones de comercio nacional e internacional. En México, en la actualidad se ha reconocido el 86.12% del territorio nacional en fase de erradicación, con una prevalencia menor al 0.5% (**Figura 1**) (SENASICA, 2021).



Figura 1. Situación de la tuberculosis bovina en el territorio nacional mexicano (SENASICA, 2021).

La tuberculosis en el ganado es un riesgo de salud pública, varios trabajos han demostrado con métodos moleculares la transmisión de la enfermedad del ganado al humano en zonas de alta prevalencia (Pérez *et al.*, 2008); aunque en regiones con buenas prácticas de pasteurización de la leche, el problema de tuberculosis humana por *M. bovis* ha disminuido.

Cuando la TBb se establece en la población animal, su eliminación es difícil debido a la compleja epidemiología de la enfermedad y los factores que favorecen su persistencia. Por ser una enfermedad crónica tiene un período de incubación largo, existen deficiencias para la detección de animales infectados, por el pobre comportamiento epidemiológico de las pruebas de diagnóstico, en especial la prueba de la tuberculina, y por la presencia de reservorios; además del poco interés de los productores en darle solución al problema (Pollock & Neill., 2002; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Aranaz *et al.*, 2006). Por otro lado, la TBb provoca pérdidas económicas debido a la disminución en los indicadores productivos y reproductivos, a los costos derivados del diagnóstico y los programas de control, el desecho forzado de animales y las restricciones comerciales en mercados internos y externos (Waters *et al.*, 2012; Bezos *et al.*, 2014).

2.5 La tuberculosis bovina y la salud pública

De los 10 millones de personas con TB activa, 140,000 son casos nuevos, de los que 11,400 han muerto (WHO, 2020). Sin embargo, es conocido que existe un serio problema de subreporte, por lo que el número de casos puede ser mayor. Las cifras más altas se registran en África (68,900) y el sudeste asiático (43,400) (Ramos *et al.*, 2020; WHO, 2020). El sudeste asiático comprende casi el 44% de la carga mundial de tuberculosis (WHO, 2020).

El humano se infecta con tuberculosis bovina por el consumo de leche no pasteurizada y productos lácteos contaminados, o por contacto estrecho con el ganado (de la Rúa-Domenech., 2006; Thoen *et al.*, 2010). Se ha demostrado que *Mycobacterium bovis* puede permanecer viable en queso y yogurt elaborado con leche cruda hasta por 14 días, y hasta 100 días en mantequilla (Bolaños *et al.*, 2017). Las poblaciones de mayor riesgo son ganaderos, trabajadores de rastro y trabajadores de cría de animales (Cleaveland *et al.*, 2007; Khattak *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2018). Personas inmunocomprometidas (adultos mayores y diabéticas) son especialmente susceptibles (Sichewo *et al.*, 2020). Se estima que *M. bovis* es responsable del 10-15% de los casos de tuberculosis humana en

países en desarrollo (Bapat *et al.*, 2017) y del 0.5-7.2% en países desarrollados (Vayr *et al.*, 2018).

En 1993, el gobierno mexicano implementó el programa de control y erradicación de la TBb como resultado del interés particular de Estados Unidos, su principal socio comercial, en declarar la reemergencia de la enfermedad en su territorio debida, entre otros factores, a la importación de animales infectados importados de México. Dicho programa dio origen a la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 y expedida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, cuya finalidad fue la de “fomentar la producción pecuaria, la prevención, el control y la erradicación de las plagas y enfermedades, que, como la tuberculosis, afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos, y que, además, es una de las zoonosis más importantes (Cruz-Arce., 2013).

2.6 Transmisión de la tuberculosis bovina entre el ganado

La inhalación es considerada como la ruta principal por la cual se produce la transmisión de bovino infectados a bovinos susceptibles (OIE., 2007; Dannenberg & Tomashefski., 1988). El ingreso del bacilo desde el exterior al hatos puede darse de dos formas: por la compra de animales en hatos infectados o de estatus desconocido o por la cercanía y mezcla de animales de granjas vecinas. Cuando el problema se origina por la introducción de ganado, es fácil identificar el foco de infección, dado que se tiene registro de los animales introducidos. Cuando el problema se da por la cercanía con otros hatos, identificar el origen de la infección es más complicado, ya que generalmente hay mezcla de animales de varios hatos. La propagación contigua y continua se puede prevenir reduciendo las oportunidades de contacto entre hatos (Phillips & Foster., 2003).

2.7 Control y erradicación de la tuberculosis bovina

El control y la erradicación de la tuberculosis bovina es complicada, los programas con este fin se han establecido en muchos países con resultados

mixtos. Se basan en actividades de campo realizadas por veterinarios oficiales (Crozet *et al.*, 2019). El estado infeccioso de los animales se evalúa mediante la prueba intradérmica de la tuberculina, la cual consiste en hacer una medición del grosor del pliegue cutáneo en el lugar de la inyección después de tres días. Los animales positivos se sacrifican y se imponen restricciones de movimiento de animales vivos a los productores para contener la propagación (Bezoz *et al.*, 2014; Crozet *et al.*, 2019; Arnot & Michel., 2020). Aunque efectiva en países desarrollados, que tienen la capacidad económica para pagar por los animales que se sacrifican, en el caso de los países en desarrollo la práctica no es bien aceptada, en primera porque no hay recursos económicos para compensar a los dueños de los animales y en segunda porque el sacrificio de animales representa un alto costo para el productor. El impacto de los programas de control en el comercio es significativo, mientras que el impacto en la salud pública aún es poco conocido (de la Rua-Domenech., 2006).

2.8 Vacunación contra la tuberculosis bovina en el ganado

En 1906, Calmette y Camille Guérin, un veterinario, comenzaron a subcultivar una cepa de micobacterias obtenidas de un bovino, la cual pensaron era *M. tuberculosis*, que más tarde se demostró que en realidad era *M. bovis*. Después de 13 años de atenuación por 230 pasajes en bilis de ternera, papas y glicerol, esta cepa finalmente se convirtió en la cepa del Bacilo Calmette-Guérin ó BCG (Plotkin & Plotkin., 2018). Esta cepa se ha administrado a personas como vacuna contra la TB desde 1927, y es una de las vacunas humanas más utilizadas en el mundo (Chambers *et al.*, 2014; Plotkin & Plotkin., 2018).

La vacunación del ganado contra la tuberculosis bovina no es una práctica que se utilice actualmente, a pesar de los muchos estudios que han demostrado que la vacuna es eficaz en reducir el número y la severidad de las lesiones de los animales vacunados, y por consiguiente la diseminación de la enfermedad (OIE, 2007). En 1911 se demostró que BCG era una vacuna eficaz contra la tuberculosis en el ganado (Waters *et al.*, 2012). Desde entonces se ha llevado a cabo un extenso trabajo para optimizar la dosis y la vía de administración de la vacuna

BCG en el ganado. A pesar de los muchos intentos para encontrar alternativas a la BCG, la conclusión es que ésta es la que mejores resultados proporciona y, por lo tanto, sigue siendo la más utilizada para prevenir la tuberculosis (Waters *et al.*, 2012; Buddle *et al.*, 2013; Cantó-Alarcón *et al.*, 2013; Parlane & Buddle., 2015; Vordermeier *et al.*, 2016; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018). Con el paso del tiempo, la vacuna BCG ha perdido segmentos genómicos en comparación con la cepa de campo. El principal evento atenuante fue la pérdida de la Región de Diferencia 1 (RD1) (Figura 2), que codifica antígenos inmunodominantes, incluidos el antígeno de secreción temprana de 6 kDa ESAT-6, la proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa CFP-10 y el exclusivo sistema de secreción micobacteriana ESX-1 tipo VII, por lo que estos antígenos pueden ser utilizados para realizar un diagnóstico diferencial (Brodin *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2008; Gengenbacher *et al.*, 2017; Aguilo *et al.*, 2017).

Estudios en ganado y otras especies animales han demostrado que la vacunación reduce la transmisión de la tuberculosis al reducir el número de animales con lesión, el número de lesiones por animal y el tamaño de las lesiones, así como la carga bacteriana en los tejidos afectados (Vordermeier *et al.*, 2006; Cantó *et al.*, 2013; Nugent *et al.*, 2018). Se ha reportado que la protección es mejor cuando los animales son vacunados en la vida temprana, entre dos y cuatro semanas de edad, con 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC), con una posible revacunación entre uno o dos años para mantener niveles apropiados de inmunidad. No se han observado diferencias significativas cuando se usa la cepa Pasteur o la cepa Danesa, las cepas mayormente utilizadas en el mundo.

La vacuna es segura, pero no cura las lesiones en una infección ya establecida, aunque tampoco la empeora (Cantó *et al.*, 2013; Buddle., 1995; Wedlock *et al.*, 2007), además, se ha demostrado que la vacuna no es un riesgo en animales preñados (Milián-Suazo *et al.*, 2011). El refuerzo con un filtrado proteico purificado (CFP) incrementa la respuesta inmune y la protección contra el daño patológico por la enfermedad (Cantó *et al.*, 2013; Milián-Suazo *et al.*, 2011; Buddle *et al.*, 2013).

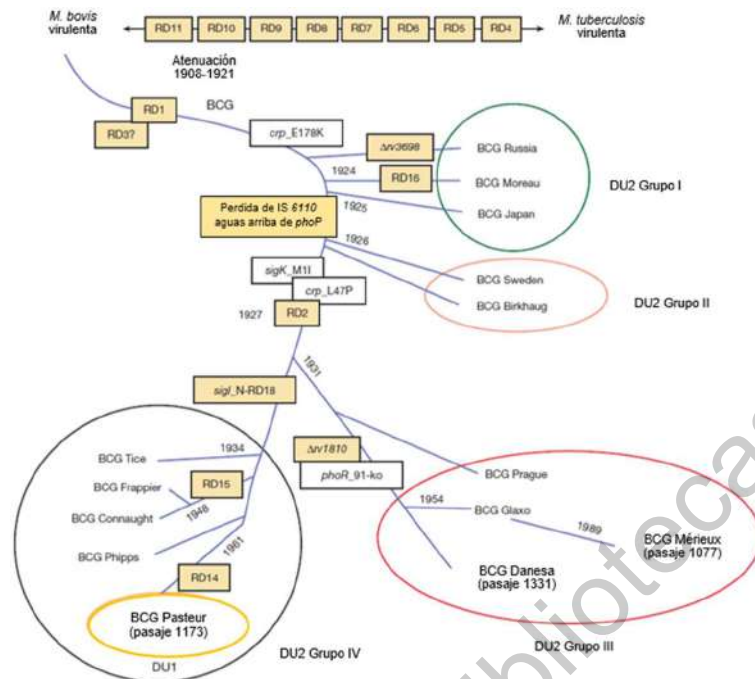


Figura 2. Atenuación de las cepas de *M. bovis* mayormente distribuidas en el mundo (Orduña *et al.*; 2011).

2.9 Las nanopartículas y las vacunas

Los puntos clave para el uso de nanopartículas en la vacunación son su capacidad para interactuar con varios tipos de células inmunitarias y encapsular y liberar antígenos y otras moléculas inmunomoduladoras que influyen en la respuesta inmune del hospedero (Capellano *et al.*, 2019). Las nanopartículas son capaces de dirigirse a las células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas y macrófagos, con lo que aumentan la actividad inmunoestimuladora de la vacuna (Luo *et al.*, 2017). Las partículas catiónicas (cargadas positivamente) tienen más probabilidades de inducir reacciones inflamatorias que las aniónicas (cargadas negativamente), y las neutras (Dobrovolskaia y McNeil., 2007; Capellano *et al.*, 2019). Para reducir el daño ocasionado por la tuberculosis una consideración en la respuesta inflamatoria es mantener respuestas Th1/Th2, la reacción inflamatoria desencadenada por las células Th que dirigen y activan otras células inmunitarias como células B, T y macrófagos para secretar diferentes citosinas. Existe un rango óptimo para que las nanopartículas migren a los

ganglios linfáticos, las más pequeñas (3-5 nm) son eliminadas por la sangre a los ganglios de derivación, las más grandes son drenadas por el sistema linfático por dos vías: 1) Las células presentadoras de antígenos, que las toman en el lugar de inyección y llevadas a los ganglios linfáticos, y 2) Son transportadas a través de los vasos linfáticos directamente a los ganglios. Sin embargo, se plantea la hipótesis de que las nanopartículas más grandes pueden quedar atrapadas más efectivamente por los ganglios linfáticos (Luo *et al.*, 2017). Todo esto ayuda a generar una mayor respuesta inmune.

2.9.1 Adyuvantes

El término "efecto adyuvante" se refiere a la administración conjunta de un antígeno con un factor microbiano específico para potenciar una respuesta inmune específica de antígeno *in vivo* (es decir, respuestas específicas de antígeno) de los antígenos con los que se co-administran (O'Hagan & Valiante, 2003). Los componentes microbianos de los adyuvantes activan las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) para producir citoquinas proinflamatorias y para regular las moléculas esenciales para la presentación del antígeno. Estas moléculas incluyen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (señal 1 específica del antígeno) y B7-1/2. Estos eventos del sistema inmune innato permiten una presentación más efectiva al sistema inmune adaptativo, lo que resulta en una activación aumentada y expansión clonal de las células T (Guimarães *et al.*, 2015).

Los adyuvantes pueden ejercer sus efectos inmuno-potenciadores de acuerdo con cinco actividades inmuno funcionales: La translocación de antígenos a los ganglios linfáticos donde pueden ser reconocidos por las células T, la protección antigénica que permite una exposición del antígeno al sistema inmune más prolongada, la reacción local mejorada en el sitio de inyección, la inducción de la liberación de citoquinas inflamatorias, la Interacción con receptores celulares, específicamente los TLRs. Los adyuvantes incorporados en las vacunas potencian la eficacia de la vacuna, modulando y prolongando la respuesta inmune. Además, reducen la concentración de antígeno y el número de inmunizaciones requeridas

para la eficacia protectora, contribuyendo a que las vacunas sean más rentables (Bonam *et al.*, 2017).

2.9.2 Quitosano

El quitosano o poli-D-glucosamina, es un polisacárido natural obtenido por la desacetilación de quitina, el principal compuesto de exoesqueletos en crustáceos. Es biodegradable y muy biocompatible (Zhu *et al.*, 2007). Esta nanopartícula ha demostrado una gran capacidad para estimular una respuesta inmune adaptativa. Las nanopartículas de quitosano se han usado junto con un adyuvante de ADN para mejorar la inmunidad específica de un antígeno (Smith *et al.*, 2015). Los factores que favorecen la absorción y la fuerte estimulación de la respuesta inmune de las vacunas basadas en quitosano son sus características fisicoquímicas (tamaño, forma, carga superficial, componentes, su hidrofiliidad y lipofilia (Khademi *et al.*, 2018). Las propiedades atractivas del quitosano, como su bioadhesión, biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo costo y capacidad de abrir uniones estrechas intercelulares, han llevado a la investigación para determinar su utilidad en los protocolos de vacunación. Las partículas de quitosano han sido ampliamente estudiadas para la administración oral de genes, vacunas y proteínas (Lu *et al.*, 2009).

Una de las cualidades más interesantes del quitosano es que retiene al antígeno en el lugar de la inyección por prolongados periodos de tiempo: La inyección subcutánea de solución de quitosano lleva a una expansión celular del 67% en los ganglios linfáticos locales, aumentando macrófagos y células NK, demostrando su capacidad para formar un depósito de antígeno. La viscosidad a dos órdenes de magnitud más que el agua lleva al mantenimiento de más del 60% del antígeno inyectado durante una semana, y más del 10% durante 11 días. La retención del antígeno por el quitosano crea un escenario ideal para la vacunación: un depósito de antígeno en un sitio de inflamación que introduce las señales de peligro críticas y la co-estimulación para generar una respuesta inmune adaptativa. El quitosano es un potente activador de macrófagos y células NK (Zaharoff *et al.*, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

La vacunación del ganado contra la tuberculosis bovina podría reducir la prevalencia, la incidencia y la propagación de la enfermedad en la población bovina, reduciendo el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal y la carga bacteriana por lesión. La capacidad de proporcionar estos beneficios en mucho depende de la estrategia de vacunación. Se ha demostrado que la BCG es la mejor vacuna de la que se puede hacer uso en la actualidad, y que fue utilizada en el ganado por primera vez en 1911 (Waters *et al.*, 2012). En las últimas dos décadas se han realizado diversos estudios que han demostrado que la primo vacunación con la BCG, más la aplicación de un refuerzo con CFP un mes después y la adición de algún adyuvante, es eficaz para reducir la diseminación de la tuberculosis en el ganado (Waters *et al.*, 2012; Buddle *et al.*, 2013; Cantó *et al.*, 2013; Parlane & Buddle, 2015; Vordermeier *et al.*, 2016; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018; Contreras *et al.*, 2021). De igual manera, se hipotetiza que las nanopartículas como el quitosano, pueden mejorar la respuesta inmune, mejorando las tasas de eficacia de las formulaciones vacunales.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la eficacia de la primo-vacunación con la cepa vacunal BCG Phipps envuelta en quitosano y un refuerzo a base de un filtrado proteico purificado.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar la inmunogenicidad de las cabras vacunadas con quitosano y sin quitosano de acuerdo a la concentración de producción de IFN- γ en sangre.
- Determinar la efectividad de la combinación vacuna-quitosano analizando el número de animales con lesiones.

V. HIPÓTESIS

La BCG envuelta con quitosano genera una mejor respuesta inmune y protege mejor contra el daño patológico que la BCG sola en la vacunación contra la tuberculosis bovina en un modelo caprino.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales experimentales

Se utilizaron 21 cabras de 3 a 5 meses de edad de una cruce de Alpina y Nubia libres de tuberculosis confirmado con la prueba de la tuberculina y la prueba de ELISA-IFN- γ (Bovigam). Los animales fueron divididos de manera aleatoria en 3 grupos de 7 animales cada uno y colocados en corrales preparados específicamente para los fines de este experimento, con suficiente espacio y sombra, considerando el bienestar animal, con agua y comida *ad libitum*. Dos de los animales murieron a una semana de iniciado el experimento por diarrea causada por coccidia, por lo que todos los animales tuvieron que ser tratados con Baycox® (Bayer) a una dosis de 20 mg/kg.

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

6.2 Crecimiento de la cepa BCG Phipps de *M. bovis*

El pellet se rehidrato en 100 ml de medio Middlebrook 7H9 + ADC + Tween 80 al 20%, al observarse crecimiento en el medio, este se centrifugó y el pellet bacteriano se agregó a 100 ml medio Middlebrook 7H9 + ADC + glicerol. Aproximadamente cuatro semanas después el crecimiento se observó sobre el medio de cultivo.

6.3 Preparación de quitosano para recubrimiento de BCG

Para la preparación de la solución de quitosano al 0.001%, se utilizaron 500 mg de quitosano de bajo peso molecular (SIGMA-ALDRICH) y 4.5 g de cloruro de sodio (NaCl) en 500 ml de agua con 5 ml de ácido acético a pH 6; la solución se dejó en agitación magnética por 24 horas, pasado el tiempo se esterilizó por filtración con un filtro de jeringa Nalgene (Thermo Scientific, membrana de acetato de celulosa de 0.2 μm libre de surfactante, carcasa de polipropileno de 25 mm).

6.3.1 Recubrimiento de BCG con quitosano

Para el recubrimiento de BCG se utilizó un medio de cultivo de BCG en Middlebrook 7H9 + ADC + Tween 80 al 20% y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 min, el pellet se lavó dos veces con NaCl al 0.9%, posteriormente se agitó en baño maría 10 min, la solución se pasó por aguja 23G para separar los grumos bacterianos y se agregó la solución de quitosano (0.5 ml/ml) y se dejó en agitador orbital durante 20 min, la solución se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min y el pellet se lavó dos veces con NaCl al 0.9% y se pasó nuevamente por aguja 23G para separar las bacterias recubiertas, esta solución bacteriana se agregó a medio de cultivo Middlebrook 7H9 + ADC + glicerol y se dejó en incubación por seis semanas, hasta su separación y cuantificación para dosificar.

6.4 Vacunación, refuerzo y desafío

Los animales experimentales fueron distribuidos a los diferentes tratamientos en un diseño completamente aleatorizado (Cuadro 1). Los animales de los grupos con vacunación fueron inoculados vía subcutánea en el lado derecho de la tabla del cuello con una dosis de 1×10^3 UFC. En el caso de BCG envuelta en quitosano, la dosis fue de 1×10^2 UFC en dos mililitros de diluyente, todos en la semana 1. Los animales que recibieron refuerzo fueron inoculados, también vía subcutánea, con 720 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con CFP de acuerdo a los diferentes protocolos. La dosis vacunal fue determinada menor a la reportada en la literatura para prevenir muertes prematuras y poder evaluar por un periodo de tiempo mayor la duración de la respuesta inmune. El adyuvante usado fue el Montanide™ en un 10% del total de

la fórmula. El inóculo de desafío fue preparado con una fase logarítmica media de una cepa de campo de *M. bovis* crecida en un medio de cultivo de Stonebrink con piruvato. Esta cepa de desafío fue obtenida en México de los linfonodos de una vaca lechera en el 2010 que fue mantenida en glicerol a -70°C. Los bacilos fueron peleteados por centrifugación a 750 g y lavado dos veces con una solución salina buffer de fosfato (PBS; 0.01 M, pH 7.2). Este pellet fue homogenizado en PBS y agitado con perlas de vidrio de manera continua a 200 rpm por 1 h. El homogenizado fue filtrado en un filtro estéril dos veces a través de un filtro de 40 µm y diluido a la dosis requerida (1×10^6 UFC) en 0.5 ml de PBS. Los cabritos fueron desafiados por inoculación directa en la tráquea con una jeringa de 3-ml (23Gx25mm), previa sedación con 0.25 mg/kg de Xilacina.

Cuadro 1. Protocolo de vacunación por cada grupo experimental.

Número de grupo	Aplicación Primaria	Aplicación de refuerzo	Aplicación de adyuvante
1	No	No	No
2	BCG	No	No
5	BCG envuelta en quitosan	CFP envuelto en quitosan	Montanide™

6.5 Toma de muestras de sangre y estimulación de antígenos

La toma de muestras de sangre para la determinación de IFN-γ como un indicativo de eficacia de la vacuna se llevó a cabo cada 2 a 3 semanas hasta la semana 30, con un total de 13 muestreos. La sangre se tomó de la vena yugular de los animales en tubos vacutainer con heparina. 750 µl de sangre completa de cada animal fue incubado en microplacas de 50 µl de cada antígeno, proteína purificada derivada (PPD), *bovis* y *avium*. Se utilizó PBS como control negativo y 50µl el mitógeno pokeweed como control positivo por cada animal, a una concentración de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Las microplacas fueron incubadas en un humidificador con 5% CO₂ a 37°C por 20h. Las

densidades ópticas (DO) del control negativo PBS se utilizaron para normalizar las lecturas del ELISA para calcular las densidades ópticas de cada antígeno. Así, las DO finales se obtuvieron substrayendo las lecturas de las muestras de PBS. La concentración de IFN- γ en sangre fue determinada después de 16 *in vitro* con el kit comercial [Bovine IFN- γ microplate Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kit (ELISA; Bovigam®; Prionics AG, USA)].

6.6 Sacrificio, clasificación de lesiones y toma de muestras

Después de seis meses del desafío, los animales se llevaron a la sala de necropsias para el sacrificio, la clasificación de lesiones y la toma de muestras de tejido de pulmón y linfonodos para histopatología y análisis microbiológico. Los animales fueron sacrificados siguiendo las indicaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Sacrificio Humanitario de los Animales Domésticos y Silvestres. Los criterios para la clasificación de lesiones se muestran en el cuadro 2. Debido a la dificultad para hacer conteo de lesiones individuales, en especial cuando estas son muy pequeñas, se decidió calificar a los animales de manera individual de acuerdo a la severidad de las lesiones y de los órganos afectados. Para esto, los órganos fueron revisados cuidadosamente y luego rebanados de manera fina para detectar lesiones internas (Figura 3). Los linfonodos de cabeza y tórax fueron removidos completos, luego una mitad fue puesta en formol al 10% para histopatología y la otra mitad fue congelada para el análisis microbiológico. Además, aproximadamente cuatro centímetros cuadrados del lóbulo craneal del pulmón fueron también colectados y divididos de la misma manera que los linfonodos. Para tener el tiempo suficiente de una revisión cuidadosa, los animales fueron sacrificados en un periodo de dos semanas, seleccionando de manera aleatoria un animal de cada grupo para sacrificio diario. Al momento del sacrificio, tanto el número y el tratamiento que recibieron los animales fueron desconocidos para el veterinario que realizó la inspección y calificó a los animales de acuerdo a la lesión observada.

Cuadro 2. Definición de la clasificación de los animales experimentales de acuerdo a la severidad de las lesiones observadas al sacrificio de cabras vacunadas contra TB con diferentes protocolos vacunales con la cepa BCG Phipps y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

Calificación	Definición
0	Sin lesiones visibles
1-1.9	Pocas lesiones (≤ 20) en pulmón o linfonodos
2-2.9	Pocas lesiones (≤ 20) en pulmones y linfonodos
3-3.9	Entre 21 y 50 lesiones en pulmón o linfonodos
4-4.9	Entre 21 y 50 lesiones en pulmón y linfonodos
5-5.9	Múltiples lesiones (entre 51 y 100) en pulmones o linfonodos
6-6.9	Múltiples lesiones (entre 51 y 100) en pulmones y linfonodos
7-7.9	Múltiples lesiones (≥ 101) diseminadas en pulmón o linfonodos
≥ 8	Múltiples lesiones (≥ 101) diseminadas en pulmón y linfonodos

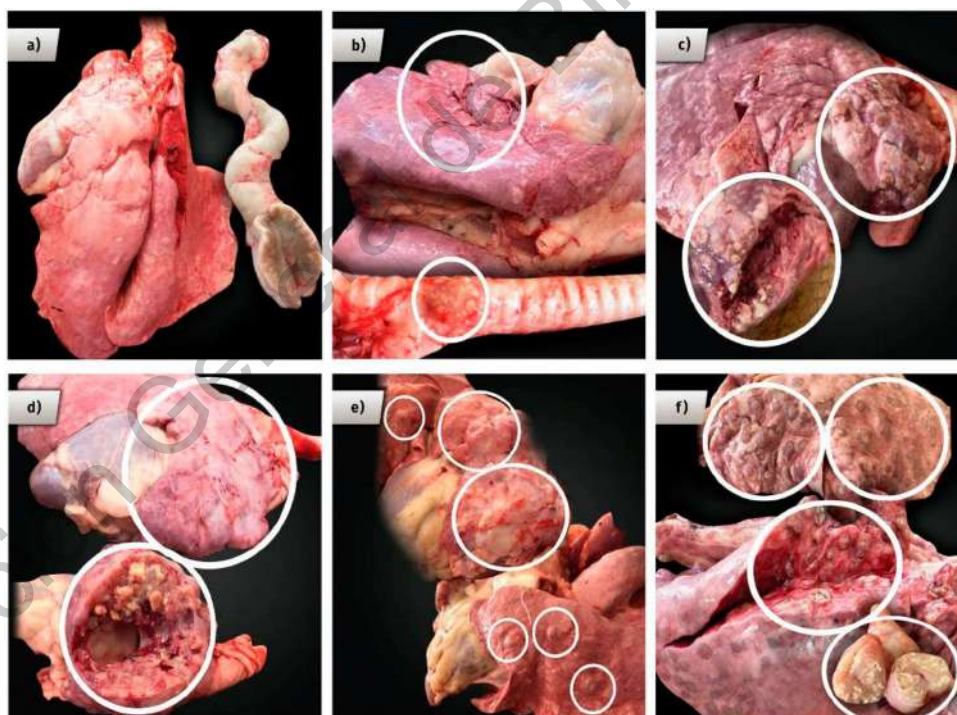


Figura 3. Ilustración de valores de calificación de animales experimentales vacunados contra tuberculosis (TB) con diferentes protocolos de vacunación y desafiados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*.

(a) Calificación 0, sin lesiones visibles, (b) 2, pequeñas lesiones purulentas focalizadas en el lóbulo pulmonar craneal, (c) 4, lesión mucopurulenta de tamaño mediano en el lóbulo pulmonar craneal (d) 6, lesión grande purulenta en el lóbulo pulmonar craneal, (e) 8, múltiples lesiones focales en pulmones y una lesión mediana en el lóbulo pulmonar craneal y (f) 10, múltiples lesiones tuberculosas pequeñas cubriendo los pulmones y una lesión grande en el lóbulo pulmonar craneal y los linfonodos craneales y torácicos.

6.7 Análisis estadístico

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

Dirección General de Bibliotecas UNAQ

VII. RESULTADOS

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

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

7.1 Respuesta de IFN- γ en sangre

A la fecha, el mejor indicador de eficacia de la vacuna es la concentración de IFN- γ en sangre. En este estudio no se observó diferencia significativa entre los grupos experimentales en la semana uno, tres y seis ($p > 0.05$), sin embargo, el grupo 1 tuvo menor concentración que los grupos vacunados, grupos 2 y 3. Tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos en los muestreos finales del experimento, semanas 24, 28 y 30 ($p > 0.05$), cuando la concentración de IFN- γ regresó a los niveles basales. En general, hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos vacunados y el grupo control en las semanas 8-22, excepto por algunas semanas donde la diferencia fue variable, y no hubo diferencia significativa entre algunos de los grupos vacunados y el grupo control. El pico de concentración de IFN- γ se alcanzó en la semana 20 (muestreo 9) en todos los grupos. Cinco semanas después del desafío, el grupo 2, vacunado únicamente con la cepa BCG, tuvo la mayor respuesta de IFN- γ , y el control mostró la respuesta más baja. Todos los grupos regresaron a los niveles básicos en la semana 30 (Figura 4).

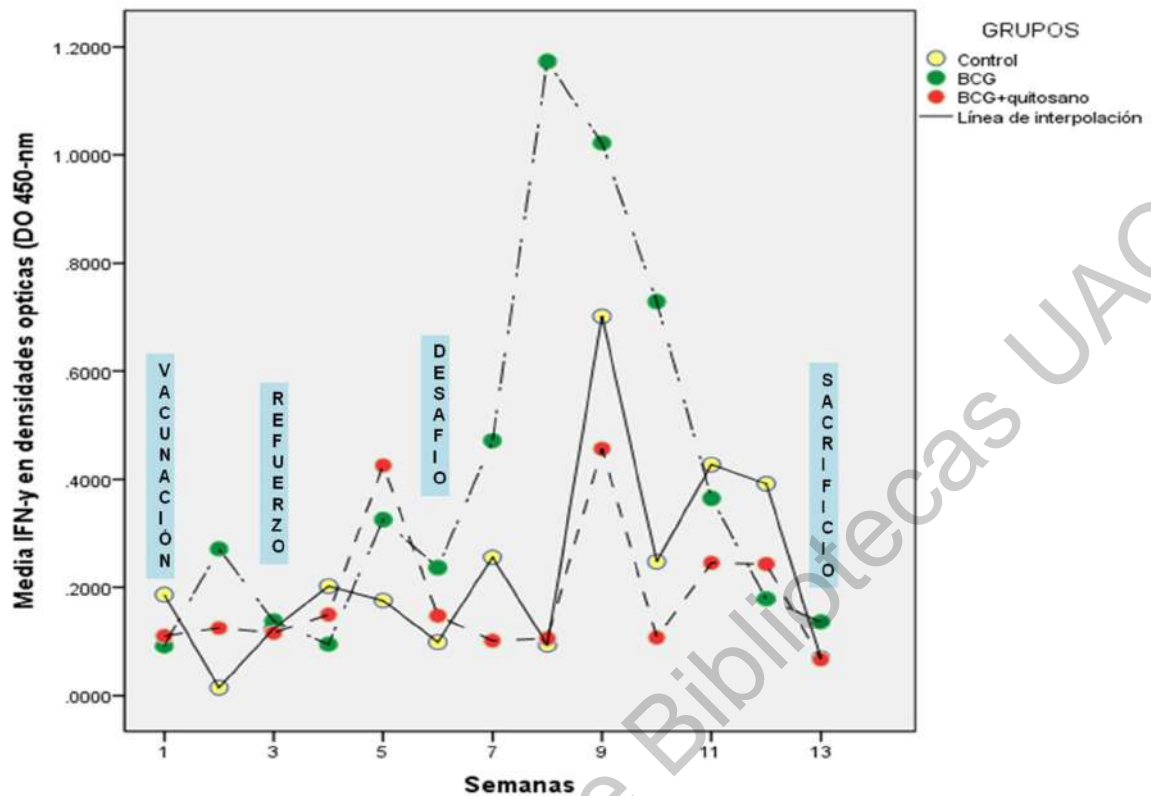


Figura 4. Concentración de interferon gamma (IFN- γ) en sangre en cabras después de la vacunación, refuerzo y desafío con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis*. El derivado proteico purificado (PPD) usado en la estimulación de sangre completa *in vitro* fue *M. bovis*. Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450 nm).

7.2 Lesiones en los animales

El número y la proporción de animales con lesiones y el promedio de calificación de lesiones por grupo experimental se muestran en el cuadro 3. Todos los animales en el grupo 1, y seis de siete de los animales en el grupo 2, mostraron lesiones al sacrificio. En el grupo 3, cuatro de seis tuvieron lesiones. Se observó diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los grupos 1 y 2 con el grupo 3. Este indica que el grupo 3 fue más eficaz en prevenir la presentación de lesiones en los animales.

El promedio de calificación de las lesiones de todos los grupos experimentales también se muestra en el cuadro 4, y ejemplos del método de clasificación de las lesiones se muestran en la figura 4. No se observaron

diferencias significativas entre el grupo 1 (6.3_3.2) y el grupo vacunado únicamente con la BCG (3.0_2.2) en una prueba post-hoc de Tukey; sin embargo, si se observó diferencia significativa entre estos dos grupos con el grupo 3 (1.7_1.5), vacunado con el BCG con quitosano. Este resultado muestra que la combinación de BCG con el polímero quitosano, aunque no genera una mayor respuesta de interferón gamma (IFN- γ), sí previene significativamente la presentación de lesiones en los animales vacunados y la severidad de dichas lesiones.

Cuadro 3. Número y proporción de animales con lesiones visibles, promedio, desviación estándar e intervalo de confianza al 95% para la calificación de lesiones después de la vacunación contra TB y el desafío con cepa de campo de *Mycobacterium bovis* en un modelo caprino.

Grupo experimental	Animales con lesión*/animales desafiados (%)	Promedio de calificación de lesiones**	95% CI
Control	6/6 (100)	6.33 ^b \pm 3.2	2.97; 9.69
BCG	6/7 (86)	3.00 ^{ab} \pm 2.2	0.98; 5.01
BCG con quitosano +CFP+ady.	4/6 (67)	1.75 ^a \pm 1.5	0.20; 3.29

*Lesiones en pulmones y/o linfonodos (retrofaringeo, traqueobronquial, mediastinico y mesentéricos). **Medias con literales iguales no son estadísticamente diferentes en la prueba post-hoc HSD Tukey test ($p > 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

Los experimentos sobre la eficacia de la BCG para reducir el daño patológico en animales vacunados contra la tuberculosis en ganado y otras especies animales han identificado algunos factores que influyen en la respuesta inmune (Buddle., 1995; Buddle *et al.*, 1999; Corner *et al.*, 2001; Skinner *et al.*, 2001; Corner *et al.*, 2002; Francis 1950): factores tales como la cepa vacunal, la dosis y la ruta de inoculación (Vordemeier *et al.*, 2006). En este estudio nosotros usamos la cepa Phipps. Esto fue porque en un estudio previo en ratones mostro la mejor eficacia para prevenir el daño patológico, en comparación con otras 9 cepas hijas de la BCG (Castillo Rodal *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios han utilizado las cepas Pasteur o la Danesa, y no han encontrado diferencias significativas entre estas (Ameni *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2006; Wedlock *et al.*, 2007; Skinner *et al.*, 2003).

En relación a la dosis (1×10^3 CFU para la BCG sola, y 1×10^2 CFU para la BCG con quitosano), que fue menor a la reportada en cabras por otros autores (Pérez de Val *et al.*, 2012; De Val *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2017), fue con el fin de prevenir la muerte temprana de los animales y tener la oportunidad de evaluar la duración de la respuesta inmune por un periodo mayor de tiempo en los animales vacunados. Con base en el alto nivel de daño patológico observado en el grupo control, se puede concluir que esta dosis es apropiada para estudios experimentales en cabras, y para prevenir el desarrollo de lesiones tuberculosas en animales vacunados.

En estudios sobre la eficacia de la BCG para controlar la tuberculosis se han utilizado diferentes vías de aplicación de la vacuna (Palmer *et al.*, 2007; Buddle *et al.*, 2003). En este experimento nosotros utilizamos la ruta subcutánea, porque al igual que otros autores, pensamos que, en caso de aprobarse la vacunación masiva del ganado, esta sería la ruta más práctica de aplicación de la vacuna (Buddle *et al.*, 1999; Corner *et al.*, 2002).

Estudios previos han reportado el papel tan importante del refuerzo para mejorar la respuesta inmune y la protección contra el desarrollo de lesiones (Buddle 1995; Buddle *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2004; Wedlock *et al.*, 2005). Nuestros resultados concuerdan con esos reportes: todos los animales con refuerzo de CFP tuvieron menores valores de calificación de la severidad de las lesiones que los animales que se vacunaron únicamente con la vacuna BCG. Estos resultados concuerdan también con reportes de nuestro grupo de trabajo con experimentos en bovinos (Cantó *et al.*, 2013).

Se observó diferencia significativa del promedio de calificación de lesiones entre el grupo 1, grupo control y el grupo 3, vacunado con BCG envuelta en quitosano (Cuadro 3). Esta diferencia pudo haber sido mayor, un animal del grupo control mostró una lesión grande en el sitio de aplicación en tráquea, sugiriendo que el inóculo no fue depositado dentro de la tráquea, por lo que, al sacrificio, el animal solo presentó algunas lesiones pequeñas y leves en linfonodos, reduciendo la diferencia estadística. Ninguno del resto de los animales mostró este tipo de lesión en el sitio de aplicación.

Una observación relevante en este estudio fue que los animales del grupo control, a pesar de mostrar severas lesiones en pulmones y linfonodos, que los hicieron meritorios a calificación de 10 al momento de la inspección de canales en el sacrificio, no mostraron signos clínicos de enfermedad por tuberculosis, y tuvieron comportamiento similar al de aquellos que fueron vacunados. En algunos países existe la creencia de que las cabras son naturalmente resistentes a la tuberculosis; sin embargo, a la fecha no existe evidencia científica que soporte esta hipótesis.

Nuestros resultados muestran que protocolos de primo vacunación con BCG y el refuerzo con proteínas tiene el potencial de reducir la diseminación de la tuberculosis en las poblaciones animales al reducir el daño patológico en los vacunados. Esto apoya la hipótesis de que la vacunación, incorporada a los actuales programas de control, puede ser de utilidad para acelerar la eliminación de esta enfermedad en los hatos bovinos infectados. Nuestro grupo de trabajo

está preparado para ejecutar el siguiente paso, pruebas de campo a gran escala en hatos comerciales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IX. CONCLUSIÓN

Este estudio demuestra que la primo vacunación con la cepa BCG Phipps envuelta en quitosano, más un refuerzo de CFP también envuelto en quitosano, protege significativamente mejor que la vacunación únicamente con la cepa BCG. Estos resultados demuestran que la vacunación tiene el potencial para prevenir la diseminación de la tuberculosis en los hatos bovinos y reducir la incidencia y la prevalencia de la enfermedad.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

X. LITERATURA CITADA

- Aguilo, N., Gonzalo-Asensio, J., Alvarez-Arguedas, S., Marinova, D., Gomez, AB., Uranga, S., *et al.* 2017. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* 8: 16085. DOI: 10.1038/ncomms16085.
- Alexander, K. A., Laver, P. N., Michel, A. L., Williams, M., van Helden, P. D., Warren, R. M., & Gey van Pittius, N. C. 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases.* 16(8): 1296–1299. DOI:10.3201/eid1608.100314.
- Ameni, G., & Tibbo, M. 2002. Kinetics of interferon-gamma (IFN-gamma) release in the peripheral blood of calves vaccinated with BCG. *J Immunoassay Immunochem.* 23(2): 245-53. DOI: 10.1081/IAS-120003664.
- Aranaz, A., De Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, JL., López-Sánchez, J., Mateos, A. & Domínguez, L. 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Res.* 37(4): 593-606. DOI: 10.1051/vetres: 2006021.
- Arnot, LF. & Michel, A. 2020. Challenges for controlling bovine tuberculosis in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 87(1): e1-e8. DOI:10.4102/ojvr.v87i1.1690.
- Arrieta-Villegas, C.; Perálvarez, T.; Vidal, E.; Puighibet, Z.; Moll, X.; Canturri, A.; Sevilla, I.A.; Espada, Y.; Juste, R.A.; Domingo, M.; *et al.* 2018. Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLoS ONE*, 13, e0196948.
- Bapat PR, Dodkey RS, Shekhawat SD, Husain A, Nayak AR, Kawle AP, Dagainawala HF, Singh LK, Kashyap RS. 2017. Prevalence of zoonotic tuberculosis and associated risk factors in Central Indian population. *J Epidemiol Glob Health.* 7 (4): 277-283.
- Bengis RG, Kriek NP, Keet DF, Raath JP, de Vos V, Huchzermeyer HF. 1996. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer--sparrman*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort J Vet Res.* 63 (1):15-8. PMID: 8848298.
- Bezoes, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, AJ., López, L., Rueda, P. & Domínguez, L. 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 97: S44-52. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.04.002.
- Biet, F., Boschioli, M., Thorel, M. & Guilloteau, L. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res.* 36 (3): 411-436.
- Blasius, AL., & Beutler, B. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity.* 32(3): 305-15. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.03.012.
- Bolaños, C., Paula, C. L., Guerra, S. T., Franco, M., & Ribeiro, M. G. 2017. Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview. *Revista do Instituto*

- de Medicina Tropical de Sao Paulo. 59: e40. DOI: 10.1590/S1678-9946201759040.
- Bonam, SR., Partidos, CD., Halmuthur, SKM. & Muller, S. 2017. An overview of novel adjuvants designed for improving vaccine efficacy. Trends Pharmacol Sci. 38 (9): 771-793.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, MI., Bottai, D., Demangel, C., *et al.* 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. Infect Immun. 74 (1): 88-98.
- Buddle, BM., Keen, D., Thomson, A., Jowett, G., McCarthy, AR., Heslop, J., De Lisle, GW., Stanford, JL. & Aldwell, FE. 1995. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. Res Vet Sci; 59(1):10-6. DOI: 10.1016/0034-5288(95)90023-3.
- Buddle, B. 1995. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine, 13, 1123–1130.
- Buddle, B.M.; Aldwell, F.E.; Skinner, M.A.; Lisle GW de 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, 3581–3589.
- Buddle, B.M.; Parlane, N.A.; Keen, D.L.; Aldwell, F.E.; Pollock, J.M.; Lightbody, K.; Andersen, P. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and M. bovis-Infected Cattle by Using Recombinant Mycobacterial Antigens. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 6, 1–5.
- Buddle, B.M.; Parlane, N.A.; Wedlock, D.N.; Heiser, A. 2013. Overview of Vaccination Trials for Control of Tuberculosis in Cattle, Wildlife and Humans. Transbound. Emerg, 60, 136–146.
- Buddle, B.M.; Wedlock, D.N.; Parlane, N.A.; Corner, L.A.L.; de Lisle, G.W.; Skinner, M.A. 2003. Revaccination of Neonatal Calves with *Mycobacterium bovis* BCG Reduces the Level of Protection against Bovine Tuberculosis Induced by a Single Vaccination. Infect. Immun, 71, 6411–6419.
- Cai, H.; Yu, D.H.; Hu, X.D.; Li, S.X.; Zhu, Y.X. 2006. A Combined DNA Vaccine-Prime, BCG-Boost Strategy Results in Better Protection Against *Mycobacterium bovis* Challenge. DNA Cell Biol. 25, 438–447.
- Cantó-Alarcón, G.J., Rubio-Venegas, Y., Bojorquez-Narvaez, L., Pizano-Martínez, OE., García-Casanova, L., *et al.* 2013. Efficacy of a vaccine formula against tuberculosis in cattle. PLoS One. 8 (10): e76418.
- Cappellano, G.; Comi, C.; Chiocchetti, A.; Dianzani, U. 2019. Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease. Int. J. Mol. Sci. 20, 204.
- Castilho, A., Caleffi-Ferracioli, K., Canezin, P., Dias, V., de Lima, R. & Fressatti, R. 2015. Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. J Microbiol Meth. 111: 119-121.
- Castillo-Rodal, A.I.; Castañón-Arreola, M.; Hernández-Pando, R.; Calva, J.J.; Sada-Díaz, E.; López-Vidal, Y. 2006. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against *Mycobacterium tuberculosis* Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. Infect. Immun. 74, 1718–1724.

- Chambers, M.A.; Carter, S.P.; Wilson, G.J.; Jones, G.; Brown, E.; Hewinson, R.G.; Vordermeier, M. 2014. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: An overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Vet. Rec.* 175, 90–96.
- Cleaveland; S., Shaw, DJ., Mfinanga, SG., Shirima, G., Kazwala, RR., Eblate, E. & Sharp, M. 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis (Edinb)*. 87(1): 30-43. DOI: 10.1016/j.tube.2006.03.001.
- Coffman RL, Sher A, Seder RA. Immunity.2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.10.002.
- Contreras-Magallanes, YG., Durán-Aguilar, M., Sosa-Gallegos, SL., Álvarez, AH., Andrade-Santillán, FA., Bárcenas-Reyes, I., *et al.*, 2021. Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model. *Animals (Basel)*. 11(4): 1046. DOI: 10.3390/ani11041046.
- Corner, L.A.L.; Buddle, B.M.; Pfeiffer, D.U.; Morris, R.S. 2001. Aerosol vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) with bacille Calmette-Guearin: The duration of protection. *Vet. Microbiol.* 81, 181–191.
- Corner, L.A.L.; Buddle, B.M.; Pfeiffer, D.U.; Morris, R.S. 2002. Vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) against *Mycobacterium bovis* infection with bacille Calmette-Guérin: The response to multiple doses. *Vet. Microbiol.* 84, 327–336.
- Crozet, G., Dufour, B. & Rivière, J. 2019. Investigation of field intradermal tuberculosis test practices performed by veterinarians in France and factors that influence testing. *Res Vet Sci.* 124: 406-416. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.05.001.
- Cruz-Arce, J. 2013. Historia de la tuberculosis. Prevalencia de tuberculosis bovina en el estado de Chiapas. Pp.6-8. Torreón, Coahuila, México.
- D. Young, T. Hussell, G. Dougan. 2002. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat. Immunol.*, 3, pp. 1026-1032.
- D.B. Young, M.D. Perkins, K. Duncan, C.E. Barry 3rd. 2008. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, 118, pp. 1255-1265 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18382738/>.
- Dannenbeg A. M., & Tomaszefski. J.F. 1988. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Mc Graw- Hill Interamericana, España.
- De Kantor IN, LoBue PA, Thoen CO. 2010. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *Int J Tuberc Lung Dis* 14(11):1369-73.
- De la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A., Vordermeier, H., Hewinson, R., Christiansen, K. & Clifton-Hadley, R. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81(2): 190-210.
- De Lisle G.W., Mackintosh C.G. & Bengis R.G. 2001. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, 86–111.

- De Val, B.P.; Vidal, E.; Nofrarías, M.; López-Soria, S.; Cardona, P.-J.; Domingo, M. 2014. Assessment of Goat Tuberculosis Model for Use in Vaccine Trials. *Procedia Vaccinol.* 8, 43–49.
- De Vos V, Bengis RG, Kriek NP, Michel A, Keet DF, Raath JP, Huchzermeyer HF. 2001. The epidemiology of tuberculosis in free-ranging African buffalo (*Syncerus caffer*) in the Kruger National Park, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res.* 68 (2):119-30. PMID: 11585089.
- Denis M, Keen DL, Parlane NA, Storset AK, Buddle BM. 2007. Bovine natural killer cells restrict the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages and enhance IL-12 release by infected macrophages. *Tuberculosis (Edinb).* 87(1):53-62. DOI: 10.1016/j.tube.2006.03.00
- Dippenaar, A., Parsons, SDC., Sampson, SL., van der Merwe, RG., Drewe, JA., Abdallah, AM., Siame, KK., Gey van Pittius, NC., van Helden, PD., Pain, A. & Warren, RM. 2015. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium suricattae*. *Tuberculosis (Edinb).* 95 (6): 682-688. DOI: 10.1016/j.tube.2015.10.001.
- Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2, 469–478.
- Ferraz, J.C.; Stavropoulos, E.; Yang, M.; Coade, S.; Espitia, C.; Lowrie, D.B.; Colston, M.J.; Tascon, R.E. 2004. A Heterologous DNA Priming-*Mycobacterium bovis* BCG Boosting Immunization Strategy Using Mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa Antigens Improves Protection against Tuberculosis in Mice. *Infect. Immun.* 72, 6945–6950.
- Francis, J. 1950. Control of infection with the bovine tubercle bacillus. *Lancet*, 1, 34–39.
- Ganguly, N., Giang, PH., Gupta, C., Basu, SK., Siddiqui, I., Salunke, DM., *et al.* 2008. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunol Cell Biol.* 86 (1): 98-106.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, 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 PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13): 7877-82. DOI: 10.1073/pnas.1130426100.
- Gengenbacher, M., Nieuwenhuizen, NE. & Kaufmann, SHE. 2017. BCG — old workhorse, new skills. *Curr Opin Immunol.* 47: 8-16.
- Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):23-41. DOI: 10.1054/tube.2000.0256.
- Guimarães, LE., Baker, B., Perricone, C. & Shoenfeld, Y. 2015. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res.* 100: 190-209.
- Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ. 2005. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease

- in cattle. *Clin Exp Immunol.* 141(3):432-9. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02882.x.
- Huard, RC., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, LC., van Soolingen, D., Cousins, D. & Ho, JL. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol.* 188 (12): 4271-87. DOI: 10.1128/JB.01783-05.
- Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A. 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 71-76.
- Khademi, F.; Taheri, R.-A.; Yousefi Avarvand, A.; Vaez, H.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Soleimanpour, S. 2018. Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines? *Microb. Pathog.* 121, 218–223.
- Khattak I, Mushtaq MH, Khan MS, Sadique U 2016. Risk factors associated with *Mycobacterium bovis* skin positivity in cattle and buffalo in Peshawar, Pakistan. *Trop. Anim. Health Prod.* 48(3): 479-485. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-015-0976-3>.
- Kleeberg HH 1984. The tuberculin test in cattle. *J. Afr. Vet. Med. Assoc.* 31: 213–225.
- López C., Rentería T., Williams J., Licea A., Valle A., & Medina G. 2010. Field Evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, Elsevier. 88 (1): 44-49
- Lu, E., Franzblau, S., Onyuksel, H. & Popescu, C. 2009. Preparation of aminoglycoside-loaded chitosan nanoparticles using dextran sulphate as a counterion. *J Microencapsul.* 26 (4): 346-54.
- Luo, M.; Samandi, L.Z.; Wang, Z.; Chen, Z.J.; Gao, J. 2017. Synthetic nanovaccines for immunotherapy. *J. Control. Release*, 263, 200–210.
- Michel, A., Müller, B. & van Helden, P. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Vet Microbiol.* 140 (3-4): 371-381.
- Milián Suazo, Feliciano, Harris, Beth, Arriaga Díaz, Camila, Thomsen, Bruce, Stuber, Tod, González Suárez, Dante, Álvarez Ojeda, Genoveva, Santillán Flores, Marco A., Morales Loredó, Alberto, & Estrada Chávez, Ciro. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(4), 403-415
- Milián-Suazo, F.; Gutiérrez-Pabello, J.A.; Bojorquez-Narváez, L.; Anaya-Escalera, A.M.; Cantó-Alarcón, G.J.; González-Enríquez, J.L.; Campos-Guillén, J. 2011. IFN- γ response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. *Res. Vet. Sci.* 90, 419–424.
- Nugent, G.; Yockney, I.J.; Cross, M.L.; Buddle, B.M. 2018. Low-dose BCG vaccination protects free-ranging cattle against naturally acquired bovine tuberculosis. *Vaccine*, 36, 7338–7344.
- O'Hagan, DT. & Valiante, NM. 2003. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature reviews. Drug discovery.* 2(9): 727–735. DOI: [10.1038/nrd1176](https://doi.org/10.1038/nrd1176).

- OIE (World organization for animal health). 2007. OIE-tuberculosis bovina. Manual OIE. P- 267-275. Available from:
<http://www.oie.int/ep/normes/mmanual/A00054.htm>.
- OIE (World organization for animal health). 2021. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2021. Available from:
<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>
- OIE (World organization for animal health). 2018. Available online:
<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bovine-tuberculosis/>
- O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 76 Suppl 1:1-46. DOI: 10.1016/0962-8479(95)90591-x
- Orduña P, Cevallos M.A, Ponce de León S, Arvizu A, L Hernández-González I, Mendoza—Hernández G, & López-Vidal Y. 2011. Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. Available online:
<https://bmccgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-493>
- Palmer, M.V.; Thacker, T.C.; Waters, W.R. 2007. Vaccination of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin. *Vaccine*, 25, 6589–6597.
- Parlane, NA. & Buddle, BM. 2015. Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Curr Clin Micro Rpt.* 2: 44–53.
- Pérez de Val, B.; Villarreal-Ramos, B.; Nofrarías, M.; López-Soria, S.; Romera, N.; Singh, M.; Abad, F.X.; Xing, Z.; Vordermeier, H.M.; Domingo, M. 2012. Goats Primed with *Mycobacterium bovis* BCG and Boosted with a Recombinant Adenovirus Expressing Ag85A Show Enhanced Protection against Tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1339–1347.
- Pérez-Guerrero, Laura, Milián-Suazo, Feliciano, Arriaga-Díaz, Camila, Romero-Torres, Cecilia, & Escartín-Chávez, Minerva. 2008. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública de México*, 50(4), 286-291
- Pérez-Morote, R., Pontones-Rosa, C., Gortázar-Schmidt, C. & Muñoz-Cardona, A.I. 2020. Quantifying the Economic Impact of Bovine Tuberculosis on Livestock Farms in South-Western Spain. *Animals.* 10, 2433; DOI: 10.3390/ani10122433.
- Phillips, C. J., & Foster, C.R. 2003. The transmission of *mycobacterium bovis* infection to cattle. *Rev. Vet. Sci.* 74:1-15.
- Plotkin, SL. & Plotkin, SL. 2018. A Short History of Vaccination, p 7. In Plotkin, SA., Orenstein, WA., Offit, PA. & Edwards, KM. *Plotkin's Vaccines*, 7th ed. Elsevier, Philadelphia, PA.
- Pollock, J. & Neill, S. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.* 163 (2): 115-127.
- R. L. Coffman, A. Sher, & R. A. Seder, 2010. "Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work," *Immunity*, vol. 33, no. 4, pp. 492–503. View at Publisher.
- Ramos, B., Pereira, AC., Reis, AC. & Cunha, MV. 2020. Estimates of the global and continental burden of animal tuberculosis in key livestock species

worldwide: A meta-analysis study. *One Health*. 10: 100169. DOI: 10.1016/j.onehlt.2020.100169.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Tuberculosis Bovina [citado el 02 Mayo 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-contra-la-tuberculosis-bovina-49517>.

Sichewo, P. R., Hlokwe, T. M., Etter, E., & Michel, A. L. 2020. Tracing cross species transmission of *Mycobacterium bovis* at the wildlife/livestock interface in South Africa. *BMC microbiology*. 20(1): 49. DOI: 10.1186/s12866-020-01736-4.

Skinner, M.A.; Buddle, B.M.; Wedlock, D.N.; Keen, D.; de Lisle, G.W.; Tascon, R.E.; Candido Ferraz, J.; Lowrie, D.B.; Cockle, P.J.; Vordermeier, H.M.; et al. 2003. A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG Boost Vaccination Strategy for Cattle Induces Protection against Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun*. 71, 4901–4907.

Skinner, M.A.; Wedlock, D.N.; Buddle, B.M. 2001. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 20, 112–132.

Smith, J.D.; Morton, L.D.; Ulery, B.D. 2015. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol*. 34, 217–224.

Thoen, C. & Barletta, R. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans (Second Edition, pp. 18–33). Iowa, U.S.A.: Blackwell

Thoen, C., Lobue, P. & de Kantor, I. 2006. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol*. 112 (2-4): 339-345.

Thoen, CO., LoBue, PA. & de Kantor, I. 2010. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention? *Int J Tuberc Lung Dis*. 14(9): 1073-4.

Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infec*. 15 (10): 906-910.

Ullah, A., Khattak, US., Ayaz, S. & Qureshi, MS. 2018. An emerging zoonosis of bovine tuberculosis-a neglected zoonotic disease (NZD) in work-related occupational groups in Pakistan. *J Microb Pathog*. 2: 105.

Vayr, F., Martin-Blondel, G., Savall, F., Soulat, J. M., Deffontaines, G., & Herin, F. 2018. Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(1): e0006208. DOI:10.1371/journal.pntd.0006208.

Vidal, E.; Arrieta-Villegas, C.; Grasa, M.; Mercader, I.; Domingo, M.; Pérez de Val, B. 2017. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis in goats. *BMC Vet. Res*. 13, 252.

Viena-Niero, C., Rodríguez, C., Bigi, F., Zanini, M., Ferreira-Neto, J., Cataldi, A. & Leão, S. 2006. Identification of an IS6110 insertion site in plcD, the unique phospholipase C gene of *Mycobacterium bovis*. *J Med Microbiol*. 55 (Pt4): 451-457.

Vordermeier HM, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. 2002. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against

- experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 70(6):3026-32. DOI: 10.1128/IAI.70.6.3026-3032.2002.
- Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3:571-8. DOI: 10.1128/CDLI.8.3.571-578.2001.
- Vordermeier, H.M.; Chambers, M.A.; Buddle, B.M.; Pollock, J.M.; Hewinson, R.G. 2006. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Vet. J.* 171, 229–244.
- Vordermeier, H.M.; Jones, G.J.; Buddle, B.M.; Hewinson, R.G.; Villarreal-Ramos.2016. B. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 4, 87–109.
- Vordermeier, H.M.; Rhodes, S.G.; Dean, G.; Goonetilleke, N.; Huygen, K.; Hill, A.V.S.; Hewinson, R.G.; Gilbert, S.C. 2004. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guerin. *Immunology.* 112, 461–470.
- Waters, W.R.; Palmer, M.V.; Buddle, B.M.; Vordermeier, H.M. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611–2622.
- Wedlock, D.N.; Denis, M.; Skinner, M.A.; Koach, J.; de Lisle, G.W.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; van Drunen Littel-van den Hurk, S.; Babiuk, L.A.; Hecker, R.; *et al.* 2005. Vaccination of Cattle with a CpG Oligodeoxynucleotide-Formulated Mycobacterial Protein Vaccine and *Mycobacterium bovis* BCG Induces Levels of Protection against Bovine Tuberculosis Superior to Those Induced by Vaccination with BCG Alone. *Infect. Immun.* 73, 3540–3546.
- Wedlock, D.N.; Denis, M.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Buddle, B.M. 2007. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118, 50–58.
- WHO (World Health Organization). Global Tuberculosis report 2020. Geneva, Switzerland. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- Zaharoff, D.A.; Rogers, C.J.; Hance, K.W.; Schlom, J.; Greiner, J.W. 2007. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 25, 2085–2094.
- Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle A, Fermé M, Karoui C, Boschirolu ML. 2008. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl* 1:99-108. DOI: 10.7589/0090-3558-44.1.99
- Zhu, B.D.; Qie, Y.Q.; Wang, J.L.; Zhang, Y.; Wang, Q.Z.; Xu, Y.; Wang, H.H. 2007. Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 318–326.