



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**Evaluación de diferentes protocolos de vacunación contra la
tuberculosis bovina utilizando como base la cepa vacunal BCG**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

MSPAS. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

Dirigido por

Dr. Feliciano Milián Suazo

Querétaro, Qro., 30 junio de 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

Evaluación de diferentes protocolos de vacunación contra la tuberculosis bovina utilizando como base la cepa vacunal BCG

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

MSPAS. Yesenia Guadalupe Contreras Magallanes

Dirigido por

Dr. Feliciano Milián Suazo

Dr. Feliciano Milián Suazo
Presidente

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Secretario

Dr. Elba Rodríguez Hernández
Vocal

Dra. Isabel Bárcenas Reyes
Suplente 1

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila
Suplente 2

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio 2022
México

RESUMEN

La tuberculosis bovina se mantiene como un problema sanitario que causa severas pérdidas económicas a la ganadería en muchas partes del mundo, en especial en países en desarrollo. Este problema se agrava en ganadería especializada en la producción de leche, donde la estrategia de prueba-y-sacrificio, base de los programas de control en la mayoría de los países, no ha sido aceptada por los productores, ante esto, en los últimos años se ha propuesto el uso de la vacuna BCG como estrategia complementaria. Sin embargo, su aplicación está condicionado a que la eficacia de la vacuna actual mejore. Para esto, la investigación de los últimos años se ha centrado en cumplir este objetivo. Trabajos experimentales han demostrado que los protocolos de vacunación que utilizan refuerzo con proteínas mejoran la eficacia de la vacuna, al igual que lo hacen algunas nanomoléculas. El uso de polímeros como el quitosano y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) mejora la respuesta inmunitaria frente a diferentes enfermedades, mejorando la interacción de los antígenos con el sistema inmunitario celular y modulando la respuesta inmunitaria del huésped. En este estudio se utilizaron cinco grupos experimentales de cabras libres de tuberculosis y paratuberculosis, cuatro de los cuales fueron vacunados con diferentes formulaciones vacunales y uno se mantuvo sin vacunar como grupo control. Los resultados muestran que la vacunación primaria con la cepa BCG Phipps, potenciada con una proteína filtrada de cultivo (CFP), sola o en combinación con quitosano y ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), reduce la diseminación de la tuberculosis (TB) al reducir el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal y el tamaño de las lesiones en los animales vacunados, en comparación con los no vacunados o los vacunados con BCG sola. Los grupos vacunados mostraron niveles significativamente mayores de interferón- γ , indicativo de eficacia de la vacuna, en sangre en comparación con el grupo control después de la vacunación, después del refuerzo y después del desafío con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis* ($p < 0.05$). Se demostró que la vacunación con BCG y el refuerzo con filtrado proteico de cultivo, solo o en combinación con un

biopolímero, el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal y el tamaño de las lesiones en animales vacunados, en comparación con los no vacunados o los vacunados con BCG sola, se redujeron significativamente ($p < 0.05$). Nuestros resultados confirman que la vacunación utilizada como complemento de los programas actuales de control de la tuberculosis en poblaciones animales puede ser útil para reducir la incidencia, la prevalencia, y por ende la diseminación de la enfermedad dentro de los hatos infectados y para prevenir la entrada en hatos libres.

(Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, FCP, poly (ácido láctico-co-glicólico), quitosano).

ABSTRACT

Bovine tuberculosis remains a health problem that causes severe economic losses to livestock in many parts of the world, especially in developing countries. This problem is aggravated in livestock specialized in milk production, where the test-and-slaughter strategy, the basis of control programs in most countries, has not been accepted by producers. Given this, in recent for years, the use of the BCG vaccine has been proposed as a complementary strategy. However, its application is conditional on the effectiveness of the current vaccine improvement. For this, research in recent years has focused on meeting this objective. Experimental work has shown that vaccination protocols that use protein-boosting improve the efficacy of the vaccine, as do some nano molecules. The use of polymers such as chitosan and polylactic-co-glycolic acid (PLGA) improves the immune response against different diseases, improving the interaction of antigens with the cellular immune system and modulating the host's immune response. In this study, five experimental groups of tuberculosis and paratuberculosis-free goats were used, four of which were vaccinated with different vaccine formulations, and one remained unvaccinated as a control group. The results show that primary vaccination with the BCG Phipps strain, boosted with culture filtered protein (CFP), alone or in combination with chitosan and polylactic-co-glycolic acid (PLGA), reduces the spread of tuberculosis (TB) by reducing the number of animals with lesions, the number of lesions per animal, and the size of lesions in vaccinated animals, compared to unvaccinated animals or those vaccinated with BCG alone. The vaccinated groups showed significantly higher levels of interferon- γ , indicative of vaccine efficacy, in blood compared to the control group after vaccination, after boosting, and after challenge with a field strain of *Mycobacterium bovis* ($p < 0.05$). BCG vaccination and culture filtrate boosting, alone or in combination with a biopolymer, were shown to increase the number of animals with lesions, the number of lesions per animal, and the size of lesions in vaccinated animals, compared with those not vaccinated or those vaccinated with BCG alone were significantly reduced ($p < 0.05$). Our results confirm that vaccination used as a complement to current tuberculosis control programs in animal populations can be useful to reduce the incidence, prevalence, and therefore

the spread of the disease within infected herds and to prevent the entry into free herds.

(Key words: *Mycobacterium bovis*, CFP, poly (lactic-co-glycolic acid) chitosan).

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres ♥Alán y Camelia♥:

Papá, gracias por tu apoyo. Ya sabes que habrá una gran celebración por este acto y que después de tantos años te vas a quitar un gran peso de encima (tanto estudio a tus espaldas...). A mi **mami**, a la que tengo millones de cosas que agradecer. Eres el ejemplo por seguir de cualquiera, por tu afán de superación, tu entera dedicación a la familia. Espero no perder nunca esa sonrisa tuya con la que siempre te tengo presente.

Que este pequeño paso los haga sentir muy orgullosos de la educación que me han dado. Nunca les podré pagar todo lo que han hecho por mi.

♥ **Mario Abarca Acero (MAAA)**: El tiempo pasará y yo te amaré cada día más, gracias amorcito por hacer de mi una mejor persona y animarme a seguir con todo (eres dulce miel), por apoyarme con ese examen de inglés 😊 para poder cumplir los requisitos de titulación. Eres un sol y confío en un futuro lleno de sorpresas contigo. ¡Gracias por tanto amor, te amo! ♥♥♥♥♥♥♥♥♥♥

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

Después de un largo y sinuoso recorrido de cuatro años llega el momento de finalizar esta etapa de mi vida (mi tesis doctoral) y no puedo acabarla sin tener unas palabras llenas de agradecimiento para todos aquellos que han estado a mi lado durante este recorrido:

En primer lugar, quiero agradecer la dedicación de mi comité de tesis: al **Dr. Feliciano Milián Suazo**, quien me ha dirigido de forma más directa mi trabajo de investigación, y que me ha guiado y enseñado desde cómo escribir un artículo, muy torpemente en los inicios, hasta mis primeros pasos en los congresos y reuniones internacionales. A mis asesores, **Dr. Germinal Jorge Cantó**, **Dra. Elba Rodríguez Hernández**, **Dra. Isabel Barcenás Reyes** y **Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila**, por su comprensión, nobleza y quienes con gran interés ha corregido este manuscrito final.

A la **M. en C. Susan Lucía Sosa Gallegos**, quien ha dedicado mucho de su valioso tiempo a mi enseñanza en el laboratorio, su ayuda en mis ensayos del predoctoral y tutoriales, gracias por toda su amabilidad, disposición y dotes de enseñanza. Gracias por tu comprensión Susy cuando ya no podía y sólo lloraba. Gracias por tu forma de ser, tan contagiosamente alegre ♥. Gracias por formar el mejor BTb team.

Agradezco a quienes me brindaron su apoyo con el trabajo de campo: la **Dra. Marina Durán** gracias por su ayuda, paciencia, amabilidad y comprensión; la **M.V.Z. Amayrani**, la **Dra. Sara González** y la **MSPAS. Luisa Fernanda**, muchas gracias por su ayuda.

A mi confidente ♥**Pau**♥ ese viaje a Buiatría no hubiera sido lo mismo sin ti 🙋, por tu ayuda con los muestreos de las cabras. Mil gracias por tu amistad amiga.

A mi compañera de batallas con las cabras, en la lucha de evitar la contaminación de los cultivos y por siempre intentar tomar la mejor foto en el laboratorio ♥**Karla**♥, gracias amiga.

A mi hermana ♥**Marlen**♥, por siempre brindarme apoyo en las desiciones que he tomado, ite amo mucho bebé!

Gracias a todos y cada uno de ustedes, ya que esto no habría sido posible sin su participación. ¡Gracias por todo!

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
CAPÍTULO I	1
I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	6
II. ANTECEDENTES	6
2.1 COMPLEJO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	6
2.2 DISTRIBUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	8
2.3. Reconocimiento internacional en tuberculosis bovina	9
2.4 IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	10
2.5 Importancia de la tuberculosis bovina en salud pública	11
2.6 PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i>	15
2.7 TRANSMISIÓN DE <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> ENTRE EL GANADO	16
2.8 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	17
2.9 LA VACUNA BCG	17
2.9.1 Vacuna a base de nanopartículas	21
3.0 ADYUVANTES	22
3.1 Quitosano y el Poli (ácido láctico-co-glicólico)	23
CAPÍTULO III	26
III. JUSTIFICACIÓN	26
CAPÍTULO IV	28
IV. OBJETIVO GENERAL	28
CAPÍTULO V	29
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO VI	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	30
6.2 BCG CEPA VACUNAL PHIPPS (ATCC® 35744™)	30
6.3 CRECIMIENTO DE <i>M. BOVIS</i> CEPA PHIPPS	31
6.4 RECUBRIMIENTO DE BCG CON QUITOSANO	32
6.5 OBTENCIÓN DE FILTRADO DE CULTIVO PROTEICO Y ENCAPSULAMIENTO FCP-PLGA	32
6.6 VACUNACIÓN, REFUERZO Y DESAFÍO	33
6.7 MUESTREO Y ESTIMULACIÓN SANGUÍNEA	34

6.8 MATANZA Y CLASIFICACIÓN DE LESIONES-----	35
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO-----	36
CAPÍTULO VII-----	38
VII. RESULTADOS-----	38
7.1 VIABILIDAD BACTERIANA DE BCG Y BCG + QUITOSANO-----	38
7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) DE BCG Y BCG + QUITOSANO -----	39
7.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL PLGA Y CFP CON ESFERAS DE PLGA -----	39
7.4 IFN- γ -----	41
7.5 LESIONES EN LOS ANIMALES-----	42
CAPÍTULO VIII-----	46
VIII. DISCUSIÓN-----	46
CAPÍTULO IX-----	49
IX. CONCLUSIÓN -----	49
CAPÍTULO X-----	50
X. LITERATURA CITADA -----	50
CAPÍTULO XI-----	80
PRIME VACCINATION WITH CHITOSAN-COATED PHIPPS BCG AND BOOSTING WITH CFP-PLGA AGAINST TUBERCULOSIS IN A GOAT MODEL. -----	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Grupos experimentales para determinar la eficacia de la vacuna BCG en diferentes protocolos de vacunación en un modelo caprino.....	34
Cuadro 2	Clasificación de los animales experimentales al sacrificio de acuerdo a las características de las lesiones.....	36
Cuadro 3	Tamaño de las esferas y eficacia de encapsulación del FCP.....	40
Cuadro 4	Número de animales de cada grupo experimental con lesiones visibles después de la vacunación contra la TB y desafiados con una cepa de campo en un modelo de cabra.....	42
Cuadro 5	Media, desviación estándar e intervalos de confianza del 95% para las puntuaciones de animales según las lesiones visibles postmortem en los grupos vacunados y de control expuestos a una cepa de campo en un modelo de cabra.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figur a 1	Filogenia actualizada del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Figur a 2	Árbol filogenético de micobacterias de crecimiento rápido y lento.....	7
Figur a 3	Estatus zoonosario del territorio nacional mexicano.....	8
Figur a 4	Estatus zoonosario de la tuberculosis bovina en el territorio nacional mexicano ante el USDA.....	9
Figur a 5	Vías de infección de tuberculosis bovina en sus distintos huespédes.....	1 6
Figur a 6	Características de los adyuvantes en vacunas.....	2 3
Figur a 7	Cronograma experimental.....	3 5
Figur a 8	Viabilidad bacteriana de BCG y BCG + quitosano en medio 7H9.....	3 8
Figur a 9	Imágenes SEM de la comparación de BCG con diferentes tratamientos de recubrimientos.....	3 9
Figur a 10	Imágenes SEM de la comparación de diferentes tratamientos de recubrimiento.....	4 0
Figur a 11	Respuesta de IFN- γ específica de antígeno en cabras después de la vacunación y desafío con una cepa de campo de <i>M. bovis</i>	4 1
Figur a 12	Ejemplos de puntajes de lesiones de animales experimentales vacunados contra TB con diferentes protocolos de vacuna y desafiados con una cepa de campo de <i>M. bovis</i>	4 4
Figur a 13	Relación entre la liberación de IFN- γ en sangre una semana antes del desafío y las puntuaciones de lesiones de animales experimentales vacunados contra la TB con una cepa de BCG y desafiados con una cepa de campo de <i>M. bovis</i>	4 5

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis en el ganado bovino (TBb) es un problema grave para la salud pública, así como económica en los países en desarrollo (Ameni *et al.*, 2003; López Marin *et al.*, 2006; Humblet *et al.*, 2009; Adhlakun *et al.*, 2019). Esta enfermedad es provocada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) que, a pesar de ser un patógeno primario para los bovinos, tiene un amplio rango de hospederos; incluyendo animales de interés económico (ovinos, caprinos, porcinos, equinos, aves), animales de compañía, silvestres y los seres humanos (Müller *et al.*, 2013; Buddle *et al.*, 2015; Ramdas *et al.*, 2015; Olea-Popelka *et al.*, 2016; Elnaggar *et al.*, 2017; Adhlakun *et al.*, 2019; Sichewo *et al.*, 2020a).

La enfermedad en los bovinos sigue siendo una importante barrera comercial para los productos relacionados con el ganado, lo que representa un problema económico importante para muchos países (Ameni *et al.*, 2003; López Marin *et al.*, 2006; Humblet *et al.*, 2009; Elnaggar *et al.*, 2017; Adhlakun *et al.*, 2019; OIE, 2019). Las pérdidas económicas en todo el mundo se estiman de \$3 a \$4 mil millones de dólares anuales, con más de 50 millones de bovinos infectados (Parlene & Buddle, 2015; Waters & Palmer, 2015; Palmer *et al.*, 2019).

La lucha contra la bTB se basa en la mayoría de los países en:

Método prueba y sacrificio o prueba y segregación: basado en la prueba de la tuberculina (IDTB) y el sacrificio de los animales reactores que garantizan la erradicación de la TBb en los animales domésticos. En algunos países se emplean programas de prueba y segregación durante la primera fase de la erradicación (debido a las limitaciones financieras o de recursos humanos en los programas de sanidad animal), y pasan a métodos de prueba y sacrificio en la fase final. De forma general, los grupos afectados se someten a pruebas de tuberculina periódicas para eliminar a los individuos que pudieran propagar el organismo y, asimismo, son sometidos a cuarentenas, rastreándose aquellos animales que

estuvieron en contacto con reactores. Medidas que no han servido de mucho para la erradicación de la enfermedad en el ganado lechero en el territorio mexicano.

El objetivo simple, pero brillante detrás de las vacunas es imitar la infección natural, pero limitando su toxicidad y reacciones adversas; proporcionando así protección en caso de un encuentro posterior con el agente infeccioso real; las vacunas protegen al activar el sistema inmune (Buonsanti & D'Oro, 2017). Incluso una vacuna que solo protege parcialmente a los animales en la medida en que son menos infecciosos para otros animales a lo largo de su vida, puede eventualmente reducir la prevalencia de la enfermedad en la población. Actualmente no hay vacunas disponibles contra TBb para los animales, ya que las vacunas existentes presentan una eficacia variable e interfieren en la realización de pruebas diagnósticas. No obstante, se están desarrollando y probando nuevas vacunas que permiten el diagnóstico diferencial (DIVA, por siglas en inglés), particularmente para reservorios silvestres (tejones y venados). En humanos, sí se practica la vacunación. La cepa *M. bovis* BCG se ha administrado a personas como vacuna contra la TB desde 1927 (Chambers *et al.*, 2014). La debilidad de la vacuna BCG y su eficacia protectora altamente variable en el control de la tuberculosis ha llevado al desarrollo de varias estrategias para generar nuevas vacunas. Una metodología emergente para abordar estos dos inconvenientes es la utilización de adyuvantes y nanopartículas (NP), que pueden lograr la liberación dirigida y controlada de los antígenos y mejorar la respuesta inmune (Smith *et al.*, 2015).

Las nuevas tecnologías aplicadas a la vacunación han permitido el desarrollo de vacunas que son más seguras que los microorganismos atenuados o muertos. Sin embargo, estas vacunas en la mayoría de los casos requieren el uso de moléculas inmunoestimuladoras conocidas como adyuvantes para provocar la respuesta inmune deseada (Buonsanti & D'Oro, 2017). Los adyuvantes son moléculas, compuestos, o complejos supramoleculares que aumentan la potencia y la longevidad de la respuesta inmune específica a los antígenos, pero causan toxicidad mínima o efectos inmunes de larga duración por sí mismos. Los adyuvantes pueden usarse para potenciar la inmunogenicidad, modular el tipo de

respuesta inmune, reducir la cantidad de antígeno o el número de inmunizaciones requeridas para mejorar la eficacia de las vacunas (Bonam *et al.*, 2017).

En el año de 1993, el gobierno mexicano estableció un programa de erradicación de la TB como resultado del interés particular de Estados Unidos, su principal socio comercial, que declaraba la reemergencia de la enfermedad en su territorio debida, entre otros factores, a la importación de animales infectados desde 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, control y 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” (López *et al.*, 2007). La campaña está 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 económicas, la erradicación de la TBb en México es una prioridad (López *et al.*, 2007).

México tiene un inventario de aproximadamente 30 millones de cabezas de ganado, de las cuales 3 millones son de ganado especializado en producción de leche (SIAP, 2020), población que actualmente está en riesgo y que también 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 en curso. En el ganado especializado en producción de leche el problema de la tuberculosis puede alcanzar el 20% de prevalencia o más (datos no oficiales, pero conocidos) a la prueba de tuberculina. Otros puntos importantes son:

1. La prevalencia de la tuberculosis en este tipo de ganado oficialmente es de alrededor del 16%, pero muy subestimada, la prevalencia en algunos hatos puede llegar hasta el 60% (González-Ruiz *et al.*, 2018).

2. La leche de estas vacas tuberculosas representa un riesgo para la salud humana por consumo de leche contaminada, del 10-15% de los nuevos casos de tuberculosis humana en los países en desarrollo (Bapat *et al.*, 2017), y de 0.5-7.2% en países desarrollados (Vayr *et al.*, 2018).
3. *M. bovis*, el causante de la TB en el ganado, en casos humanos es resistente a pirazinamida (fármaco de primera línea en el tratamiento), también se ha documentado la resistencia adicional a isoniazida y/o estreptomycinina, lo que puede llevar al desarrollo de cepas resistentes (Marianelli *et al.*, 2015; Djamal *et al.*, 2018).
4. La tuberculosis causa severas pérdidas económicas para los ganaderos del país, incluyendo el cierre de mercados internacionales de ganado y sus productos, rubro del mayor interés para la ganadería nacional (SAG, 2020).
5. La estrategia de prueba y sacrificio de la campaña no se aplica en este tipo de ganado por el alto costo de matar animales de alto valor genético, los productores de leche no la aceptan o simplemente no participan en la campaña.
6. Existe una fuerte demanda nacional por una estrategia que coadyuve a solucionar el problema, en específico una vacuna.
7. Trabajos previos experimentales han demostrado que la vacunación puede ayudar de manera considerable en reducir a niveles mínimos la prevalencia de la enfermedad.
8. Se tiene una estrategia básica de vacunación que puede ser mejorada para incrementar los niveles de eficacia.

La vacunación con BCG se ha probado experimentalmente. Se ha determinado que dosis bajas tienen una eficacia mayor que dosis altas (Buddle *et al.*, 1995a; Buddle *et al.*, 1995b). 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.*, 1995b; Johnson *et al.*, 2006; Lesellier *et al.*, 2006; Wedlock *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 semanas (Hope *et al.*, 2005). Y que el uso de refuerzos con subunidades de proteínas del filtrado de cultivo (FCP) mejora la protección (Wedlock *et al.*, 2000; Buddle, 2001; Skinner *et al.*, 2003; Wedlock *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007; Díaz-Otero *et al.*, 2008)

La vacunación con BCG y/o CFP no induce respuesta de IFN- γ a los antígenos de bajo peso molecular CFP10 y ESAT6, por lo que el diagnóstico diferencial es también factible (Vordermeier *et al.*, 2002; Maue *et al.*, 2007; Jackson-Sillah *et al.*, 2013; Abebe *et al.*, 2017). 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 (Canto *et al.*, 2013). Se demostró además que la vacuna tiene la misma eficacia en vaquillas gestantes, y que es totalmente inocua (Milian-Suazo *et al.*, 2011).

CAPÍTULO II

II. ANTECEDENTES

2.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) engloba a las especies que causan enfermedad en el humano; entre ellas se encuentran *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *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). Las características fundamentales compartidas por todos los miembros de este género son su forma bacilar, la dependencia de oxígeno, la inmovilidad, la imposibilidad para formar esporas y la ácido-alcohol resistencia (Kleeberg, 1984; Thoen & Barletta, 2006;). El MTC se caracteriza por un 99.9 % de similitud a nivel de nucleótidos (Huard *et al.*, 2006); otros miembros del complejo incluyen a *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* (Kleeberg, 1984; Thoen & Barletta, 2006), *M. mungi*, *M. orygis* (Figura 1).

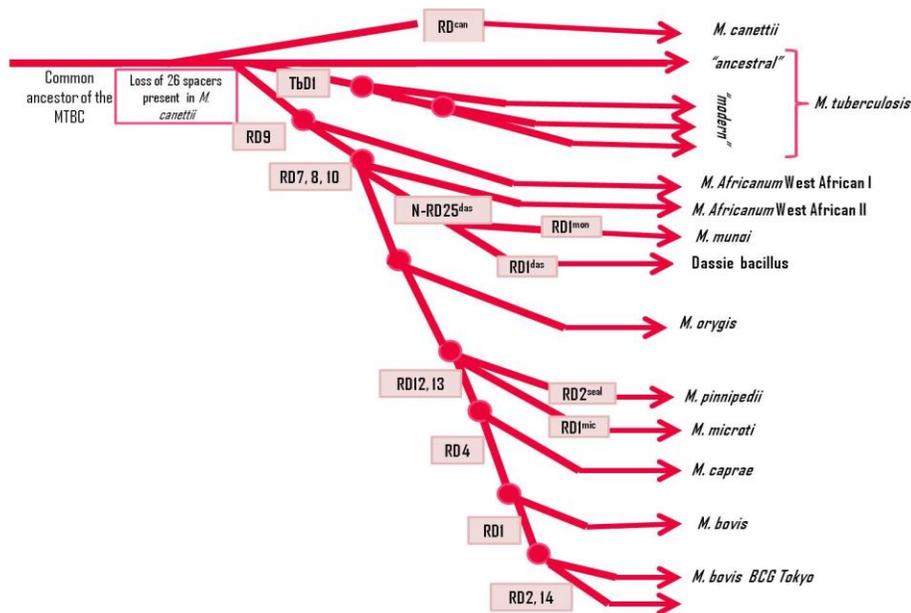


Figura 1. Filogenia actualizada del complejo *Mycobacterium tuberculosis* basada en la presencia de regiones de deleción o RD. Fuente: modificado de Rodríguez-Campos *et al.*, 2014.

Las micobacterias de crecimiento rápido, “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” o “micobacterias no tuberculosas” (Figura 2), producen colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días (Tortoli, 2009). Dentro de las micobacterias de crecimiento rápido se encuentran la mayoría de las especies saprofitas de vida libre (Tortoli, 2009; Castilho *et al.*, 2015). Aunque saprófitas, estas bacterias pueden causar enfermedad en presencia de factores predisponentes (Castilho *et al.*, 2015).

Las micobacterias de crecimiento lento tardan más de 7 semanas en producir colonias visibles en medio sólido, engloba las micobacterias de mayor importancia veterinaria y de salud pública (Figura 2, rama derecha), que incluye todas las especies causantes de la tuberculosis humana y otros mamíferos (Pollock & Neill, 2002; Thoen & Barletta, 2004; Biet *et al.*, 2005).

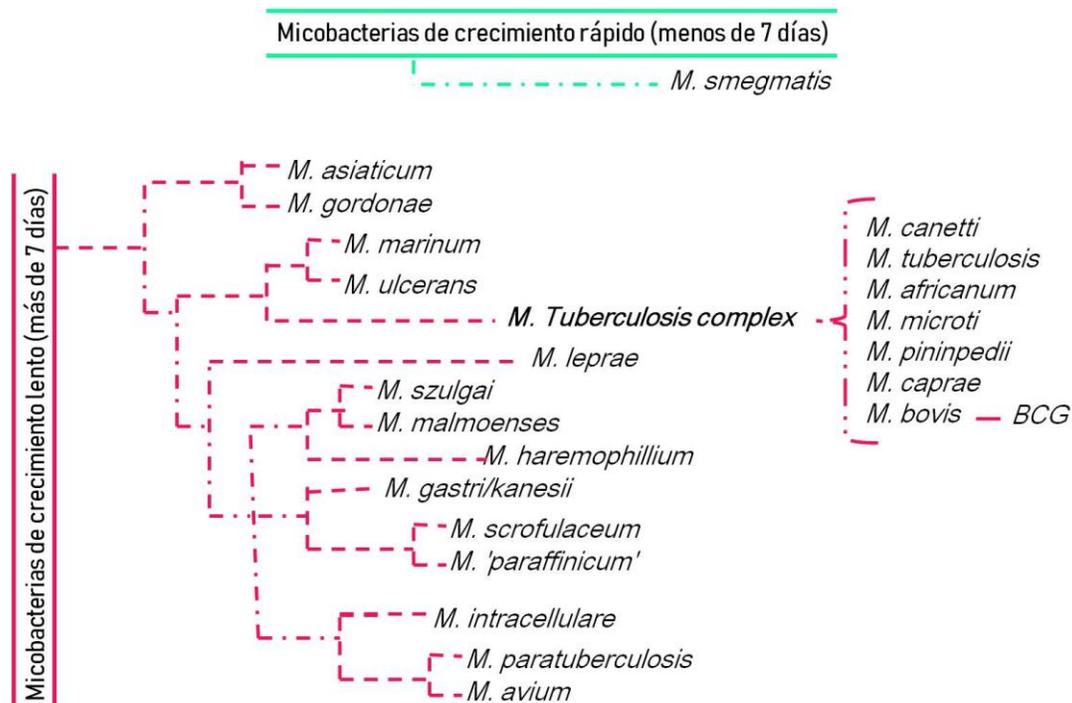


Figura 2. Árbol filogenético de micobacterias de crecimiento rápido y lento. Fuente: modificado de Biet *et al.*, 2005.

2.2 Distribución de la tuberculosis bovina

Entre enero de 2017 y junio de 2018, el 44 % de los países y territorios que notifican a la OIE reportaron haberse visto afectados por TBb; de los 82 países afectados, el 62.2 % notificaron TB sólo en el ganado, el 35.4 % en ganado y fauna silvestre, y solamente el 2.4 % en fauna silvestre. Sólo el 23 % de los países afectados estaban aplicando todas las medidas de control pertinentes: vigilancia activa, sacrificio sanitario total o parcial y el control de la movilización de los animales. La mejora de la vigilancia y la presentación de informes precisos por parte de los servicios veterinarios nacionales contribuyen a la prevención y el control de la tuberculosis (OIE, 2021). Lo que demuestra la extendida distribución de la enfermedad.

Actualmente las estrategias de la campaña de TBb se basan en reducir la prevalencia de la enfermedad, buscando minimizar el riesgo de que los animales expuestos o afectados se movilicen durante el comercio nacional e internacional. Al 31 de diciembre de 2021 se ha reconocido el 86.23% del territorio nacional mexicano con una prevalencia menor al 0.5% o en fase de erradicación de la enfermedad (Figura 3) (SENASICA, 2022a).



Figura 3. Estatus zoonosanitario de la tuberculosis bovina en el territorio nacional mexicano. Fuente: SENASICA, 2022a.

2.3. Reconocimiento internacional en tuberculosis bovina

La exportación de ganado bovino en pie a estados unidos de América es una de las actividades pecuarias más importantes del país, con un promedio superior a las 900 mil cabezas de gando al año. Entre el periodo del 2019-2020 la exportación promedio anual fue de un millón trescientos mil cabezas y de todas ellas solamente un animal dio positivo al análisis de TBb (SIAP, 2021). Por esto, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) les otorga una clasificación en el estatus zoosanitario a los estados de la Republica Mexicana, el cual les permite a los productores comercializar el ganado tanto dentro como a los Estados Unidos de América (Figura 4) (SENASICA, 2022b).

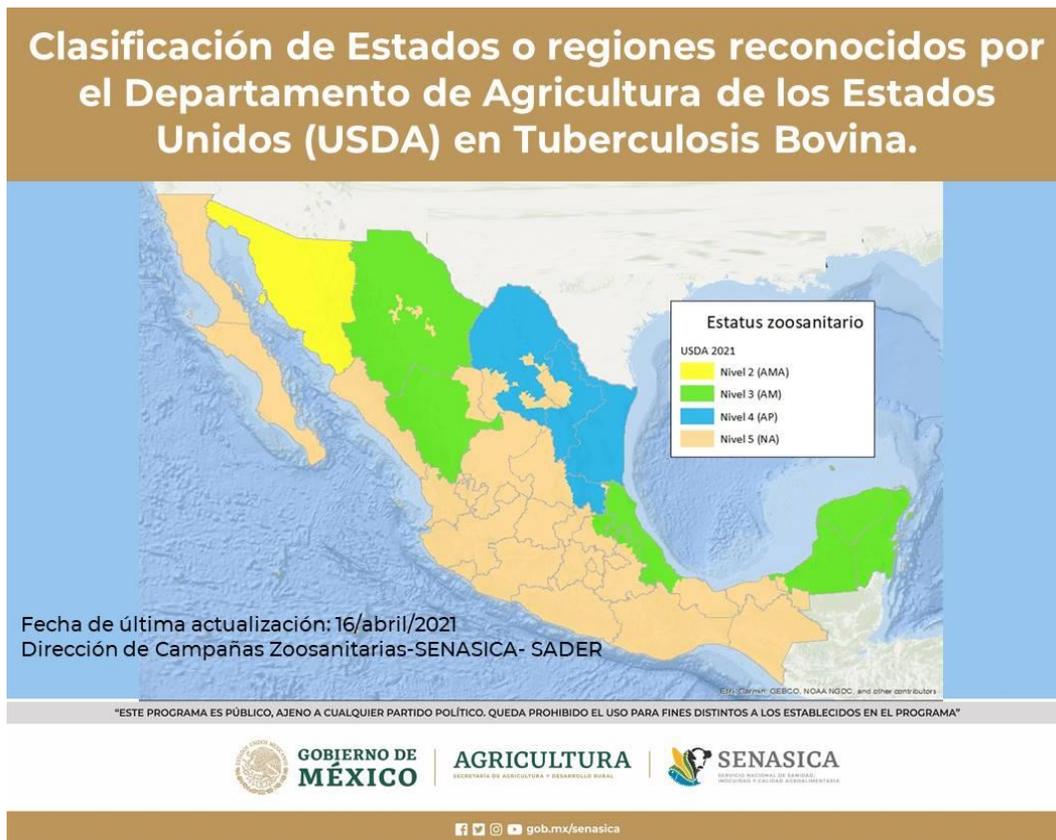


Figura 4. Estatus zoosanitario de la tuberculosis bovina en el territorio nacional mexicano ante el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Fuente: SENASICA, 2022b.

2.4 Importancia de la tuberculosis bovina

A pesar de muchos años de esfuerzos invertidos en la erradicación de la TB, la enfermedad se distribuye de manera heterogénea en todo el mundo y sigue siendo un problema grave para la salud humana y animal, especialmente en países en desarrollo. En las regiones donde el control de enfermedades en el ganado y la pasteurización rutinaria de la leche de vaca tienen éxito, los casos humanos de TB zoonótica (causada principalmente por *M. bovis* y *M. caprae*) son relativamente raros, lo que demuestra la eficacia de los programas de erradicación cuando estos son bien aplicados (Bolaños *et al.*, 2017; Davidson *et al.*, 2017; Vayr *et al.*, 2018; Mohamed, 2020). Sin embargo, cuando la TBb se establece en la población animal, la eliminación completa de la enfermedad es difícil debido a su complejidad epidemiológica y a los diferentes factores que intervienen en su persistencia. Dichos factores incluyen el largo período de incubación, fallas en la detección de animales infectados debido a limitaciones de diagnóstico, la presencia de reservorios que la mantienen en el medio ambiente, ciertas prácticas de manejo de rebaños y movimientos de animales entre granjas y regiones (Pollock & Neill, 2002; de la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Aranaz *et al.*, 2006; Broughan *et al.*, 2016).

La TBb provoca grandes pérdidas económicas debido a la disminución en los indicadores productivos y reproductivos, los costos de diagnóstico, al sacrificio sanitario aplicado para su control, el desecho involuntario y las restricciones comerciales que se aplican al ganado procedentes de países afectados (Ameni *et al.*, 2003; López Marin *et al.*, 2006; Humblet *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2013; Bezos *et al.*, 2014; Hawn *et al.*, 2014; Adhlakun *et al.*, 2019).

En términos de producción, las pérdidas económicas por TBb se deben a bajas en la eficiencia productiva, del 10 al 25%, disminución de la producción de leche, del 10 al 18%, reducción del 15% en la producción de carne, incrementos en las tasas de decomiso de órganos comestibles y un aumento de la mortalidad (Islam *et al.*, 2021).

2.5 Importancia de la tuberculosis bovina en salud pública

La historia del control y la erradicación de la tuberculosis por *M. bovis* es larga, accidentada y hasta en ocasiones dramática. En Gran Bretaña, la tuberculosis fue responsable de más de 800.000 muertes humanas entre 1850 y 1950, cuando el programa de erradicación se volvió obligatorio en el Reino Unido (Waddington, 2002). A principios del siglo XX, la tuberculosis todavía se consideraba una plaga, un concepto que, entonces como hoy, evocaba miedo y misterio por algo peligroso y desconocido (Fisher, 1998).

La falta o insuficiencia de la aplicación de la “prueba-y-sacrificio” en los esquemas de control de la enfermedad, el consumo de leche sin pasteurizar, la mala comprensión de la tuberculosis zoonótica y las malas condiciones sanitarias son algunos de los posibles factores de riesgo para *M. bovis* y enfermedades en humanos (Sichewo *et al.*, 2020b). De los 10 millones de personas que actualmente tienen TB activa, se estima que 140,000 son casos nuevos de TB zoonótica, y de estos aproximadamente 11,400 murieron (WHO, 2020). Sin embargo, en humanos la TB por *M. bovis* no siempre se notifica, por lo que el papel de *M. bovis* en tuberculosis humana puede estar subestimado. Esto indica importantes desafíos de diagnóstico y estructuras deficientes de vigilancia y notificación de salud pública en países endémicos. Las cifras más altas se registraron 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 humana (WHO, 2020).

Los seres humanos adquieren la infección por *M. bovis* principalmente a través del consumo de leche no pasteurizada y productos lácteos contaminados con *M. bovis* o por contacto cercano con ganado infectado. La transmisión puede ocurrir por la inhalación de gotitas infecciosas exhaladas por humanos o animales o por contacto directo con animales infectados a través de la presencia de una herida (de la Rúa-Domenech, 2006; Thoen *et al.*, 2010).

Las poblaciones que corren mayor riesgo de contraer tuberculosis por *M. bovis* son los ganaderos y trabajadores de cría de animales (Cleaveland *et al.*, 2007; Oloya *et*

al., 2008; Tigre *et al.*, 2011; Adesokan *et al.*, 2012; Gumi *et al.*, 2012; Torres-Gonzalez *et al.*, 2013; Lombardi *et al.*, 2017; Nuru *et al.*, 2017; Kemal *et al.*, 2019), trabajadores de mataderos (Khattak *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2018; Al-Thwani & Al-Mashhadani, 2016; Chan & Mpe, 2015; Mertoğlu *et al.*, 2018; Sunder *et al.*, 2009), personas seropositivas a VIH (Vallerga *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2012; Gallivan *et al.*, 2015; Pérez-Barragán & Manjarrez-Tellez, 2017; Sichewo *et al.*, 2020a), personas diabéticas (Rivas *et al.*, 2012; Gallivan *et al.*, 2015), personal veterinario (Shrikrishna *et al.*, 2009; Wilkins *et al.*, 2009; Twomey *et al.*, 2010; Lombardi *et al.*, 2017), carniceros, cazadores y trabajadores de animales silvestres (Vayr *et al.*, 2018). Además, las poblaciones que practican el consumo de leche cruda y productos lácteos no pasteurizados (Besser *et al.*, 2001; Majoor *et al.*, 2011; Bolaños *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). Se ha demostrado que *Mycobacterium sp.* puede permanecer viable hasta por 14 días en queso y yogurth, y hasta 100 días en mantequilla elaborada con leche cruda (Bolaños *et al.*, 2017). *M. bovis* es responsable del 10-15% de los nuevos casos de tuberculosis humana en los países en desarrollo (Bapat *et al.*, 2017), y de 0.5-7.2% en países desarrollados (Vayr *et al.*, 2018).

Dados los diagnósticos limitados en el punto de atención y los informes deficientes, no hay datos confiables para determinar si la incidencia y la prevalencia de TB zoonótica está aumentando o disminuyendo (Duffy *et al.*, 2020). Entre otros factores que limitan la certeza de la participación de *M. bovis* en caso de TB en humanos se puede mencionar:

- Diagnóstico erróneo: *M. bovis* suele ser una enfermedad extrapulmonar sin las características clínicas más comúnmente asociadas con la tuberculosis por *M. tuberculosis*, que se manifiesta principalmente en los pulmones.
- Muestras inadecuadas: las muestras enviadas para examen histológico normalmente se transportan en formalina, lo que imposibilita cualquier intento de cultivo. El examen histológico con microscopía no discrimina entre las dos especies.

- Medios de cultivo inadecuados: los laboratorios que reciben muestras para cultivo de micobacterias tienden a favorecer los medios que contienen glicerol, que mejora el crecimiento de *M. tuberculosis*, pero no el de *M. bovis*. *M. bovis* no solo no puede usar glicerol como única fuente de carbono, sino que la falta de un piruvato quinasa (PK) funcional significa que los carbohidratos no pueden usarse para generar energía. La validez de los sistemas de cultivo líquido automatizados para el aislamiento de *M. bovis* aún no se ha demostrado.
- No tipificar el aislado. Aunque las dos especies difieren en los requisitos de cultivo y la sensibilidad a los antibióticos, su determinación es difícil y requiere mucho tiempo. En lo que respecta al uso de métodos moleculares, los genomas de las dos especies son en gran parte homólogos y muchos kits de pruebas moleculares patentados que utilizan los laboratorios clínicos no pueden distinguir entre ellos.

Si la infección humana se adquiere mediante la ingestión de *M. bovis*, la pared de células grasas del organismo lo protege contra los procesos adversos del tracto gastrointestinal. La región ileocólica (unión de los intestinos delgado y grueso) suele ser el principal sitio de infección desde el cual migra a las glándulas mucosas y establece un proceso inflamatorio (Bolaños *et al.*, 2017). Las bacterias son transportadas a las placas de Peyer (parte del sistema linfático) por los fagocitos, lo que da como resultado la formación de tubérculos característicos de la tuberculosis, que luego pueden necrosarse y liberar organismos que causan nuevos focos de infección (Vanderpool & O'Leary, 1988). El tratamiento requerido es prolongado e implica un cóctel de antibióticos porque la cepa responsable puede tener una resistencia a los antibióticos que no será aparente durante algún tiempo debido al lento crecimiento del organismo. Dado que la mayoría de las cepas de *M. bovis* son resistentes a la pirazinamida, no se aconseja el uso de este fármaco antituberculoso de primera línea si se sospecha tuberculosis zoonótica (de la Rúa-Domenech, 2006).

Como lo describen Ray *et al.* (2013) y Jilani *et al.* (2020), la infección por *M. bovis* puede dar lugar a una serie de resultados clínico-patológicos en el humano:

- En una pequeña proporción de personas que no pueden montar una respuesta inmunitaria eficaz, la enfermedad progresa rápidamente y provoca la muerte. Esta forma se llama tuberculosis "miliar" o "generalizada".
- En una pequeña proporción de personas, la enfermedad permanece localizada y es autolimitada, lo que resulta en una resolución de la enfermedad clínica.
- En la mayoría de los infectados, la respuesta inmune del huésped controla eficazmente la proliferación antes de que aparezcan los signos clínicos. Sin embargo, es posible que el organismo no se erradique por completo de los tejidos y que permanezca viable allí durante muchos años, por lo que el hospedero sigue siendo portador. Esta condición se denomina infección "latente".
- En una minoría (5-10%), la defensa inmunitaria del hospedero tiene éxito inicialmente, pero luego falla después de un período de meses o años, lo que resulta en emaciación y deterioro general de la salud durante un período prolongado. Esto se denomina tuberculosis "secundaria". La existencia de esta afección debe tenerse en cuenta al considerar el impacto de una mayor exposición del público a *M. bovis*, ya que es probable que los resultados clínicos se manifiesten solo después de un período prolongado de tiempo.

Los estrictos controles de higiene en el manejo del ganado y la pasteurización de la leche han reducido indiscutiblemente la transmisión de la tuberculosis zoonótica en los países desarrollados (Bolaños *et al.*, 2017; Davidson *et al.*, 2017; Vayr *et al.*, 2018; Mohamed, 2020). Debido a estas acciones preventivas, el impacto de los programas de control y erradicación en el comercio es significativo, mientras que el impacto en la salud pública aún es incierto (de la Rúa-Domenech, 2006; Etter *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2013; Pérez-Lago *et al.*, 2014). Sin embargo, la amenaza de infección por *M. bovis* aún persiste, al menos en países en desarrollo y en grupos

ocupacionales específicos que trabajan en estrecha colaboración con animales domésticos y de vida silvestre (Palmer *et al.*, 2012; Vayr *et al.*, 2018).

2.6 Patogenia de la infección por *Mycobacterium bovis*

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 o corrales. Una vez inhalado, *M. bovis* es fagocitado por macrófagos alveolares, en los que este patógeno intracelular facultativo comienza a multiplicarse. 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 animal continúa generando una respuesta inmune mediada por células contra *M. bovis*, 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. Estas lesiones también se denominan tubérculos, indicativos de tuberculosis (Viena-Niero *et al.*, 2006). Los granulomas tuberculosos 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 *et al.*, 2006; Viena-Niero *et al.*, 2006). El tiempo desde el inicio de la infección hasta la patología extensa y los signos clínicos de la tuberculosis suele ser de varios años.

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).

2.7 Transmisión de *Mycobacterium bovis* entre el ganado

La excreción respiratoria y la inhalación de *M. bovis* es considerada como la ruta principal por la cual se produce la transmisión de bovino a bovino (Menzies & Neil, 2000; Smith *et al.*, 2004; Sichewo *et al.*, 2020b), también se ha reportado la transmisión gastrointestinal entre el ganado (Xu *et al.*, 2021), aunque esta es una forma mucho menos común de tuberculosis bovina que la forma respiratoria de la enfermedad (Neil *et al.*, 2001), Figura 5.

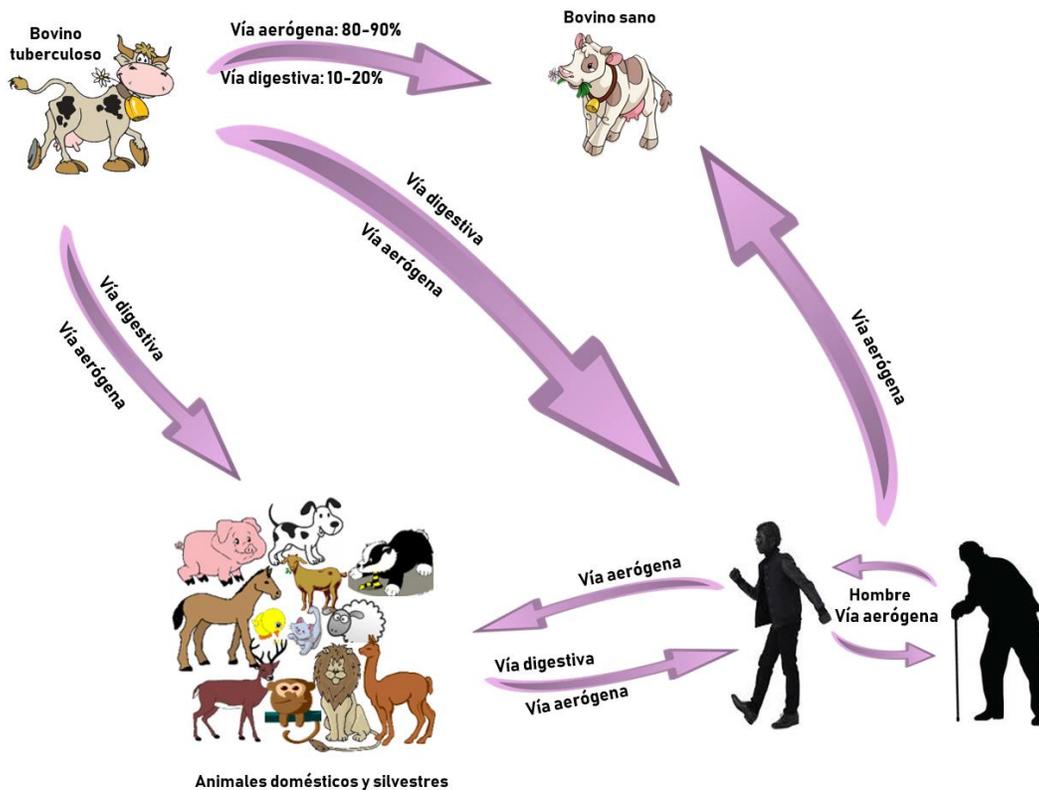


Figura 5. Vías de infección de tuberculosis bovina en sus distintos huéspedes.

Entre los factores de riesgo de TBb en los hatos se encuentran el tamaño del rebaño, las malas prácticas sanitarias y de cría, la introducción de animales de origen desconocido, el contacto cercano con otros animales, pastoreo y abrevadero comunal (Humblet *et al.*, 2009; Skuce *et al.*, 2012; Dejene *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2021); la contaminación ambiental (Courtenay *et al.*, 2006; Humblet *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015; Barbier *et al.*, 2017;), la virulencia de la cepa de *M. bovis* (Collins, 2001; Forrelland *et al.*, 2013; Echeverria-Valencia *et al.*, 2017; Ly & Liu, 2020), la dosis infectiva (Neill *et al.*, 1988; Dean *et al.*, 2005; McCorry *et al.*, 2005),

la susceptibilidad del huésped como: edad, sexo, estado fisiológico y condición corporal (Humblet *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015; Dejene *et al.*, 2016), resistencia a la enfermedad por la genética del huésped (González-Ruiz *et al.*, 2019)

2.8 Control y erradicación de la tuberculosis bovina

Los programas de control y erradicación se han llevado a cabo en muchos países durante décadas con resultados mixtos. Estos programas se basan en actividades de campo realizadas por veterinarios oficiales o médicos veterinarios (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 para contener la propagación de la enfermedad (Bezoz *et al.*, 2014; Crozet *et al.*, 2019; Arnot & Michel, 2020). En los países desarrollados, los programas de erradicación han reducido o eliminado la tuberculosis en el ganado, y la enfermedad en humanos es rara; sin embargo, los reservorios en la vida silvestre han dificultado la erradicación completa (Mohamed, 2020).

2.9 La vacuna BCG

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*, pero 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 podría reducir la prevalencia, la incidencia y la propagación de la enfermedad en la población, reduciendo el número, la duración y la gravedad de las lesiones. La capacidad de proporcionar estos beneficios dependería de la efectividad de un programa de

vacunación en términos de la vacuna utilizada, la forma en que se implementa y la realización de una prueba de diagnóstico compatible. En 1911 se demostró por primera vez que la BCG podía ser 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. Sin embargo, a pesar del trabajo desarrollado para encontrar vacunas más eficaces y seguras, se llegó a la conclusión de que la BCG sigue siendo la mejor candidata de vacuna para su uso en el campo a corto y mediano plazo (Waters *et al.*, 2012; Buddle *et al.*, 2013; Cantó *et al.*, 2013; Parlane & Buddle, 2015; Vordermeier *et al.*, 2016; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018).

Los estudios en ganado han demostrado que la vacunación reduce la transmisión de la tuberculosis al disminuir el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal, el tamaño de las lesiones y las cargas tisulares bacilares (Alarcon *et al.*, 2013; Vordermeier *et al.*, 2016; Nugent *et al.*, 2018). Se ha informado que la protección es mejor cuando los terneros se vacunan temprano después del nacimiento en comparación con las dos a cuatro semanas de edad con 10^5 - 10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), con una posible revacunación entre uno y dos años para mantener los niveles adecuados de inmunidad. No se han observado diferencias en la eficacia entre las cepas danesa y Pasteur, las vacunas más utilizadas en el mundo. La vacuna es segura, pero si bien no exacerba la infección, tampoco la cura (Buddle, 1995; Buddle *et al.*, 1999; Ameni & Tibbo, 2002; Hope *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Wedlock *et al.*, 2007; Alarcon *et al.*, 2013) y la vacunación de vacas preñadas no representa riesgo de aborto (Milián-Suazo *et al.*, 2011). El refuerzo con proteína de filtrado de cultivo (CFP) aumenta la respuesta inmune y la protección contra el daño patológico (Milián-Suazo *et al.*, 2011; Alarcon *et al.*, 2013; Buddle *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la vacunación primaria con BCG con un refuerzo de CFP se está considerando actualmente en muchos países como un complemento a los programas de control existentes para reducir la incidencia de la TBb (Buddle, 2010). Encontrar los medios para aumentar la eficacia de la vacuna mediante la mejora y

el mantenimiento de la respuesta inmunitaria protectora durante períodos más largos (Speth *et al.*, 2016) ha sido un objetivo de muchos protocolos de investigación. La idea es aumentar la interacción del antígeno con las células inmunitarias, por ejemplo, encapsulando y liberando antígenos para modular la respuesta inmunitaria del huésped (Cappellano *et al.*, 2019). Existe evidencia suficiente de que la combinación de adyuvantes con BCG mejora la inmunogenicidad de BCG y la protección contra la TB. Diferentes elementos como la rapamicina, la lactoferrina y los agonistas de Toll-Like Receptor (TLR) 7 y 9 aumentan la respuesta inmune a BCG, activando las células T CD4+ y CD8+ para aumentar la protección en ratones (Hwang & Actor, 2009; Bakhru *et al.*, 2014). Algunos informes han demostrado que el BCG con nanorrecubrimiento con ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C) y quitosano aumenta la inmunidad mediada por células sin efecto en la viabilidad de la vacuna *in vitro* (Speth *et al.*, 2016). Los polímeros tienen baja toxicidad, son fáciles de obtener y son altamente biodegradables. También son buenos agentes antibacterianos, con un efecto positivo en el tratamiento de la TB (Garg *et al.*, 2014; Costa-Gouveia *et al.*, 2017). Los polímeros biodegradables como el quitosano y el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) se han utilizado como adyuvantes de vacunas para estimular el sistema inmunitario y como vehículos para la administración de vacunas (Mohan *et al.*, 2013).

El quitosano es un polisacárido catiónico que comprende copolímeros de glucosamina y N-acetilglucosamina obtenidos a partir de exoesqueletos de crustáceos, levaduras y hongos (Illum *et al.*, 2001). Es insoluble en pH alcalino y neutro, pero forma sales con ácidos inorgánicos y orgánicos y está disponible en una variedad de pesos moleculares. Las sales de quitosano se unen fuertemente a los materiales cargados negativamente, como las superficies celulares y la mucosidad. Es bioadhesivo y aumenta significativamente la eliminación de la vida media de los antígenos (Soane *et al.*, 1999), donde los adyuvantes mejoran la captación de antígenos por los macrófagos (Zhu *et al.*, 2007) e inducen la producción de citocinas como la interleucina y el interferón. Existe evidencia de que las vacunas contra la TB con quitosano inducen fuertes respuestas inmunitarias

protectoras y mediadas por células CD4+ y CD8+ en modelos animales y, cuando se emplean como refuerzo, mejoran la protección contra la infección de TB en ratones (Zaharoff *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2013; Khademi *et al.*, 2018). Las soluciones de quitosano crean un depósito de antígeno, y más del 60 % de un antígeno proteico administrado en quitosano permanece en el lugar de la inyección durante siete días (Zaharoff *et al.*, 2007).

PLGA es un poliéster sintético que se degrada en ácidos láctico y glicólico. PLGA estimula las respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares (Smith *et al.*, 2015; Gutjahr *et al.*, 2016). El uso de antígenos y adyuvantes en una formulación de partículas de liberación lenta aumenta la eficacia de la vacuna al mejorar la disponibilidad de células presentadoras de antígeno (Ashhurst *et al.*, 2018). Es un potente inductor de TH1, que está asociado con la protección contra la infección de TB y las respuestas de TH17 (Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Kirby *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2017; Ashhurst *et al.*, 2018). Los antígenos cubiertos por PLGA escapan rápidamente de los endolisosomas y son transportados al citoplasma, impidiendo la degradación lisosomal de los fragmentos nulos, potenciando así la eficacia protectora de la vacuna (Khademi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018).

Los experimentos con vacunas en ganado han demostrado que las dosis bajas de BCG, $10^3 - 10^6$ CFU, inducen una mayor protección que las dosis más altas (Skinner *et al.*, 2001), que la exposición previa a *Mycobacterium* ambiental puede afectar negativamente la eficacia de la vacuna (Buddle *et al.*, 2002). Al igual que en el ganado, los ensayos han revelado que las cabras vacunadas con BCG u otras vacunas experimentales contra la TB tienen una liberación significativamente mayor de interferón-gamma, menos lesiones y menos cargas de cultivos bacterianos que las no vacunadas (Bezoz *et al.*, 2017; Vidal *et al.*, 2017; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018; Roy *et al.*, 2018). Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar diferentes formulaciones de vacunas BCG utilizando la vacuna primaria BCG, sola o recubierta con quitosano, y refuerzo con CFP, sola o combinada con quitosano y PLGA, en un modelo caprino.

2.9.1 Vacuna a base de nanopartículas

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 inmunomoduladores para influir en la respuesta inmune del hospedero (Capellano *et al.*, 2019). Las nanopartículas son capaces de dirigirse a las células presentadoras de antígenos (APC), tales como las células dendríticas y los macrófagos aumentando así 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 & McNeil, 2007; Capellano *et al.*, 2019). Otra 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 citocinas.

Al ser administradas las nanopartículas, existe un rango óptimo para que estas 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 mediante dos vías: 1) Las células presentadoras de antígenos las pueden tomar en el lugar de inyección a través de fagocitosis y luego migrar a los ganglios linfáticos. 2) las nanopartículas se transportan a través de los vasos linfáticos directamente a los ganglios linfáticos. Sin embargo, se plantea la hipótesis de que las nanopartículas más grandes queden atrapadas más eficientemente por los ganglios linfáticos (Luo *et al.*, 2017).

En una inflamación, las células del sistema inmunológico se activan. Las células reconocen los patógenos (o cualquier sustancia extraña invasora) y desencadena una respuesta inflamatoria, que implica la secreción de moléculas de señalización (citocinas) para atraer más células y destruir la sustancia extraña. Las células del sistema inmune reconocen a las nanopartículas por sus propiedades superficiales y montan una respuesta inflamatoria; sin embargo, muchos de los eventos son todavía poco conocidos (Dobrovolskaia & McNeil, 2007); ya que el enlace de la

interacción entre las nanopartículas y las células inmunitarias están determinadas por varios parámetros intrínsecos de la nanopartícula, como el tamaño, la composición, las propiedades de superficie, la densidad de carga y el potencial oxidativo (Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Khademi *et al.*, 2018; Capellano *et al.*, 2019).

3.0 Adyuvantes

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 (Figura 5) (Bonam *et al.*, 2017).

El término "efecto adyuvante" se refiere a la administración conjunta de un antígeno con un factor microbiano específico para potenciar una respuesta inmune específica del antígeno *in vivo*: es decir, respuestas específicas de antígeno (O'Hagan & Valiante, 2003). Los componentes microbianos de los adyuvantes activan las células presentadoras de antígeno profesionales (APC, por sus siglas en inglés) para producir citocinas 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:

- Translocación de antígenos a los ganglios linfáticos donde pueden ser reconocidos por las células T.
- Protección antigénica que permite una exposición más prolongada.
- Reacción local mejorada en el sitio de inyección.

- Inducción de la liberación de citoquinas inflamatorias.
- Interacción con receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés) expresados principalmente en células profesionales y no profesionales del sistema inmunológico innato, específicamente receptores Tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) estos receptores reconocen una variedad de antígenos. Los TLR reaccionan con patrones moleculares asociados a patógenos específicos y activan vías de señalización, lo que lleva a la secreción de citocinas proinflamatorias y la activación de moléculas coestimuladoras.

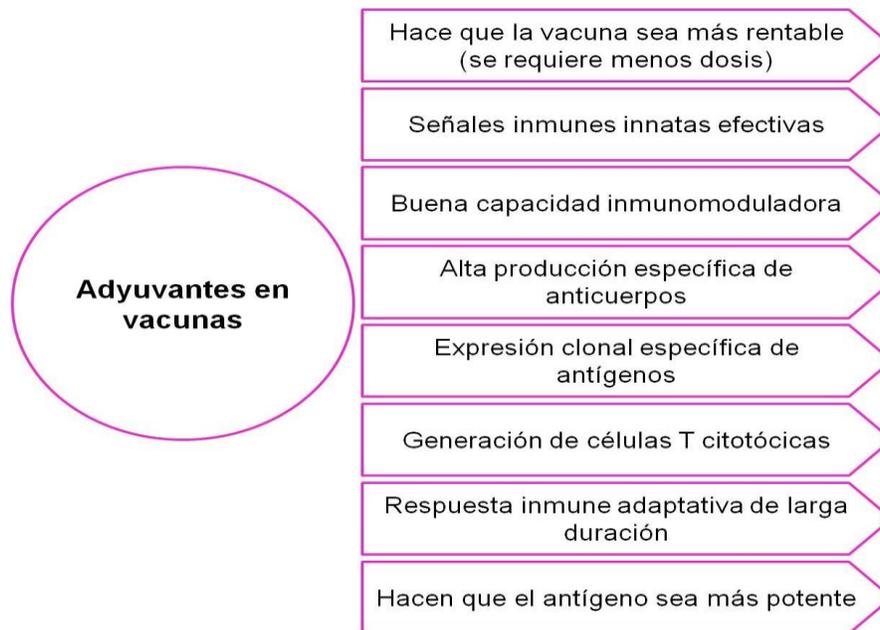


Figura 6. Características de los adyuvantes en vacunas. Fuente: modificado de Bonam *et al.*, 2017.

3.1 Quitosano y el Poli (ácido láctico-co-glicólico)

El quitosano:

También conocido como poli-D-glucosamina, es un polisacárido natural obtenido por la desacetilación de la quitina, el principal compuesto de exoesqueletos en crustáceos, que es biodegradable y biocompatible (Zhu *et al.*, 2007). Estas partículas; 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 algunos antígenos (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 partículas de quitosano han sido ampliamente estudiadas para la administración oral de genes, vacunas y proteínas (Lu *et al.*, 2009). Los efectos favorables del quitosano son:

1. Retiene al antígeno en el lugar de la inyección.
2. La inyección subcutánea de solución de quitosano lleva a una expansión celular del 67% en los ganglios linfáticos locales, aumentando macrófagos y células NK.
3. La capacidad del quitosano 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.

Zaharoff *et al.*, (2007) demostraron que el quitosano es capaz de exhibir dos características adyuvantes que son responsables de la mejora en la respuesta inmune. Primero, las inyecciones subcutáneas de solución de quitosano condujeron a una expansión de macrófagos y células NK del 67% en los ganglios linfáticos locales. La segunda característica que observaron fue la capacidad del quitosano para formar un depósito de antígeno. En su experimento el quitosano mantuvo un depósito de más del 60% de antígeno inyectado durante 1 semana y más del 10% de antígeno inyectado durante 11 días. Por lo cual, la retención de antígeno en 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 coestimulación para generar una respuesta inmune adaptativa.

Poli (ácido láctico-co-glicólico):

Mejor conocido como PLGA es un poliéster sintéticamente producido similar al PGA compuesto por monómeros de láctidos y glicólidos que se degradan en ácido láctico biocompatible y ácido glicólico. Las nanopartículas de PLGA están bien estudiadas y se ha demostrado que estimulan una respuesta inmune. Una aplicación novedosa de estas nanopartículas inmunogénicas es la vacunación intranasal de cerdos, donde aumentan la respuesta inmune tanto humoral como celular (Smith *et al.*, 2015). Se ha sugerido que la administración conjunta de antígenos y adyuvantes en una formulación en partículas de liberación lenta aumenta la inmunogenicidad y la eficacia protectora. PLGA como vehículo de vacuna es un potente inductor de respuestas de anticuerpos (Ashhurst *et al.*, 2018).

Uno de los atractivos asociados con el uso de nanopartículas de PLGA como sistema de administración de adyuvantes de vacunas se atribuye a que después de la inyección, las nanopartículas de PLGA pueden escapar rápidamente de los endolisosomas y transportar las cargas cargadas al citoplasma, evitando la degradación lisosomal en fragmentos nulos, y, por lo tanto, mejorando la eficacia de la administración de vacunas (Khademi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). PLGA muestra aumento significativo de respuestas de células T (Kirby *et al.*, 2008; Dobrovolskaia & McNeil, 2007; Luo *et al.*, 2017).

CAPÍTULO III

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, la severidad de las lesiones y la carga bacteriana de las lesiones (Buddle *et al.*, 2003b; Cai *et al.*, 2006; Ameni *et al.*, 2010; Milián-Suazo *et al.*, 2011; Cantó-Alarcón *et al.*, 2013; Nugent *et al.*, 2017; Ameni *et al.*, 2018; Nugent *et al.*, 2018). La capacidad de proporcionar estos beneficios dependería de la efectividad de un programa de vacunación en términos de la vacuna utilizada, la forma en que se implemente y la realización de una prueba de diagnóstico compatible que pueda diferenciar vacunados de infectados. Ha sido demostrado que la BCG es una vacuna eficaz contra la tuberculosis en el ganado, por primera vez en 1911 (Waters *et al.*, 2012). Se ha llevado a cabo un extenso trabajo desde entonces para optimizar la dosis y la vía de administración. A pesar del trabajo en curso para desarrollar vacunas más eficaces, BCG sigue siendo la mejor candidata vacunal para su uso en el campo a corto y mediano plazo (Waters *et al.*, 2012; Buddle *et al.*, 2013; Cantó *et al.*, 2013; Parlane & Buddle, 2015; Vordermeier *et al.*, 2016; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018).

La utilización de nanopartículas de quitosano y PLGA, pueden proporcionar nuevas oportunidades para mejorar la eficacia de la BCG para que esta sea utilizada de forma masiva para prevenir la diseminación de la tuberculosis bovina y, dado que la tuberculosis bovina sigue siendo un problema de salud animal importante, ser incorporada a las actuales estrategias de control como una medida complementaria para el control de la enfermedad en la vida silvestre y/o en el ganado doméstico.

Por lo tanto, es importante el desarrollo de formulaciones vacunales que sean seguras, efectivas y de bajo costo para reducir la incidencia de la tuberculosis en los animales. La vacunación es una demanda de los productores de leche en

México, que buscan reducir la carga de esta enfermedad sin padecer las actuales estrategias poco factibles de sacrificar animales.

CAPÍTULO IV

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la cepa vacunal BCG, sola o en combinación con quitosano y PLGA, en la prevención del desarrollo de lesiones tuberculosas en un modelo caprino.

CAPÍTULO V

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elaborar los complejos vacunales de BCG y FCP con quitosano y PLGA respectivamente, cubrir el bacilo vacunal y formar esferas de filtrado de cultivo proteico con quitosano y PLGA.
2. Determinar la respuesta inmune de animales vacunados y no vacunados a través de la concentración de IFN- γ en plasma sanguíneo.
3. Determinar la eficacia de la vacuna sola o en formulación, a través del número de animales con lesión, el número de lesiones por animal y el tamaño de las lesiones.

CAPÍTULO VI

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales experimentales

Se incluyeron en el estudio 35 cabras de raza Nubia, Alpina y cruza de estas, de entre 3 a 5 meses de edad, procedentes de un área libre de tuberculosis. Los animales se asignaron al azar a cinco grupos experimentales de siete animales cada uno. A continuación, los animales se colocaron en unidades experimentales especialmente diseñadas para este propósito, con suficiente espacio y sombra y comida y agua a libitum. Dos animales murieron 1 semana después de que comenzara el experimento debido a la diarrea causada por una coccidia. En ese momento, todos los animales fueron tratados con Baycox® (Bayer) a una dosis de 20 mg / kg. Un animal del grupo de control murió una semana antes del sacrificio; en una necropsia se observaron numerosas lesiones compatibles con TB en los pulmones. Todos los animales dieron negativo para paratuberculosis en un kit de diagnóstico ID screen® para las muestras de suero y plasma (LABGENE Scientific SA, Châtel-Saint-Denis, Suiza). Un cuidador de cabras experimentado supervisó el seguimiento y la alimentación de los animales diariamente. Veterinarios experimentados de nuestro grupo de trabajo realizaron el manejo, prueba de tuberculina y muestreo de los animales experimentales. Se confirmó que todos los animales eran negativos a TB mediante la prueba de tuberculina de pliegue caudal y mediante el ensayo de interferón-gama (IFN- γ) (Bovigam, Prionics AG, Zurich, Suiza).

6.2 BCG cepa vacunal Phipps (ATCC® 35744™)

La cepa Phipps (American Type Culture Collection (ATCC®) 35744™) se seleccionó en función de los resultados de un estudio anterior en el que fue la más eficaz para brindar protección contra el daño patológico después de un desafío en ratones en el que se compararon 10 cepas de BCG (Castillo-Rodal et al., 2006). La cepa se adquirió de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.). La reactivación del BCG se realizó de la siguiente manera: 300 mL de medio

de cultivo que contenía 1.41 g de medio base Middlebrook 7H9 (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y 1.32 g de piruvato de sodio (Golden Bell, cristales 110.05) en 270 mL de agua destilada con 0.6 mL de glicerol. Este se autoclavó a 121 °C durante 10 min. Después de la esterilización, se podía enfriar a 50–55 °C y luego se añadían 30 ml de ADC (BD BBL Enrichment for Middlebrook) en una campana de flujo laminar. Este medio se incubó a 37 °C durante 48 h para verificar la esterilidad. Después de eso, el sedimento bacteriano original que contenía *M. bovis* se añadió la cepa BCG Phipps y se incubó a 37 °C durante 6 semanas. Posteriormente, este se pasó a un medio Stonebrink y Lowenstein Jensen y se incubó a 37 °C hasta que se produjo el crecimiento a las 6 semanas.

6.3 Crecimiento de *M. bovis* cepa Phipps

La cepa vacunal se cultivó en cultivo enriquecido caldo Middlebrook medio 7H9 + ADC + 20% Tween 80. Se preparó un total de 1000 mL de medio de cultivo con 4.7 g de medio base Middlebrook 7H9 (Difco™) y 900 mL de agua destilada con mL de Tween 80 al 20 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Luego se colocó en un matraz y se autoclavó a 121 °C durante 10 min. Una vez esterilizada, se dejó enfriar a 50-55 °C y luego se añadieron 100 mL de ADC con un filtro de jeringa Nalgene de 0.2 µm en una campana de flujo laminar. El medio se incubó a 37 °C durante 48 h para verificar la esterilidad. Luego, se tomaron varias colonias de *M. bovis* de los medios de cultivo de reactivación Stonebrink y Lowenstein-Jensen, se pasaron a estos medios y se incubaron a 37 °C durante 4 semanas. Luego, se prepararon 1000 mL de medio de cultivo para contener 4.7 g del medio basado en Middlebrook 7H9 (Difco™) en 900 mL de agua destilada con 2 mL de glicerol y se colocaron en cuatro matraces de 250 mL y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Una vez esterilizado, se podía enfriar a 50–55 °C y luego se añadían 100 ml de ADC esterilizado con un filtro de jeringa Nalgene de 0.2 µm en una campana de flujo laminar. Este medio se incubó a 37 °C durante 48 h para verificar la esterilidad. Aproximadamente a las 4 semanas, se observó el crecimiento de colonias. Luego, estos cultivos se centrifugaron (20 min × 1008 g) y se añade a una solución (SPGA) a una concentración de 1:1 con PBS estéril para la separación

bacteriana con una aguja de 23-G. Se realizaron recuentos bacterianos y preparaciones de dosis y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

6.4 Recubrimiento de BCG con quitosano

La suspensión de quitosana se preparó a una concentración de 0.001 %, donde se adicionaron 500 mg de quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 4.5 g de cloruro de sodio (NaCl) a 500 mL de agua con 5 mL de ácido acético a pH 6. Se utilizó un medio de cultivo BCG Middlebrook 7H9 para el recubrimiento con quitosano BCG. Primero se centrifugó (10 min × 1008 g); luego, el sedimento se lavó dos veces con NaCl al 0.9 % y se sonicó en un baño de agua durante 10 min para separar las bacterias agrupadas. La suspensión obtenida se pasó 10 veces a través de una aguja 23-G para romper los agregados bacterianos. Durante este paso, se añadió la solución de quitosano (0.5 mL/mL) y se mantuvo en un agitador orbital durante 20 min. La nueva solución se lavó dos veces con NaCl al 0.9 % y se pasó una vez más a través de una aguja de 23 G para separar las bacterias recubiertas. Esta suspensión bacteriana se añadió al medio de cultivo Middlebrook 7H9 + ADC + glicerol y se dejó en incubación durante 4 semanas. Para verificar que el quitosano es inocuo para los bacilos BCG in vitro, se realizó una prueba de viabilidad bacteriana cultivando BCG y quitosano BCG recubiertos en un medio Middlebrook 7H9 + ADC + glicerol. Al día 31, se obtuvieron muestras de 100 µl del medio de cultivo para microscopía electrónica de barrido. Las suspensiones recubiertas de quitosano BCG y BCG se aislaron en un medio sólido Stonebrink mediante diluciones seriadas que oscilaban entre 10^1 – 10^8 para obtener las UFC/mL. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 4 semanas con controles cada semana para verificar el crecimiento del cultivo.

6.5 Obtención de filtrado de cultivo proteico y encapsulamiento FCP-PLGA

La cepa de campo obtenida de una lesión de ganglio linfático de vaca se cultivó en medio sólido Stonebrink. Después de 8 semanas, las colonias se recolectaron y se colocaron en la pared de un matraz de un medio Middlebrook 7H9 + ADC + glicerol. Este cultivo se centrifugó durante 10 min a 1008 g. El sobrenadante pasó

tres veces a través de un filtro de jeringa Nalgene de 0.2 μm y luego se transfirió a través de un filtro de peso molecular (Millipore 4307 Centriprep YM-30, 30-kDa NMWL) para obtener un volumen final de 60 mL. La cuantificación de proteína se realizó con el reactivo de Biuret (reactivo MEYER TG1118618) para una concentración final de proteína CFP de 1250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La encapsulación de la CFP se realizó con 1 mL de CFP en 3.7 mL de una solución al 3 % de Poli(lactico-co-glicolico) (75:25; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y cloroformo, que luego se agitó en un vórtice durante 1 min para formar la primera emulsión. A esta emulsión se le añadió poli (alcohol vinílico) (PVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, UA; 87–89 % hidrolizado) al 10% en una proporción de 1:1 y se mantuvo bajo agitación magnética durante 24 h. Luego se agitó en un PowerLyzer (2800 G con dos ciclos de 0.45 s y un descanso de 0.30 s) y se centrifugó durante 10 min a 11200 g. Se eliminó el sobrenadante para cuantificar la proteína no encapsulada con un reactivo de Biuret. El sedimento se lavó tres veces con agua destilada durante 5 min a 11200 g. Finalmente, se suspendió en PBS estéril. Se tomó una muestra de 100 μL para barrido con microscopía electrónica. Las formulaciones de refuerzo de CFP se prepararon con 900 μL de CFP y 100 μL de adyuvante (Montanide™) y adyuvante a base de aceite compuesto por un aceite metabolizable natural y un emulsionante altamente refinado de la familia de los monooleatos de manide (Khabazzadeh Tehrani *et al.*, 2016).

6.6 Vacunación, refuerzo y desafío

Los animales se asignaron mediante un diseño experimental completamente al azar en cinco grupos experimentales (cuadro 1). Los grupos vacunados se inocularon por vía subcutánea en el lado derecho del cuello con una dosis de 1×10^3 CFU y el BCG recubierto con quitosano a 1×10^2 células en un diluyente de 2 ml en la semana uno. Los grupos reforzados se inocularon por vía subcutánea 4 semanas después de la vacunación primaria con BCG con 720 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de CFP inoculados con los diferentes protocolos de refuerzo. Se determinó que la dosis de la vacuna era inferior a las reportadas en estudios previos en cabras para prevenir muertes prematuras (Bezoz *et al.*, 2017; Vidal *et al.*, 2017; Arrieta-Villegas *et al.*, 2018). El

adyuvante utilizado fue Montanide™ al 10% de la fórmula utilizada. El inóculo de desafío se preparó con una fase logarítmica media de *M. bovis* de tipo salvajecrecido en Stonebrink + medio de cultivo de piruvato. La cepa de desafío se recolectó de los ganglios linfáticos de una vaca en 2010 en México y se mantuvo en glicerol a -70 °C. Los bacilos se sedimentaron por centrifugación a 750 g y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0.01 M, pH 7.2). A continuación, se homogeneizó en PBS y se agitó con perlas de vidrio continuamente a 200 rpm durante 1 h. El homogeneizado se filtró en condiciones estériles dos veces a través de un filtro de jeringa de 40 µm y se diluyó a las dosis establecidas (1×10^6 CFU) en 0.5 mL de PBS. Los cabritos sedados con 0.25 mg/kg de xilaxina se expusieron mediante inoculación directa en la tráquea con una jeringa de 3 ml (23 G x 25 mm).

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

GRUPOS				
1	2	3	4	5
Control	BCG	BCG + FPC+Adu-vante	BCG+Quitosano + FPC+PLGA+Quitosano+ Adyuvante	BCG+Quitosano + CFP+Quitosano+ Adyuvante

6.7 Muestreo y estimulación sanguínea

Se recolectaron muestras de sangre para el ensayo de liberación de IFN-γ cada 2 a 3 semanas hasta el final del experimento (Figura 7). Se recogieron muestras de sangre (n=13) de la vena yugular y se colocaron en tubos con heparina. Luego, se incubaron 750 µL de la sangre total de cada animal en microplacas por duplicado con 50 mL de cada antígeno; es decir, derivado de proteína purificada bovina (PPD) y PPD aviar. Se utilizó PBS como control negativo para cada animal analizado y 50 ml de mitógeno de hierba carmín en una solución de concentración de 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Gillingham, Reino Unido) como control positivo. A continuación, las microplacas se incubaron en una solución humidificada con CO₂ al 5%, incubada a 37 °C durante 20 h. Se emplearon las densidades ópticas (DO) de PBS de los

pocillos de control para normalizar las lecturas individuales y calcular la DO. Las lecturas finales de OD se obtuvieron restando las lecturas de muestra de las lecturas de control de PBS. La liberación de IFN- γ en cultivos de sangre completa después de 16 h in vitro se realizó en un kit comercial de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de microplaca de IFN- γ bovino (ELISA; Bovigam®; Prionics AG, EE. UU.).



Figura 7. Cronograma experimental. Toma de muestras sanguíneas desde el inicio del experimento hasta la matanza de los animales, incluidas las fechas de vacunación, refuerzo y el desafío de las cabras.

6.8 Matanza y clasificación de lesiones

Aproximadamente 6 meses después del desafío, los animales experimentales se enviaron al matadero para la inspección de la canal y la puntuación de las lesiones y para la recolección de muestras de tejido para análisis histopatológicos y microbiológicos. Los animales fueron sacrificados por electro insensibilización siguiendo las Directrices de la NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Los criterios para la puntuación de los animales se presentan en el cuadro [2https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8068168/table/animals-11-01046-t002/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8068168/table/animals-11-01046-t002/). En lugar de contar o clasificar las lesiones individuales, la puntuación del animal completo se basó en la magnitud del daño tisular en los órganos afectados y las características de las lesiones. Para determinar la presencia y magnitud de las lesiones, se extrajeron y seccionaron cuidadosamente todos los órganos. Se extirparon los ganglios linfáticos completos; la mitad de estos se congeló para el

análisis bacteriológico y la mitad restante se colocó en una solución tampón de formalina al 10 % para el análisis histopatológico. Además, se recogieron unos cuatro centímetros cuadrados del lóbulo pulmonar craneal de todos los animales para análisis bacteriológicos e histopatológicos. Con el fin de realizar una inspección cuidadosa de las canales, los animales fueron sacrificados durante un período de 2 semanas, seleccionándose al azar un animal de cada grupo experimental al mismo tiempo. La inspección de la canal se centró en los ganglios linfáticos de la cabeza (retrofaríngeos), tórax (mediastínicos y traqueobronquiales), abdomen (mesentéricos), pulmones e hígado. En el momento del sacrificio, el número y el grupo de tratamiento de los animales fueron cegados al veterinario que puntuó las lesiones.

Cuadro 2. Grupos experimentales para determinar la eficacia de la vacuna BCG en diferentes protocolos de vacunación en un modelo caprino.

Puntuación	Descripción
0	Sin lesiones visibles
1-1.9	≤20 lesiones en pulmones o linfonodos
2-2.9	≤20 lesiones en pulmones y linfonodos
3-3.9	Entre 21 y 50 lesiones en pulmones o linfonodos
4-4.9	Entre 21 y 50 lesiones en pulmones 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 pulmones o linfonodos
≥ 8	Múltiples lesiones (≥101) diseminadas en pulmones y linfonodos

6.9 Análisis estadístico

La concentración promedio de IFN- γ (datos sin procesar de OD) por grupo experimental para cada período de muestreo se comparó con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Las puntuaciones medias de las lesiones por grupo se compararon con el estadístico H en la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0.05$. Se determinó una relación

entre el número de lesiones y las puntuaciones de las lesiones animales con el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico SPSS versión 22.

CAPÍTULO VII

VII. RESULTADOS

7.1 Viabilidad bacteriana de BCG y BCG + quitosano

Para verificar que el quitosano no causa la muerte de los bacilos de BCG *in vitro*, se realizó una prueba de viabilidad bacteriana. La figura 8 muestra los resultados de esta prueba, la cepa Phipps de BCG alcanzó su fase logarítmica de crecimiento intermedio en el segundo día de incubación, y su fase estacionaria a los tres días, que mantuvo hasta 16 días de incubación. Posteriormente, hubo un aumento en el crecimiento bacteriano en el día 20 al día 28, que disminuye el día 31. La cepa Phipps de BCG con quitosano alcanzó la fase logarítmica a los ocho días de incubación, y la fase estacionaria a los nueve días, que permanece estable hasta los 12 días, luego hay un aumento en el crecimiento bacteriano hasta el día 26 y luego disminuye. Este resultado muestra que el bacilo BCG sobrevive a pesar de estar cubierto con quitosano con nuestra preparación.

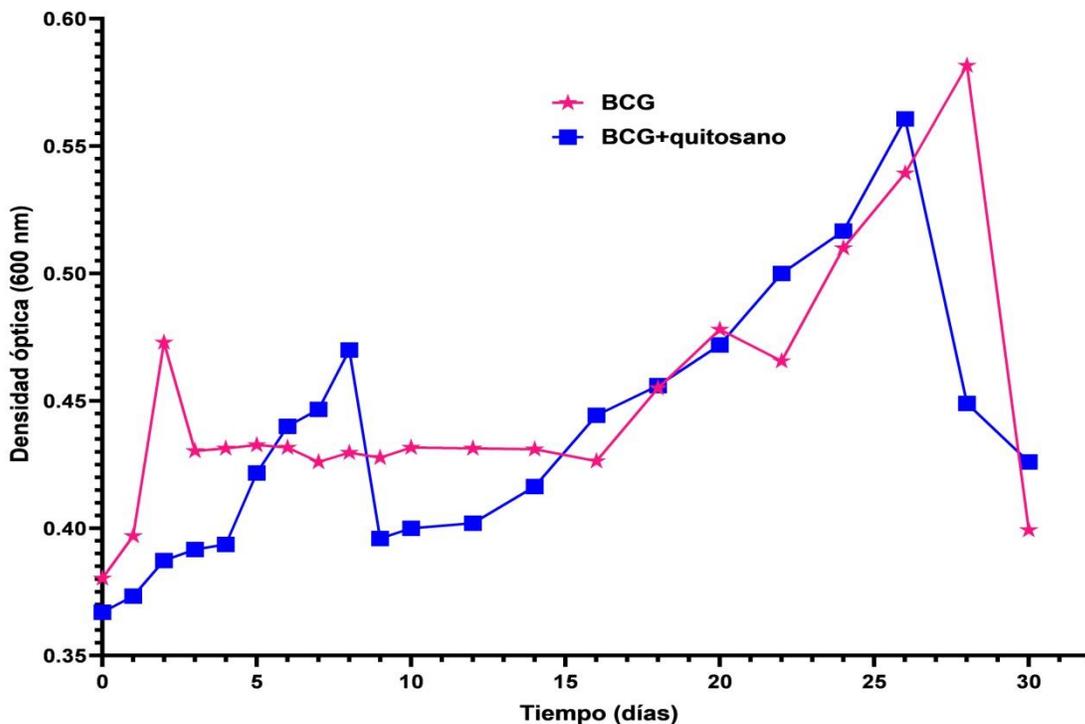


Figura 8. Viabilidad bacteriana de BCG y BCG + quitosano en medio 7H9.

7.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de BCG y BCG + Quitosano

Los cultivos de *M. bovis* se analizaron bajo el microscopio después del día 31 de crecimiento se compararon las bacterias por microscopia de barrido, en la Figura 9a se puede observar la morfología de los bacilos de BCG a 15 000 X, los cuales se observan diferentes morfológicamente a los bacilos que se encuentran recubiertos con quitosano, el quitosano hace que los bacilos se vuelvan más nítidos al ser pasados por el haz de luz (Figura 9b).

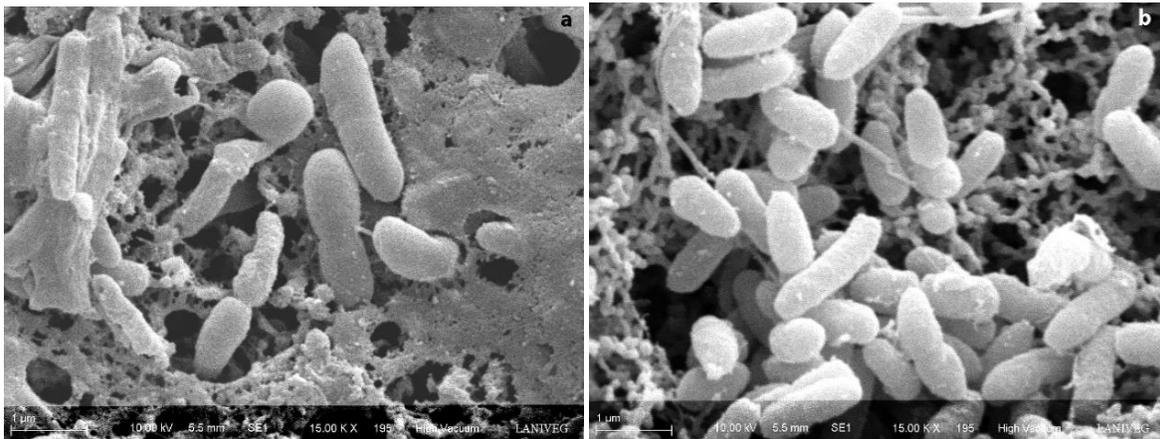


Figura 9. Imágenes SEM de la comparación de BCG sin recubrimiento y BCG recubierto con quitosano. En SPGA lavado con PBS en membrana de filtro de 0.22 μm observado a 15,000 X (a) BCG no recubierto, (b) BCG recubierto con quitosano.

7.3 Microscopía electrónica de barrido del PLGA y CFP con esferas de PLGA

Las esferas se produjeron mediante la técnica de evaporación de solventes de doble emulsión w/o/w descrita anteriormente. El tamaño de las esferas se analizó mediante SEM.

Se usó SEM para verificar que la formulación produjera partículas porosas con una morfología esférica. Se observaron en microscopio muestras de capsulas vacías de PLGA recubiertas con quitosano (Figura 10a), FCP encapsulado con PLGA (Figura 10b), FCP encapsulado con PLGA recubierto con quitosano (Figura 10c) y CFP encapsulada con PLGA (Figura 10d), con una eficiencia de encapsulación del 80%.

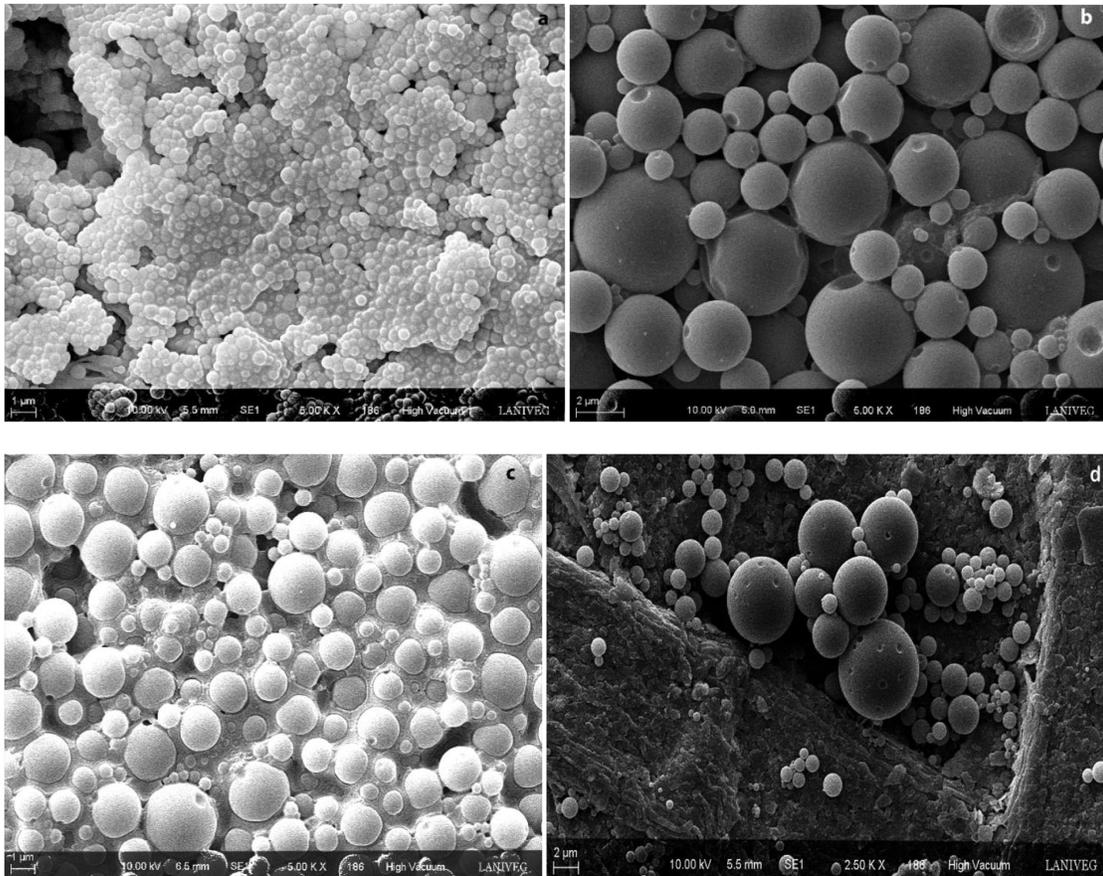


Figura 10. Imágenes SEM de la comparación de diferentes tratamientos de recubrimientos. (a) capsulas de PLGA recubiertas con quitosano. (b) FCP encapsulado con PLGA. (c) FCP encapsulado con PLGA recubierto con quitosano una magnitud de 5 000 X, (d) FCP encapsulado con PLGA a una magnitud de 2 500 X. Las barras de escales representan 1, 2, 1 y 2 μm respectivamente.

Cuadro 3. Tamaño de las esferas y eficacia de encapsulación del FCP.

Formulación	Diámetro promedio protocolo 1 (μm)	Diámetro promedio protocolo 2 (μm)	Tiempo promedio de degradación a 4 ° C protocolo 1 (días)	Tiempo promedio de degradación a 4 ° C protocolo 2 (días)	Encapsulación protocolo 1 (%)	Encapsulación protocolo 2 (%)
Esferas de PLGA vacías		20		2		
Esferas de PLGA con FCP	6	2	5	7	60	83.3
Esferas de PLGA con FCP cubiertas con quitosano		1		7		83.3
Esferas de PLGA vacías cubiertas con quitosano		0.5		7		

Al momento de la inoculación del refuerzo, los animales con PLGA mostraron dolor, motivo por el cual se les inoculó con lidocaína, los otros grupos no mostraron ninguna reacción.

7.4 IFN- γ

En la prueba *in vitro* de liberación de IFN- γ en sangre total, no se observó diferencia estadística entre los grupos vacunados y el control en las semanas 1 a 3, y luego en las semanas 23 y 27 ($p > 0.05$). Sin embargo, la liberación de sangre de IFN- γ fue significativamente mayor en los grupos vacunados de la semana 7 a la semana 21 y 28 ($p < 0.05$). Luego, no se observó diferencia significativa nuevamente en la semana 29 ($p > 0.05$). Se observa un incremento de IFN- γ en la semana cuatro, dos semanas después de la vacunación con BCG, luego en la semana 11, seis semanas después del refuerzo. La liberación de IFN- γ se observó en la semana 19; tres semanas después del desafío en todos los grupos experimentales; los grupos 4, 2 y 3, en orden descendente, tuvieron la mejor respuesta. Todos los grupos regresan a los niveles basales en la semana 29 (Figura 11).

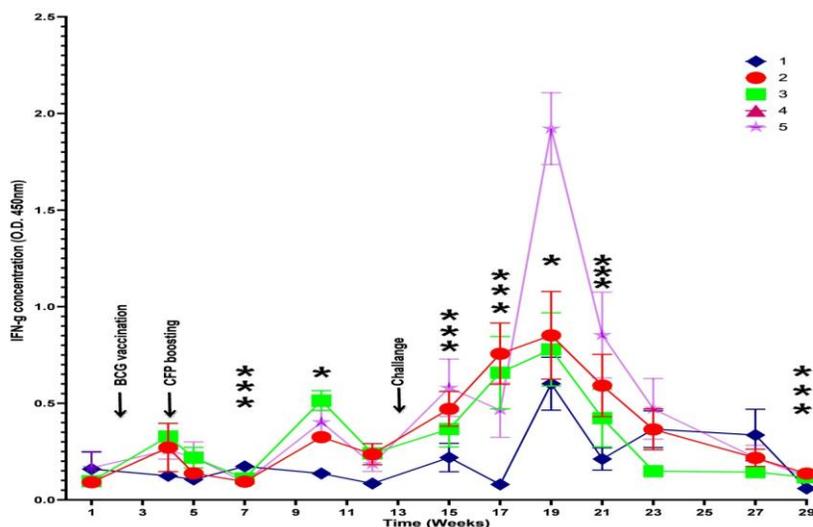


Figura 11. Respuesta de IFN- γ específica de antígeno en cabras después de la vacunación y desafío con una cepa de campo de *M. bovis*. PPD-B se utilizó en la estimulación de sangre total *in vitro*. Los valores de liberación de IFN- γ por grupo se expresan como densidades ópticas medias (D.O. 450nm).

7.5 Lesiones en los animales

El número y el porcentaje de animales con lesiones por grupo se encuentran en el cuadro 4. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos 3 y 4 frente a los grupos 1, 2 y 5.

Cuadro 4. Número de animales de cada grupo experimental con lesiones visibles después de la vacunación contra la TB y desafiados con una cepa de campo en un modelo de cabra.

Grupo	Animales desafiados (semana 13)	Animales con lesiones*	Porcentaje de animales con lesiones (%)
1	6	6	100
2	7	6	86
3	7	2	28
4	7	2	28
5	5	5	83

* Lesiones en pulmón y/o linfonodos (retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastinica, y mesentéricos).

Las puntuaciones medias de lesiones para los grupos experimentales se encuentran en el cuadro 5, y algunos ejemplos de puntuaciones de lesiones específicas en la fig. 10. Todos los grupos vacunados muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo control tanto en la prueba paramétrica ANOVA ($p = 0.007$) como en Kruskal-Wallis ($p = 0.010$). Una prueba posthoc de pares HSD Tukey no mostró diferencias estadísticas entre el grupo de control (6.3 ± 3.2) y el grupo 2 (3.0 ± 2.2) ($p > 0.05$); sin embargo, fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) del resto de los grupos vacunados. No se observó diferencia estadística entre los grupos vacunados ($p > 0.05$). Las puntuaciones medias más bajas, en orden ascendente, fueron los grupos 3 (puntuación media 1,07), 5 (1,4) y 6 (1,7).

Cuadro 5. Media, desviación estándar e intervalos de confianza del 95% para las puntuaciones de animales según las lesiones visibles postmortem en los grupos vacunados y de control expuestos a una cepa de campo en un modelo caprino.

Grupo	Puntuación media de lesiones*	DE	IC _{95%}
1	6.33 ^b	3.20	2.97; 9.69
2	3.00 ^{ab}	2.17	0.98; 5.01
3	1.07 ^a	2.24	-1.00; 3.14
4	1.43 ^a	3.17	-1.51; 4.35
5	1.75 ^a	1.47	0.20; 3.29

** Las medias con literales similares no son estadísticamente diferentes en una prueba de Tukey HSD ($p > 0.05$).

Ejemplos de los valores promedio de puntuación se encuentran en la figura 11:

- a) Sin lesiones visibles (puntaje 0).
- b) Lesión tuberculosa purulenta focal pequeña en el lóbulo craneal pulmonar (puntaje 2)
- c) Lesión tuberculosa purulenta de tamaño medio en el lóbulo craneal pulmonar (puntaje 4).
- d) Gran lesión tuberculosa purulenta en el lóbulo craneal pulmonar (puntaje 6).
- e) Pequeña lesión tuberculosa que cubre toda la superficie del parénquima pulmonar y lesión purulenta de tamaño mediano en el lóbulo craneal pulmonar (puntaje 8).
- f) Lesión tuberculosa pequeña que cubre todo el parénquima pulmonar y lesión grande en el lóbulo craneal pulmonar (puntaje 10).

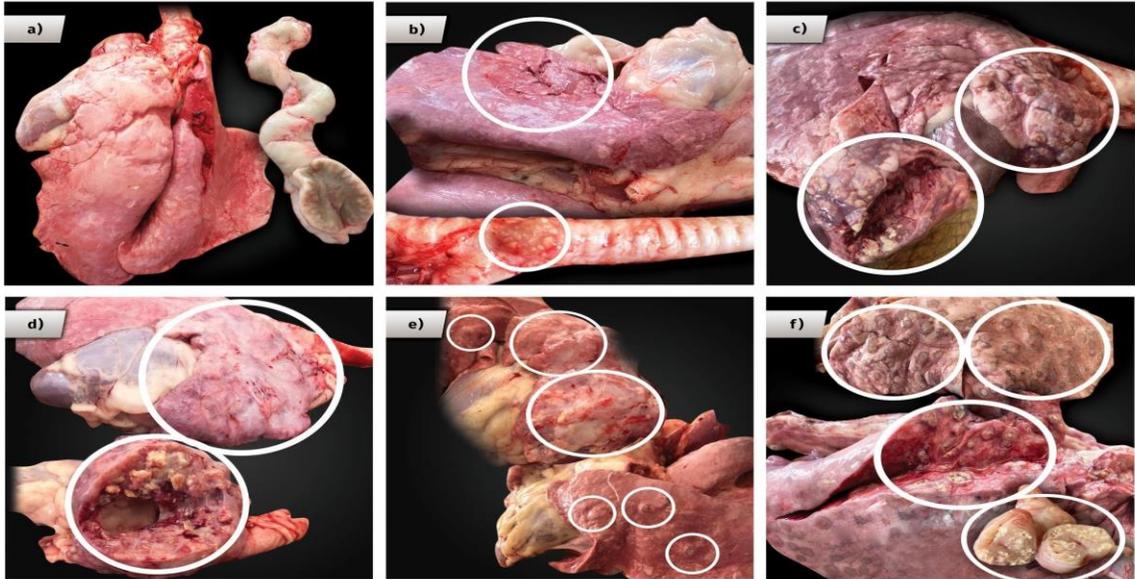


Figura 12. Ejemplos de puntajes de lesiones de animales experimentales vacunados contra TB con diferentes protocolos de vacuna y desafiados con una cepa de campo de *M. bovis*: a) puntaje 0, b) puntaje 2, c) puntaje 4, d) puntaje 6, e) puntaje 8 y f) puntaje 10.

La relación entre la concentración sanguínea de IFN- γ en la semana previa al desafío y los puntajes de las lesiones se encuentran en la figura 12. La correlación negativa entre esas variables no fue significativa ($r = -0.250$, $p = 0.16$); sin embargo, los animales con alta concentración de IFN- γ tuvieron valores de puntaje de lesión más bajos.

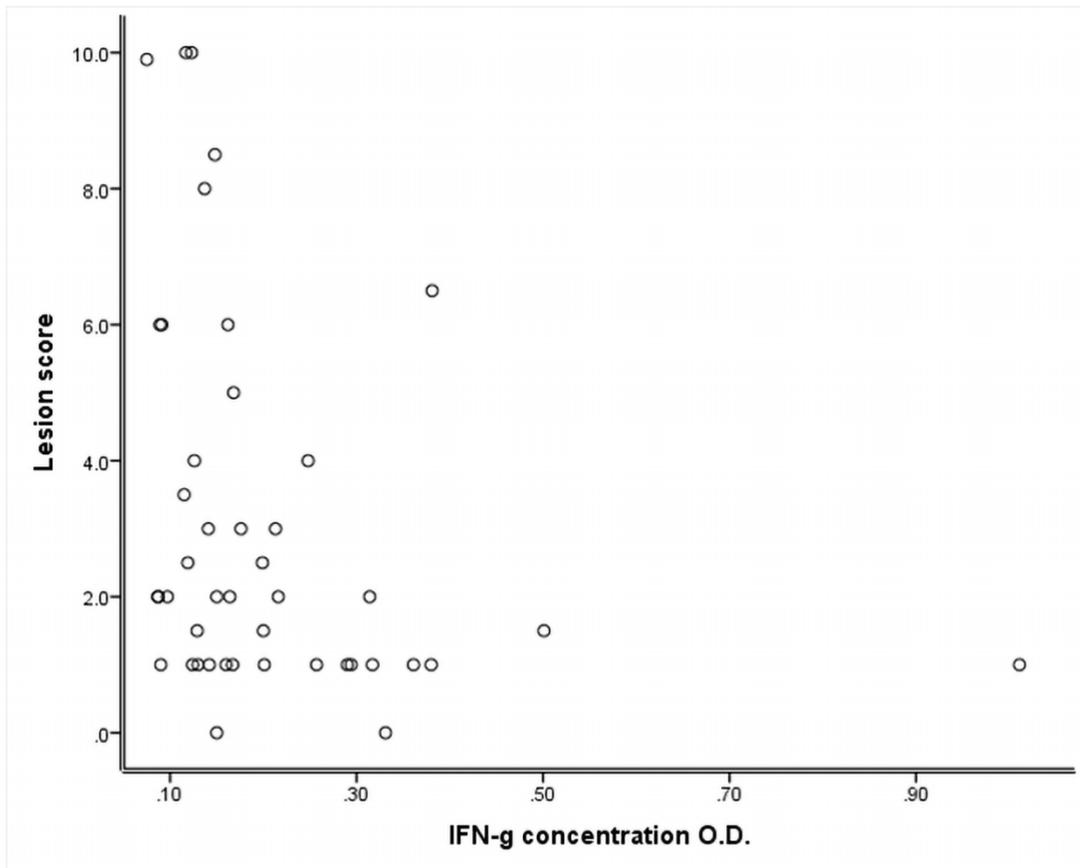


Figura 13. Relación entre la liberación de IFN- γ en sangre una semana antes del desafío y las puntuaciones de lesiones de animales experimentales vacunados contra la TB con una cepa de BCG y desafiados con una cepa de campo de *M. bovis*.

CAPÍTULO VIII

VIII. DISCUSIÓN

La eficacia experimental de BCG para reducir el daño patológico en animales vacunados contra la tuberculosis en bovinos y otras especies animales ha mostrado algunas variaciones (Corner *et al.*, 2001; Skinner *et al.*, 2001): factores como la cepa vacunal, dosis y vía de la inoculación (Vordermeier *et al.*, 2006) juegan un papel. En este estudio, utilizamos la cepa Phipps porque mostró una mejor protección que otras cepas de BCG en un modelo de ratones (Castillo-Rodal *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los estudios han utilizado las cepas Pasteur o Danisa y no encontraron diferencias en la protección (Ameni & Tibbo, 2002; Skinner *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2006; Wedlock *et al.*, 2007). En cuanto a la dosis de vacuna (1×10^3 CFU para BCG sola y 1×10^2 CFU de BCG recubierta con quitosano), que fue algo menor que la utilizada en otros estudios (Pérez de Val *et al.*, 2012; De Val *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2017), fue para prevenir la muerte súbita de los animales y tener la oportunidad de evaluar cuánto tiempo duró la inmunidad en los animales vacunados. En base al alto nivel de daño patológico observado en el grupo control, esta dosis es adecuada para estudios experimentales en cabras y para prevenir el desarrollo de lesiones tuberculosas en animales vacunados.

Se han utilizado diferentes rutas de inoculación para probar la eficacia de la vacuna (Buddle *et al.*, 2003a; Palmer *et al.*, 2007). En este experimento, utilizamos la vía subcutánea (sc), porque, como otros propusieron, creemos que sería la vía más práctica si se aprobara una vacunación masiva de ganado (Buddle *et al.*, 1999; Corner *et al.*, 2002). Estudios previos han informado el papel de refuerzo en la respuesta inmune a la vacunación (Buddle *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2004; Vordermeier *et al.*, 2004; McShane & Hill, 2005; McShane *et al.*, 2005). Nuestros resultados concuerdan con esos informes: todos los grupos reforzados demostraron un mejor desempeño en las puntuaciones de lesiones que el grupo vacunado solo con BCG. Es interesante que el grupo 3, que fue cebado con BCG y reforzado con CFP más un adyuvante sin polímeros agregados, exhibió el mejor desempeño en la

prevención del daño patológico, lo que sugiere que este protocolo es suficiente para reducir la enfermedad y, en consecuencia, la diseminación de la TB. Este resultado concuerda con los hallazgos previos informados por nuestro grupo en experimentos con ganado (Alarcon *et al.*, 2013).

La técnica de recubrimiento o formación de esferas y la cantidad de polímero podrían influir en la capacidad de encapsulación, liberación e inmunogenicidad del producto. En nuestros resultados, observamos que el quitosano al 0.001 % hace que los bacilos se vuelvan más nítidos cuando pasan a través del haz de luz. El SEM reveló diferencias entre *M. bovis* BCG recubierto y no recubierto, es posible observar que la mayor influencia en la morfología (la presencia de quitosano como biofilm modifica morfológicamente la bacteria, haciéndola más delgada en comparación con la que no tiene quitosano) de la película se debe a la presencia del quitosano generando cierta adherencia en las películas que se puede apreciar, ya que el quitosano es fácilmente procesable en fibras y películas a partir de una solución acuosa ácida, la presencia del solvente lo modifica, pero eso es un secundario factor. El SEM de los bacilos BCG sin recubrimiento mostró la presencia de seis bacilos con una longitud y un ancho promedio de 1.8 y 0.5 μm . El SEM de los bacilos BCG recubiertos mostró la presencia de seis bacilos con una longitud y un ancho promedio de 1.3 y 0.5 μm . Channarong *et al.* (2011) desarrollaron una vacuna de ADN que contiene liposomas recubiertos de quitosano cargados con polyplex (PLL); usando concentraciones de solución de quitosano al 0.05 %, 0.1 % y 0.2 % p / v. Observaron que los tamaños de los liposomas recubiertos aumentaban al disminuir el pH debido a la agregación de las partículas en la formulación. Usamos solo una concentración de solución de quitosano al 0.001 % p / v con un pH de 6. Como en nuestro experimento, el SEM de los liposomas recubiertos de quitosano se observa con mayor paso de luz.

Hope *et al.* (2005) observaron que los terneros de 2 semanas produjeron una respuesta inmune a la vacunación al menos tan intensa como la observada en los animales adultos, así como una disminucion significativamente del número de tejidos con lesiones y la extensión patológica de estas lesiones en los animales

vacunados. Otros investigadores informaron resultados similares en estudios experimentales de desafío en los que la vacunación con BCG no indujo inmunidad absoluta, pero sí moderó la gravedad de la infección (Francis, 1947).

Nuestros resultados muestran que los protocolos de vacunación con BCG y refuerzo con proteínas tienen el potencial de reducir la diseminación de la TB en las poblaciones animales al reducir el daño patológico en los vacunados. Esto apoya la hipótesis de que las vacunas, incorporadas a los actuales programas de control, podrían ser útiles para acelerar la eliminación de esta enfermedad en rebaños infectados. Nuestro grupo de trabajo ahora está preparado para pasar al siguiente paso, pruebas de campo a gran escala en hatos comerciales.

CAPÍTULO IX

IX. CONCLUSIÓN

Se demostró que es posible cubrir la cepa vacunal BCG-Phipps con el quitosano, sin que esto afecte la viabilidad de los bacilos por al menos 10 meses y que las esferas de PLGA con FCP logran conservarse uniformes por siete días en refrigeración, lo que permite mantenerlas almacenadas el tiempo suficiente para su uso posterior en la preparación y aplicación de las vacunas. Se demostró también que la vacunación con BCG, sola o recubierta con quitosano, en combinación con refuerzo de FCP, solo o con PLGA y/o quitosano, tiene el potencial de reducir la diseminación de la tuberculosis en el ganado al reducir el número de animales con lesiones, el número de lesiones por animal, y el tamaño de las lesiones en las cabras vacunadas y que esto puede ser extrapolado a otras especies. No obstante, para sacar conclusiones definitivas sobre la utilidad de la vacuna en poblaciones de ganado, aún están pendientes las pruebas de campo a gran escala en hatos comerciales.

CAPÍTULO X

X. LITERATURA CITADA

- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Vallecillo, A., Gutierrez-Pabello, J., Suárez-Güemes, F., McNair, J., Cataldi, A., Espitia, C., Anderson, P. & Pollock, J. 2006. Optimizing Antigen Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. *J Clin Microbiol.* 44 (12):4326-4335.
- Abalos, P. & Retamal, P. 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? *Rev. Sci. Tech. Off. Int Epiz.* 23 (2): 583-594.
- Abebe, F., Belay, M., Legesse, M., Mihret, A., & Franken, KS. 2017. Association of ESAT-6/CFP-10-induced IFN- γ , TNF- α and IL-10 with clinical tuberculosis: evidence from cohorts of pulmonary tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting. *Clin Exp Immunol.* 189(2): 241-249. DOI: 10.1111/cei.12972.
- Adelakun, O. D., Akinseye, V. O. Adesokan, H. K. & Cadmus, S. I. B. 2019. Prevalencia y pérdidas económicas debidas a la tuberculosis bovina en bovinos sacrados en bodija matadero municipal, Ibadan, Nigeria. *Folia Veterinaria.* 63 (1): 41—47. DOI: 10.2478/fv-2019-0006.
- Adesokan, HK., Jenkins, AO., van Soolingen, D. & Cadmus, SI. 2012. *Mycobacterium bovis* infection in livestock workers in Ibadan, Nigeria: evidence of occupational exposure. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(10): 1388-92. DOI: 10.5588/ijtld.12.0109.
- 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.

- Alarcon, G.J.C., Venegas, Y.R., Narvaez, L.B., Martínez, O.E.P., Casanova, L.G., Gallegos, S.S., Vargas, A.N., Ramírez, A.M.O. & Suazo, F.M. 2013. Efficacy of a vaccine formula against tuberculosis in cattle. *PLoS ONE*. 8:e76418.
- 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*. *Emerg Infect Dis*. 16(8): 1296–1299. DOI:10.3201/eid1608.100314.
- Al-Thwani, AN. & Al-Mashhadani, MS. 2016. Tuberculosis in slaughtered cattle and workers in some abattoirs of Baghdad governorate. *Int J Mycobacteriol*. 5(1): S250-S251. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.069.
- Álvarez, N., Borrero, R., Reyes, F., Camacho, F., Mohd, N., Sarmiento, M. & Acosta, A. 2009. Mecanismo de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *VacciMonitor*. 18 (3):18-25.
- Ameni, G. & Tibbo, M. 2002. Kinetics of Interferon- γ (IFN- γ) Release in the Peripheral Blood of Calves Vaccinated with BCG. *J. Immunoass. Immunochem*. 23: 245–253. DOI: 10.1081/IAS-120003664.
- Ameni, G., Amenu, H. & Tibbo, M. 2003. Bovine Tuberculosis: Prevalence and risk factor assessment in cattle and cattle owners in Wuchale-Jida District Central Ethiopia. *J. Appl. Res. Vet. Med*. 1(1): 17-26.
- Ameni, G., Tafess, K., Zewde, A., Eguale, T., Tilahun, M., Hailu, T., *et al.*, 2018. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis*. 65(1): 96-104. DOI: 10.1111/tbed.12618.
- Ameni, G.; Vordermeier, M.; Aseffa, A.; Young, D.B.; Hewinson, G. 2010. Evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clin. Vaccine Immunol*. 17: 1533–1538.

- Aranaz, A., De Juan, L., Bezos, J., Alvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., 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, L.F. & 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 (5): e0196948. DOI: 10.1371/journal.pone.0196948.
- Ashhurst, A.S., Parumasivam, T., Chan, J.G.Y., Lin, L.C.W., Flórido, M., West, N.P., Chan, H.-K. & Britton, W.J. 2018. PLGA particulate subunit tuberculosis vaccines promote humoral and Th17 responses but do not enhance control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE.* 13: e0194620. DOI: 10.1371/journal.pone.0194620.
- Bakhru P., Sirisaengtaksin N., Soudani E., Mukherjee S., Khan A., Jagannath C. 2014. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cell. Immunol.* 287: 53–61. DOI: 10.1016/j.cellimm.2013.11.007.
- 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.
- Barbier, E., Rochelet, M., Gal, L., Boschirolì, M. L. & Hartmann, A. 2017. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. *PloS One.* 12 (4): e0176315. DOI: 10.1371/journal.pone.0176315.

- 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.
- Bennett, R. & Cooke, R. 2006. Coast to farmers of a tuberculosis breakdown. *Vet Rec.* 158 (13): 429-432.
- Bernardelli, A. 2007. Producción y control de tuberculina bovina y aviar Derivado Proteico Purificado (DPP). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Buenos Aires: Coordinación de Bacteriología, Parasitología y Zooterápicos, Dirección de Laboratorio y Control Técnico. 74 pp. URL: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y_ESTRAT/TUBERCULOSIS/file1011-tuberbov.pdf.
- Besser RE, Pakiz B, Schulte JM, Alvarado S, Zell ER, Kenyon TA, Onorato IM. 2001. Risk factors for positive mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. *Pediatrics.* 108(2): 305-10. DOI: 10.1542/peds.108.2.305.
- Bezos, J., Casal, C., Álvarez, J., Roy, A., Romero, B., Rodríguez-Bertos, A., Bárcena, C., Díez, A., Juste, R., Gortázar, C., et al. 2017. Evaluation of the *Mycobacterium tuberculosis* SO₂ vaccine using a natural tuberculosis infection model in goats. *Vet. J.* 223: 60–67. DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.04.006.
- Bezos, 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.

- Blanco, F., Bianco, M., Meikle, V., Garbaccio, S., Vagnoni, L., Cataldi, A. & Bigi, F. 2011. Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*. *RIA*. 37 (2):189–192.
- Boland, F., Kelly, G., Good, M. & More, S. 2010. Bovine tuberculosis and milk production in infeted dairy herds in Ireland. *Prev Vet Med*. 93 (2-3): 153-161.
- 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.
- Broughan, JM., Judge, J., Ely, E., Delahay, RJ., Wilson, G., Clifton-Hadley, RS., Goodchild, AV., Bishop, H., Parry, JE. & Downs, SH. 2016. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. *Epidemiol Infect*. 144(14): 2899-2926. DOI: 10.1017/S095026881600131X.
- Buddle, B.M. 2010. Development of tuberculosis vaccines for cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2. DOI: 10.1079/PAVSNNR20072073.
- 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. DOI: 10.1128/CDLI.6.1.1-5.1999.
- Buddle, B.M., Parlane, N.A., Wedlock, D.N. & Heiser, A. 2013. Overview of Vaccination Trials for Control of Tuberculosis in Cattle, Wildlife and Humans. *Transbound. Emerg. Dis.* 60: 136–146. DOI: 10.1111/tbed.12092.

- Buddle, B.M., Wards, B.J., Aldwell, F.E., Collins, D.M. & de Lisle, G.W. 2002. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine*. 20: 1126–1133. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00436-4.
- Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Parlane, N.A., Corner, L.A.L., de Lisle, G.W. & Skinner, M.A. 2003a. 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. DOI: 10.1128/IAI.71.11.6411-6419.2003.
- Buddle, B.M.; Pollock, J.M.; Skinner, M.A.; Wedlock, D.N. 2003b. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int. J. Parasitol.* 33: 555–566.
- Buddle, BM. 2001. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis (Edinb). 81(1-2): 125-32. DOI: 10.1054/tube.2000.0254.
- Buddle, BM., de Lisle, GW., Pfeffer, A., & Aldwell, FE. 1995a. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 13(12): 1123-30. DOI: 10.1016/0264-410x(94)00055-r.
- Buddle, BM., de Lisle, W., Griffin, J. & Hutchings, A. 2015. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N Z Vet J.* 1:19-27.
- Buddle, BM., Keen, D., Thomson, A., Jowett, G., McCarthy, AR., Heslop, J., et al., 1995b. 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, BM., Parlane, NA., Wedlock, DN. & Heiser, A. 2013. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound Emerg Dis.* 60 (1): 136-46.

- Buonsanti, C. & D'Oro, U. 2017. Chapter 5 -Discovery of Immune Potentiators as Vaccine Adjuvants. DOI: [10.1016/B978-0-12-804019-5.00005-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00005-0).
- 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. DOI: 10.1089/dna.2006.25.438.
- Cantó-Alarcón, GJ., 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. DOI: 10.3390/ijms20010204.
- 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. DOI: 10.1128/IAI.74.3.1718-1724.2006.
- Chambers, MA., Carter, SP., Wilson, GJ., Jones, G., Brown, E., Hewinson, RG., et al. 2014. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: an overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Vet Rec.* 175 (4): 90-96.
- Chan, HH. & Mpe, J. 2015. A rare cause of pulmonary tuberculosis. *N Z Med J.* 128(1423): 81-3.
- Channarong S, Chaicumpa W, Sinchaipanid N & Mitrevej A. 2011. Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral DNA vaccine: the

- improvement of Peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. *AAPS PharmSciTech*. 12(1):192-200. DOI:10.1208/s12249-010-9559-9.
- 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.
- Collins, DM. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 81(1-2): 97-102. DOI: 10.1054/tube.2000.0255.
- Corner, L. 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Vet Microbiol*. 112: 303-312.
- 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-Guérin: The duration of protection. *Vet. Microbiol*. 81: 181–191. DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00344-3.
- Costa-Gouveia, J., Aínsa, J.A., Brodin, P. & Lucía, A. 2017. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discov. Today*. 22: 600–607. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.01.011.
- Courtenay, O., Reilly, L. A., Sweeney, F. P., Hibberd, V., Bryan, S., Ul-Hassan, *et al*. 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis?. *Biol Lett*. 2(3): 460–462. DOI: 10.1098/rsbl.2006.0468.
- Cousins, D. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 20 (1): 71-85.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S. & de la Rúa-Domenech, R. 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec*. 163 (4): 127.
- 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.
- Davidson, J. A., Loutet, M. G., O'Connor, C., Kearns, C., Smith, R. M., Lalor, M. K., et al. 2017. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Disease in Humans in England, Wales, and Northern Ireland, 2002-2014. *Emerg Infect Dis.* 23(3): 377–386. <https://doi.org/10.3201/eid2303.161408>.
- 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.
- 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 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. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.008.
- 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.
- Dean, G. S., Rhodes, S. G., Coad, M., Whelan, A. O., Cockle, P. J., Clifford, D. J., et al. 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun.* 73(10): 6467–6471. DOI: [10.1128/IAI.73.10.6467-6471.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6467-6471.2005).
- Dejene, S. W., Heitkönig, I. M., Prins, H. H., Lemma, F. A., Mekonnen, D. A., Alemu, Z. E., et al. 2016. Risk Factors for Bovine Tuberculosis (bTB) in Cattle in Ethiopia. *PloS one.* 11(7): e0159083. DOI: [10.1371/journal.pone.0159083](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159083).
- Díaz-Otero, F., Padilla, J., Jaramillo, L., González, D., & Arriaga, C. 2008. Evaluation of BCG vaccine and *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins against

- bovine tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1149: 306-8. DOI: 10.1196/annals.1428.014.
- 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.
- Djermal, S. E., Camperio, C., Armas, F., Siala, M., Smaoui, S., Messadi-Akrout, F., Gdoura, R., & Marianelli, C. 2018. Detection of a streptomycin-resistant *Mycobacterium bovis* strain through antitubercular drug susceptibility testing of Tunisian *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from cattle. *BMC Vet Res.* 14(1): 296. DOI: 10.1186/s12917-018-1623-9.
- Dobrovolskaia, M.A. & McNeil, S.E. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2: 469–478. DOI: 10.1038/nnano.2007.223.
- Duffy, S.C., Srinivasan, S., Schilling, M.A., Stuber, T., Danchuk, S.N., Michael, J.S., *et al.*, 2020. Reconsidering *Mycobacterium bovis* as a proxy for zoonotic tuberculosis: a molecular epidemiological surveillance study. *Lancet Microbe.* 1 (2): e66-e73. DOI: [10.1016/S2666-5247\(20\)30038-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30038-0).
- Echeverria-Valencia, G., Flores-Villalva, S. & Espitia, C. I. 2017. Virulence factors and pathogenicity of *Mycobacterium* in *Mycobacterium* - Research and Development. *IntechOpen.* Chapter 12. 232-255. DOI:[10.5772/intechopen.72027](https://doi.org/10.5772/intechopen.72027).
- Elnaggar MM, Abdellrazeg GS, Elsisy A, Mahmoud AH, Shyboub A, Sester M, Khaliel SA, Singh M, Torkey HA, Davis WC. 2017. Evaluation of antigen specific interleukin-1 β as a biomarker to detect cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis.* 105: 53-59.
- Enarson, D., ElSony, A., Chen-Yuang, C. & Rusen, I. 2009. Chapter 77 – Issues in global tuberculosis control. *Tuberculosis.* 786-795.

- Esteban, J., Fernández, R. & Soriano, F. 2000. Rapidly growing mycobacteria in human pathology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 18 (6):279-286.
- Etter, E., Donado, P., Jori, F., Caron, A., Goutard, F., & Roger, F. 2006. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1081: 61-73. DOI: 10.1196/annals.1373.006.
- Feng, G., Jiang, Q., Xia, M., Lu, Y., Qiu, W., Zhao, D., Lu, L., Peng, G. & Wang, Y. 2013. Enhanced Immune Response and Protective Effects of Nano-chitosan-based DNA Vaccine Encoding T Cell Epitopes of Esat-6 and FL against Mycobacterium Tuberculosis Infection. *PLoS ONE.* 8: e61135. DOI: 10.1371/journal.pone.0061135.
- 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. DOI: 10.1128/IAI.72.12.6945-6950.2004.
- Fisher, J. R. 1998. Cattle plagues past and present: the mystery of mad cow disease. *Journal of Contemporary History.* 33: 215-228.
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., *et al.* 2013. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence.* 4(1): 3–66. DOI: 10.4161/viru.22329.
- Francis, J. 1971. Susceptibility to Tuberculosis and the Route of Infection. *A Vet J.* 47(9):414.
- Gallivan, M., Shah, N., & Flood, J. 2015. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerging infectious diseases.* 21(3): 435–443. DOI:10.3201/eid2103.141539
- 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.
- Garg, N.K., Dwivedi, P., Jain, A., Tyagi, S., Sahu, T. & Tyagi, R.K. 2014. Development of novel carrier(s) mediated tuberculosis vaccine: More than a tour de force. *Eur. J. Pharm. Sci.* 62: 227–242. doi: 10.1016/j.ejps.2014.05.028.
- Gengenbacher, M., Nieuwenhuizen, NE. & Kaufmann, SHE. 2017. BCG — old workhorse, new skills. *Curr Opin Immunol.* 47: 8-16.
- González, SD., Díaz, OF., Jaramillo, ML., Pérez, GR., Padilla, UJ., Santillán-Flores, MA., *et al.*, 2007. Evaluation of different immunogens against bovine tuberculosis based on presence of lesions at necropsy. *Vet Mex.* 38(3): 271-284.
- González-Ruiz, S., Cantó-Alarcón, G. J., Rodríguez-Hernández, E., Flores-Villalba, S., Román-Ponce, S. I., & Milián-Suazo, F. 2018. Resistencia natural contra la tuberculosis en ganado. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias.* 9(2): 328-345. DOI: [10.22319/rmcp.v9i2.4396](https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4396).
- González-Ruiz, S., Strillacci, MG., Durán-Aguilar, M., Cantó-Alarcón, GJ., Herrera-Rodríguez, SE., Bagnato, A., Guzmán, LF., Milián-Suazo, F. & Román-Ponce, SI. 2019. Genome-Wide Association Study in Mexican Holstein Cattle Reveals Novel Quantitative Trait Loci Regions and Confirms Mapped Loci for Resistance to Bovine Tuberculosis. *Animals (Basel).* 9(9): 636. DOI: [10.3390/ani9090636](https://doi.org/10.3390/ani9090636).
- Gormley, E., Doyle, M., Fitzsimons, T., McGill, K. & Collins, J. 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam R) assay. *Vet Microbiol.* 112: 171–179.
- Guimarães, LE., Baker, B., Perricone, C. & Shoenfeld, Y. 2015. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacol Res.* 100: 190-209.
- Gumi, B., Schelling, E., Berg, S., Firdessa, R., Erenso, G., Mekonnen, W., Hailu, E., *et al.* 2012. Zoonotic transmission of tuberculosis between pastoralists and

- their livestock in South-East Ethiopia. *Ecohealth*. 9(2): 139-49. DOI: 10.1007/s10393-012-0754-x.
- Gutjahr, A., Phelip, C., Coolen, A.-L., Monge, C., Boisgard, A.-S., Paul, S. & Verrier, B. 2016. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines*. 4: 34. DOI: 10.3390/vaccines4040034.
- Han, P., Orta, P., Kwon, D. & Inman, J. 2015. *Mycobacterium bovis* cervical lymphadenitis: A representative case and review. *Int J Pediatr Otorhi*. 79: 1798-1801.
- Hawn, R., Day, A., Scriba, J., Hatherill, M., Hanekom, A., Evans, G., et al. 2014. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Microbiol Mol Biol Rev*. 78 (4): 650-71.
- Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G. & Howard, C.J. 2005. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immunol*. 139: 48–56. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2005.02668.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.
- Humblet, M. F., Boschioli, M. L., & Saegerman, C. 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res*. 40(5): 50. DOI: 10.1051/vetres/2009033.
- Hwang, S.-A. & Actor, J.K. 2009. Lactoferrin modulation of BCG-infected dendritic cell functions. *Int. Immunol*. 21: 1185–1197. DOI: 10.1093/intimm/dxp084.
- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N. & Davis, S.S. 2001. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 51: 81–96. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00171-5.

- Islam, M. N., Khan, M. K., Khan, M., Kostoulas, P., Rahman, A., & Alam, M. M. 2021. Risk factors and true prevalence of bovine tuberculosis in Bangladesh. *PLoS one*. 16(2): e0247838. DOI: 10.1371/journal.pone.0247838.
- Jackson-Sillah, D., Cliff, JM., Mensah, GI., Dickson, E., Sowah, S., Tetteh, JK., *et al.*, 2013. Recombinant ESAT-6-CFP10 Fusion Protein Induction of Th1/Th2 Cytokines and FoxP3 Expressing Treg Cells in Pulmonary TB. *PLoS One*. 8(6): e68121. DOI: 10.1371/journal.pone.0068121.
- Jilani, TN., Avula, A., Zafar Gondal. A., *et al.*, 2020. Active Tuberculosis. [Updated 2020 Nov 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>.
- Johnson, L., Gough, J., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M., & Wangoo, A. 2006. Immunohistochemical markers augment evaluation of vaccine efficacy and disease severity in bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccinated cattle challenged with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 111(3-4): 219-29. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.01.016.
- Kaneene, J. & Pfeiffer, D. 2008. Chapter 5 – Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans (Second edition, pp. 34-48).
- Kaushik, DK. & Sehgal, D. 2008. Developing antibacterial vaccines in genomics and proteomics era. *Scand J Immunol*. 67 (6): 544-52.
- Kemal, J., Sibhat, B., Abraham, A. Terefe. Y., Tulu, KT., Welay, K. & Getahun, N. 2019. Bovine tuberculosis in eastern Ethiopia: prevalence, risk factors and its public health importance. *BMC Infect Dis*. 19:39. DOI: 10.1186/s12879-018-3628-1.
- Kennedy, HE., Welsh, MD., Bryson, DG., Cassidy, JP., Forster, FI., Howard, CJ., *et al.* 2002. Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1 (+) gamma delta T cells. *Infect Immun*. 70 (3): 1488-1500.

- Khabazzadeh Tehrani, N., Mahdavi, M., Maleki, F., Zarrati, S., & Tabatabaie, F. 2016. The role of Montanide ISA 70 as an adjuvant in immune responses against *Leishmania major* induced by thiol-specific antioxidant-based protein vaccine. *J Parasit Dis.* 40(3): 760–767. DOI: 10.1007/s12639-014-0574-8
- 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. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.05.035.
- Khattak, I., Mushtaq, MH., Ahmad, MU., Khan, MS. & Haider, J. 2016. Zoonotic tuberculosis in occupationally exposed groups in Pakistan. *Occup Med (Lond).* 66(5): 371-6. DOI: 10.1093/occmed/kqw039.
- Kirby, D.J., Rosenkrands, I., Agger, E.M., Andersen, P., Coombes, A.G.A. & Perrie, Y. 2008. PLGA microspheres for the delivery of a novel subunit TB vaccine. *J. Drug Target.* 16: 282–293. DOI: 10.1080/10611860801900462.
- Kleeberg, M. 1984. Human tuberculosis of bovine origin in relation to public health. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 3:11–32.
- Kremer, L., Estaquier, J., Wolowczuk, I., Biet, F., Ameisen, JC. & Loch, C. 2000. Ineffective cellular immune response associated with T-cell apoptosis in susceptible *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect Immun.* 68 (7): 4264-4273.
- Lesellier, S., Palmer, S., Dalley, DJ., Davé, D., Johnson, L., Hewinson, RG., & Chambers, MA. 2006. The safety and immunogenicity of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccine in European badgers (*Meles meles*). *Vet Immunol Immunopathol.* 112(1-2): 24-37. DOI: 10.1016/j.vetimm.2006.03.009.
- Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M. et al., 2013. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol.* DOI: 10.1155/2013/387023.

- Lin, LC., Chattopadhyay, S., Lin, JC. & Hu, CJ. 2018. Advances and opportunities in Nanoparticle-and Nanomaterial-Based Vaccines against Bacterial Infections. *Adv Healthc Mater.* 7 (13): e1701395.
- Liu, B., Wu, Z., Liu, T., Qian, R., Wu, T., Liu, Q. & Shen, A. 2018. Polymeric Nanoparticles Engineered as a Vaccine Adjuvant-Delivery System. In: Wang E.N., Wang T., editors. *Immunization—Vaccine Adjuvant Delivery System and Strategies*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.81084.
- Lombardi, G., Botti, I., Pacciarini, ML., Boniotti, MB., Roncarati, G. & Dal Monte, P. 2017. Five-year surveillance of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in Bologna, Italy: an underestimated problem. *Epidemiol Infect.* 145(14): 3035-3039. DOI: 10.1017/S0950268817001996.
- López Marin, LM., Díaz-Otero, F., Vallecillo-Meza, AJ., Esquivel-Solís, H. & Gutiérrez-Pabello, JA. 2006. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48 (2): 173-178.
- López, L., Pohlenz, A., Bravo, J. & Zepeda, H. 2007. Tuberculosis bovina: ¿zoonosis re-emergente? URL: <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol20num3/articulos/tuberculosis/> Citado el 03 de septiembre del 2018.
- 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. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.033.
- Ly, A., & Liu, J. 2020. Mycobacterial Virulence Factors: Surface-Exposed Lipids and Secreted Proteins. *Int J Mol Sci.* 21(11): 3985. <https://doi.org/10.3390/ijms21113985>.

- Majoer, C. J., Magis-Escurra, C., van Ingen, J., Boeree, M. J., & van Soolingen, D. (2011). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging infectious diseases*. 17(3), 457–463. DOI: [10.3201/eid1703.101111](https://doi.org/10.3201/eid1703.101111).
- Marianelli, C., Armas, F., Boniotti, MB., Mazzone, P., Pacciarini, ML., & Di Marco Lo Presti, V. 2015. Multiple drug-susceptibility screening in *Mycobacterium bovis*: new nucleotide polymorphisms in the embB gene among ethambutol susceptible strains. *Int J Infect Dis*. 33:39-44. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.12.043.
- Maue, AC., Waters, WR., Palmer, MV., Nonnecke, BJ., Minion, FC., Brown, WC., *et al.*, 2007. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine*. 25(24): 4735-46. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.03.052.
- McCorry, T., Whelan, AO., Welsh, MD., McNair, J., Walton, E., Bryson, DG., *et al.* 2005. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet Rec*. 157(20): 613-8. DOI: 10.1136/vr.157.20.613.
- McShane, H. & Hill, A. 2005. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. *Microbes Infect*. 7: 962–967. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.03.009.
- McShane, H., Pathan, A.A., Sander, C.R., Goonetilleke, N.P., Fletcher, H.A. & Hill, A.V.S. 2005. Boosting BCG with MVA85A: The first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis*. 85: 47–52. DOI: 10.1016/j.tube.2004.09.015.
- Méndez-Samperio, P. 2010. Role of interleukin-12 family cytokines in the cellular response to mycobacterial disease. *Int J Infect Dis*. 14 (5): e3666-e3671.
- Menzies, FD. & Neill, SD. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J*. 160(2): 92-106. DOI: 10.1053/tvjl.2000.0482.

- Mertoğlu, A., Biçmen, C., Karaarslan, S. & Buğdayci, MH. 2018. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* revealed by skin lesion in slaughterhouse worker. *Clin Respir J.* 12(1): 317-321. DOI: 10.1111/crj.12485.
- Michel, A., Bengis, R., Keet, D., Hofmeyr, M., de Klerk, L., Cross, P., Jolles, A., Cooper, D., Whyte, I., Buss, P. & Godfroid, J. 2006. Wildlife tuberculosis in South Africa conservation areas: Implications and challenges. *Vet Microbiol.* 112: 91-100.
- 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, 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-g response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. *Res. Vet. Sci.* 90(3): 419–424. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.07.018.
- Milián-Suazo, F., Salman, M., Ramirez, C., Payeur, J., Rhyan, J. & Santillan, M. 2000. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. *Am J Vet Res.* 61 (1):86-89.
- Mohamed, A. 2020. Bovine tuberculosis at the human–livestock–wildlife interface and its control through one health approach in the Ethiopian Somali Pastoralists: A review. *One Health.* 9(1): 100113. DOI: [10.1016/j.onehlt.2019.100113](https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100113).
- Mohan, T., Verma, P. & Rao, D.N. 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J. Med. Res.* 138: 779–795.
- Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J. & Laise, C. 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*–induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis.* 19 (6):899-908.

- Nak-Hyung, L., Jung-Ah, L., Seung-Yong, P., Chang-Seon, S., In-Soo, C. & Joong-Bok, L. 2012. A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. *Clin Exp Vaccine Res.* 1 (1): 18-34.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & de la Fuente, J. 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol.* 127: 1-9.
- Navarro, Y., Herranz, M., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L. & García-de-Viedma, D. 2014. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci.* 96: 422-425.
- Neill, SD., Bryson, DG. & Pollock, JM. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2): 79-86. DOI: 10.1054/tube.2000.0279.
- Neill, SD., Hanna, J., O'Brien, JJ., & McCracken, RM. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet Rec.* 123(13): 340-3. DOI: 10.1136/vr.123.13.340.
- 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. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.10.025.
- Nugent, G., Yockney, I.J., Whitford, J., Aldwell, F.E. & Buddle, B.M. 2017. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 208: 181–189.
- Nuru, A., Mamo, G., Zewude, A., Mulat, Y., Yitayew, G., Admasu, A., Medhin, G. *et al.* 2017. Preliminary investigation of the transmission of tuberculosis between farmers and their cattle in smallholder farms in northwestern Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Res Notes.* 10(1): 31. DOI: 10.1186/s13104-016-2349-z.
- O'Connor, C., Haydon, D. & Kao, R. 2012. An ecological and comparative perspective on the control of bovine tuberculosis in Great Britain and the Republic of Ireland. *Prev Vet Med.* 104(3-4): 185-197.

- 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). Controlling bovine tuberculosis: a One Health challenge. Bulletin #2019-1 [cited 10 May 2021]. Available from: <https://oiebulletin.com/wp-content/uploads/bulletins/panorama-2019-1-en.pdf>.
- OIE (World organization for animal health). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2021 [cited 10 May 2021]. Available from: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>.
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A. S., Mumford, E., Erlacher Vindel, E., *et al.*, 2016: Personal view zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. *Lancet Infect. Dis.* 16 (12): 1305-1430. DOI: [10.1016/ S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6).
- Oloya, J., Opuda-Asibo, J., Kazwala, R., Demelash, AB., Skjerve, E., Lund, A., Johansen, TB. & Djonne, B. 2008. Mycobacteria causing human cervical lymphadenitis in pastoral communities in the Karamoja region of Uganda. *Epidemiol Infect.* 136(5): 636-43. DOI: [10.1017/S0950268807009004](https://doi.org/10.1017/S0950268807009004).
- Palmer, M. 2007. Tuberculosis: A reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr Top Microbiol Immunol.* 315: 195-215.
- Palmer, M. V., Thacker, T. C., Waters, W. R., Gortázar, C., & Corner, L. A. 2012. *Mycobacterium bovis*: A Model Pathogen at the Interface of Livestock, Wildlife, and Humans. *Veterinary medicine international.* 236205. DOI: [10.1155/2012/236205](https://doi.org/10.1155/2012/236205).
- Palmer, M., Waters, W. & Whipple, D. 2003. Aerosol exposure of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis.* 39 (4): 817–823.

- Palmer, MV., Wiarda, J., Kanipe, C., & Thacker, TC. 2019. Early Pulmonary Lesions in Cattle Infected via Aerosolized *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol.* 56(4): 544-554. DOI: 10.1177/0300985819833454.
- Parlane, NA. & Buddle, BM. 2015. Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Curr Clin Micro Rpt.* 2: 44–53.
- Perea-Razo, CA., Rodríguez-Hernández E., Ponce, SIR., Milián-Suazo, F., Robbe-Austerman, S., Stuber, T., & Cantó-Alarcón, GJ. 2018. Molecular epidemiology of cattle tuberculosis in Mexico through whole-genome sequencing and spoligotyping. *PLoS One.* 13(8): e0201981. DOI: 10.1371/journal.pone.0201981.
- Perea-Razo, CA., Suazo, FM., Reyes, IB., Gallegos, SS., Hernández, ER., Flores, VS., et al. 2017. Whole Genome Sequencing for Detection of Zoonotic Tuberculosis in Queretaro, Mexico. *J Infect Dis Preve Med* 5: 158. DOI:10.4172/2329-8731.1000158.
- 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. DOI: 10.1128/CVI.00275-12.
- Pérez-Barragán, E. & Manjarrez-Tellez, B. 2017. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, a re-emerging infection?. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 55(5): 635-40.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y. & García-de-Viedna, D. 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Res Vet Sci.* 97: S94-S100.
- 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., Foster, C., Morris, P. & Teverson, R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci*. 74 (1): 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.
- Ramdas, E., Lyashchenko, P., Greenwald, R., Austerman, S., McManis, C. & Waters, R. 2015. *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis*. 21 (3): 480-3.
- 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.
- Ray, S., Talukdar, A., Kundu, S., Khanra, D., & Sonthalia, N. 2013. Diagnosis and management of miliary tuberculosis: current state and future perspectives. *Therapeutics and clinical risk management*. 9: 9–26. DOI: 10.2147/TCRM.S29179
- Riteau, N. & Sher, A. 2016. Chitosan: An adjuvant with an unanticipated STING. *Immunity*. 44 (3): 522-524.
- Rivas, C., Greif, G., Coitinho, C., Araújo, L., Laserra, P. & Robello, C. 2012. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*. Una zoonosis reemergente en Uruguay. *Rev Méd Urug*. 28(3): 209-214.
- Rivera, S., Jiménez, J. & Deward, J. 2009. Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del estado Zulia, Venezuela. *Rev Cient*. 19 (6): 566-575.

- Rodriguez-Campos, S., Smith, NH., Boniotti, MB. & Aranaz, A. 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 97 Suppl:S5-S19. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.02.009.
- Rothel, J., Jones, S., Corner, L., Cox, J. & Wood, P. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 67 (4): 134–137.
- Roy, Á., Rivalde, M.A., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Sevilla, I., Díez-Guerrier, A., Rodríguez-Bertos, A., Domínguez, M., Garrido, J., et al. 2018. Response of goats to intramuscular vaccination with heat-killed *Mycobacterium bovis* and natural challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 60: 28–34. DOI: 10.1016/j.cimid.2018.09.006.
- SAG (Servicio Agrícola y Ganadero). Tuberculosis bovina (TB) [citado el 28 junio 2021]. Diapponible en <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/tuberculosis-bovina-tb>.
- Santos, N., Santos, C., Valente, T., Gortázar, C., Almeida, V., & Correia-Neves, M. 2015. Widespread Environmental Contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revealed by a Molecular Detection Protocol. *PloS one.* 10(11): e0142079. DOI: 10.1371/journal.pone.0142079.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Tuberculosis Bovina [citado el 20 Marzo 2022a]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-contra-la-tuberculosis-bovina-49517>.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). Reconocimientos internacionales en tuberculosis bovina [citado el 20 Marzo 2022b]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/reconocimientos-internacionales-en-tuberculosis-bovina>.

- Shrikrishna, D., de la Rua-Domenech, R., Smith, NH., Colloff, A. & Coutts, I. 2009. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? *Thorax*. 64(1): 89-91. DOI: 10.1136/thx.2008.106302.
- Shu, D., Heiser, A., Wedlock, DN., Luo, D., de Lisle, GW. & Buddle, BM. 2014. Comparison of gene expression of immune mediators in lung and pulmonary lymph node granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunop*. 160 (1): 81-89.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Exportación de ganado bovino [citado el 29 de junio 2021]. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/prensa/exportacion-de-ganado-bovino-103649?idiom=es>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Inventario 2019 [citado el 29 de junio 2021]. Disponible en <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762>.
- Sichewo, P. R., Hlokwe, T. M., Etter, E., & Michel, A. L. 2020a. 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.
- Sichewo, PR., Vander-Kelen, C., Thys, S. & Michel, AL. 2020b. Risk practices for bovine tuberculosis transmission to cattle and livestock farming communities living at wildlife-livestock-human interface in northern KwaZulu Natal, South Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 14(3): e0007618. DOI: [10.1371/journal.pntd.0007618](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007618).
- Silva, MR., Rocha, AD., Araújo, FR., Fonseca-Júnior, AA., Alencar, AP., Suffys, PN., Costa, RR., et al. 2018 Risk factors for human *Mycobacterium bovis* infections in an urban area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 113.

- 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. DOI: 10.20506/rst.20.1.1276.
- Skinner, MA., Buddle, BM., Wedlock, DN., Keen, D., de Lisle, GW., Tascon, RE., *et al.*, 2003. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 71(9): 4901-7. DOI: 10.1128/IAI.71.9.4901-4907.2003.
- Skuce, R. A., Allen, A. R., & McDowell, S. W. 2012. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Vet Med Int.* 621210. DOI: 10.1155/2012/621210.
- Smith, J.D., Morton, L.D. & Ulery, B.D. 2015. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34: 217–224. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.03.014.
- Smith, R. M., Drobniewski, F., Gibson, A., Montague, J. D., Logan, M. N., Hunt, D., *et al.* 2004. *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 10(3): 539–541. DOI: 10.3201/eid1003.020819.
- Soane. R.J., Frier. M., Perkins. A.C., Jones. N.S., Davis. S.S. & Illum, L. 1999. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* 178: 55–65. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00367-6.
- Speth, M.T., Repnik, U. & Griffiths, G. 2016. Layer-by-layer nanocoating of live Bacille-Calmette-Guérin mycobacteria with poly(I:C) and chitosan enhances pro-inflammatory activation and bactericidal capacity in murine macrophages. *Biomaterials.* 111: 1–12. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.027.
- Stone, M., Brown, T. & Drobniewski, F. 2012. Human *Mycobacterium bovis* Infections in London and Southeast England. *J Clin Microbiol.* 50 (1): 164-165.

- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirolì, M. & Besnier, J. 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol.* 50 (1): 164-165.
- 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 Publishing.
- 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.
- Thoen, O., Lobue, P., Enarson, D., Kaneene, J. & de Kantor, I. 2009. Tuberculosis: a re-emerging disease of animals and humans. *Vet Ital.* 45 (1): 135-181.
- Tigre, W., Alemayehu, G., Abetu, T. & Deressa, B. 2011. Preliminary study on public health implication of bovine tuberculosis in Jimma Town, south western Ethiopia. *Glob Vet.* 6: 369–373.
- Tomley, F. & Shirley, M. 2009. Livestock infectious diseases and zoonoses. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364: 2637-2642.
- Torres-Gonzalez, P., Soberanis-Ramos, O., Martinez-Gamboa, A., Chavez-Mazari, B., Barrios-Herrera, MT., Torres-Rojas, M., Cruz-Hervert, LP., et al. 2013. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(4): e2177. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002177.
- Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Microbiol Infec.* 15 (10): 906-910.
- Twomey, DF., Higgins, RJ., Worth, DR., Okker, M., Gover, K., Nabb, EJ. & Speirs, G. 2010. Cutaneous TB caused by *Mycobacterium bovis* in a veterinary surgeon following exposure to a tuberculous alpaca (*Vicugna pacos*). *Vet Rec.* 166(6): 175-7. DOI: 10.1136/vr.b4780.

- 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.
- Une, Y. & Mori, T. 2007. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 30 (5-6): 415-425.
- Vallerga, M., Viola, C., Thwaites, A., Bases, A., Ambroggi, M., Poggi, S. & Marino, R. 2005. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en una mujer con SIDA. *Rev. Argent. Microbiol.* 37: 96-98.
- Vanderpool DM, O'Leary JP. Primary tuberculous enteritis. *Surg Gynecol Obstet.* 1988 Aug;167(2):167-73.
- 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. DOI: 10.1186/s12917-017-1182-5.
- 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, 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. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.11.001.
- 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. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01903.x.
- 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., Jones, GJ., Buddle, BM., Hewinson, RG. & 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
- Waddington, K. (2002) Safe meat and healthy animals: BSE and bovine TB. www.historyandpolicy.org/policy-papers/papers/safe-meat-and-healthy-animals-bse-and-bovine-tb.
- Waters, WR., & Palmer, MV. 2015. *Mycobacterium bovis* Infection of Cattle and White-Tailed Deer: Translational Research of Relevance to Human Tuberculosis. *ILAR J*. 56(1): 26–43. DOI:[10.1093/ilar/ilv001](https://doi.org/10.1093/ilar/ilv001).
- Waters, WR., Maggioli, MF., Palmer, MV., Thacker, TC., McGill, JL., Vordermeier, HM., *et al.*, 2015. Interleukin-17A as a Biomarker for Bovine Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 23 (2):168-180.
- Waters, WR., Palmer, MV., Buddle, BM. & Vordermeier, HM. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*. 30 (16): 2611-2622.
- Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G. & Buddle, B.M. 2007. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 118: 50–58. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.04.005.

- Wedlock, DN., Denis, M., Skinner, MA., Koach, J., de Lisle, GW., Vordermeier, HM., *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(6): 3540-6. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3540-3546.2005.
- Wedlock, DN., Vesosky, B., Skinner, MA., de Lisle, GW., Orme, IM., & Buddle, BM. 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 68(10): 5809-15. DOI: 10.1128/IAI.68.10.5809-5815.2000.
- WHO (World Health Organization <https://twitter.com/who>). Global Tuberculosis report 2020. Geneva, Switzerland. [cited 10 May 2021]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- Wilkins, MJ., Bartlett, PC., Judge, LJ., Erskine, RJ., Boulton, ML. & Kaneene; JB. 2009. Veterinarian injuries associated with bovine TB testing livestock in Michigan, 2001. *Prev Vet Med.* 89(3-4): 185-90. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2009.02.014.
- Xu, F., Tian, L., Li, Y., Zhang, X., Qi, Y., Jing, Z., *et al.* 2021. High prevalence of extrapulmonary tuberculosis in dairy farms: Evidence for possible gastrointestinal transmission. *Plos One.* 16(3): e0249341. DOI: 10.1371/journal.pone.0249341.
- 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 (11): 2085–2094. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.11.034.
- Zendejas, MH., Milián, SF., Cuador, GJ., Cruz, BG., Anaya, EA., Huitrón, MG. & García, CL. 2007. Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico. *Vet Ital.* 43 (3): 629-634.

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(3): 318–326. DOI: 10.1016/j.ejpb.2006.11.028.

CAPÍTULO XI

Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model.

Yesenia Guadalupe Contreras-Magallanes, Marina Durán-Aguilar, Susana L. Sosa-Gallegos, Ángel H. Álvarez, Fátima A. Andrade-Santillán, Isabel Bárcenas-Reyes, Sara González-Ruíz, Elba Rodríguez-Hernández, Germinal J. Cantó-Alarcón and Feliciano Milián-Suazo.

Animals. 2021; 11: 1046

DOI: 10.3390/ani11041046



Article

Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model

Yesenia Guadalupe Contreras-Magallanes ¹, Marina Durán-Aguilar ², Susana L. Sosa-Gallegos ², Ángel H. Álvarez ³, Fátima A. Andrade-Santillán ⁴, Isabel Bárcenas-Reyes ², Sara González-Ruiz ², Elba Rodríguez-Hernández ⁵, Germinal J. Cantó-Alarcón ² and Feliciano Milián-Suazo ^{2,*}

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76230 Querétaro, Mexico; yesconmag@hotmail.com

² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76239 Querétaro, Mexico; marina.duran@uaq.mx (M.D.-A.); susana.lucia.sosa@uaq.mx (S.L.S.-G.); isabel.barcenas@uaq.mx (I.B.-R.); sara.gonzalez@uaq.mx (S.G.-R.); gcanto07@uaq.mx (G.J.C.-A.)

³ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, 44270 Guadalajara, Mexico; aalvarez@ciatej.mx

⁴ Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76230 Querétaro, Mexico; a.andrades7@yahoo.com

⁵ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, SAGARPA, Km. 1 Carretera a Colón, Ajuchitlan, 76280 Colón, Mexico; rohe577@hotmail.com

* Correspondence: feliciano.milian@uaq.mx; Tel.: +52-442-190-1200 (ext. 5384)



Citation: Contreras-Magallanes, Y.G.; Durán-Aguilar, M.; Sosa-Gallegos, S.L.; Álvarez, A.H.; Andrade-Santillán, F.A.; Bárcenas-Reyes, I.; González-Ruiz, S.; Rodríguez-Hernández, E.; Cantó-Alarcón, G.J.; Milián-Suazo, F. Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model. *Animals* **2021**, *11*, 1046. <https://doi.org/10.3390/ani11041046>

Received: 19 February 2021

Accepted: 2 April 2021

Published: 8 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Bovine tuberculosis is a disease that affects cattle and other animal species worldwide and represents a risk to public health. Even though there is a vaccine that has been used to control tuberculosis in humans for almost 100 years, up to now, it has not been used in animals. The reason is that vaccination interferes with the tuberculin test, the current test to diagnose tuberculosis in the field, and shows an inconsistent efficacy in animals. Recent studies report that prime vaccinating with BCG and boosting with proteins vaccinations perform better. In addition, there are reports that some polymers increase the immune response against various infectious diseases; therefore, testing a vaccine formula with polymers sounds like a wise thing to do. In this study, we showed that priming with BCG and boosting with a culture filtrate protein, alone or in combination with a polymer, 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, are significantly reduced. Our results mean that a vaccination used as a complement of actual tuberculosis control programs in animal populations can be useful to reduce tuberculosis dissemination.

Abstract: Attempts to improve the immune response and efficacy of vaccines against tuberculosis in cattle, goats, and other animal species have been the focus of research in this field during the last two decades. 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 and PolyLactic-co-Glycolic Acid (PLGA) 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 and PolyLactic-co-Glycolic Acid (PLGA), 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 the blood compared to the control, nonvaccinated group after vaccination, after boosting, and after the challenge with the wild-type *Mycobacterium bovis* strain.

Keywords: *Mycobacterium bovis*; BCG vaccine; chitosan; poly (lactic-co-glycolic acid); cattle; goats

1. Introduction

Bovine Tuberculosis (bTB) remains a serious problem for livestock worldwide, especially in developing countries, where the strategy of “test-and-slaughter” is not economically viable [1–4]. The prevalence of bTB in dairy cattle in not developed countries is especially high; therefore, the testing and disposing of cattle would represent high costs to the dairy industry, rendering this practice unfeasible. Lately, one of the alternatives recommended for reducing the prevalence of this disease in animals has been the use of the vaccine BCG, alone or in combination with specific proteins [5–7]. BCG has been used in humans for nearly a century; however, it has not been used in cattle to date [8,9]. For the last 20 years, the vaccination has been evaluated experimentally in different animal species. It has been tested in cattle [8,10–16] and, also, in whitetail deer [17], badgers [18], brushtail possums [19,20], and goats [21–26].

Experimental studies to evaluate the vaccine’s efficacy against TB in cattle are expensive and require complex premises to maintain and handle the experimental animals. Testing in goats is less expensive and has been considered as an alternative model for testing prototype vaccines against TB in humans and animals [27,28]. It has been shown that goats develop TB lesions similar to those observed in cattle and humans [28,29]. Since goats are also ruminants, the immune response is expected to be similar to that observed in cattle. Implementing vaccine strategies in current TB control programs in countries where “test-and-slaughter” is not feasible is the wheel that moves research to improve the efficacy of BCG, the only authorized vaccine currently used in humans.

Studies in cattle have shown that the vaccination reduces transmission by decreasing the number of animals with lesions, the number of lesions per animal, the size of the lesions, and tissue bacillary loads [7,8,30]. It has been reported that protection is better when calves are vaccinated early after birth compared to at two–four weeks of age with 10^5 – 10^6 (Colony-Forming Units) (CFU), with a possible revaccination between one and two years to maintain the appropriate levels of immunity. No differences in the efficacy have been observed between the Danish and the Pasteur strains, the most frequently used vaccines in the world. The vaccine is safe, but while it does not exacerbate the infection, it also does not cure it [8,10–15], and the vaccination of pregnant cows does not represent a risk for abortion [16]. Boosting with culture filtrate protein (CFP) increases the immune response and protection against pathological damage [8,16,31].

Therefore, prime BCG vaccination with a CFP boost is currently being considered in many countries as a complement to existing control programs to reduce the incidence of bTB [32]. Finding the means to increase the vaccine efficacy by improving and sustaining, the protective immune response for longer periods [33] has been a goal of many research protocols. The idea is to increase the interaction of the antigen with the immune cells, for example, by encapsulating and releasing antigens to modulate the host immune response [34]. There is sufficient evidence that the combination of adjuvants with BCG enhances the BCG immunogenicity and protection against TB. Different elements such as Rapamycin, Lactoferrin, and the agonists of Toll-Like Receptor (TLR) 7 and 9 increase the immune response to BCG, activating CD4+ and CD8+ T cells to increase protection in mice [35,36]. Some reports have shown that nanocoating BCG with polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) and chitosan increase the cell-mediated immunity with no effect in the vaccine viability in vitro [33]. Polymers have low toxicity, are easy to obtain, and are highly biodegradable. They are also good antibacterial agents, with a positive effect on the treatment of TB [37,38]. Biodegradable polymers such as chitosan and PolyLactic-co-Glycolic Acid (PLGA) have been used as vaccine adjuvants to stimulate the immune system and as carriers for vaccine delivery [39].

Chitosan is a cationic polysaccharide comprising copolymers of glucosamine and N-acetylglucosamine obtained from exoskeletons of crustaceans, yeast, and fungi [40]. It is insoluble in alkaline and neutral pH but forms salts with inorganic and organic acids and is available in a range of molecular weights. Chitosan salts bind strongly to negatively charged materials such as cell surfaces and mucus. It is bio-adhesive and significantly increases the half-life clearance of antigens [41], where adjuvants enhance the uptake of antigens by macrophages [42] and induce the production of cytokines such as interleukin and interferon. There is evidence that TB vaccines with chitosan induce strong protective and cell-mediated CD4+ and CD8+ immune responses in animal models and, when employed as a booster, enhance the protection against TB infection in mice [42–45]. Chitosan solutions create an antigen depot, and more than 60% of a protein antigen delivered in chitosan remains at the injection site for seven days [45].

PLGA is a synthetic polyester that degrades into lactic and glycolic acids. PLGA stimulates both humoral and cellular immune responses [46,47]. The use of antigens and adjuvants in a formulation of slow-release particles increases the vaccine efficacy by enhancing the availability of antigen-to-antigen-presenting cells [48]. It is a potent inducer of TH1, which is associated with protection against TB infection, and TH17 responses [48–51]. PLGA-covered antigens quickly escape from the endolysosomes and are transported to the cytoplasm, preventing the lysosomal degradation of null fragments, enhancing, in this manner, the protective efficacy of the vaccine [44,52].

Vaccine experiments in cattle have demonstrated that low doses of BCG, 10^3 – 10^6 CFU, induce a greater protection than higher doses [53], that pre-exposure to environmental *Mycobacterium* can negatively affect the vaccine efficacy [54], and that the vaccination of neonatal calves induce higher levels of immunity than those observed in calves vaccinated at five to six months of age [6,8,13,55]. As in cattle, trials have revealed that goats vaccinated with BCG or other experimental TB vaccines have a significant higher interferon-gamma release, fewer lesions, and lower bacterial culture loads than those unvaccinated [25,26,56,57]. Therefore, the purpose of this study was to evaluate different BCG vaccine formulations using the BCG prime vaccination, alone or chitosan-coated, and CFP boosting, alone or combined with chitosan and PLGA, in a goat model.

2. Materials and Methods

Experimental animals. Thirty-five, 3 to 5 months of age Alpine-Nubia breed goats deriving from a TB-free area were included in the study. The animals were randomly assigned to five experimental groups of seven animals each. Animals were then placed in experimental units especially designed for this purpose, with enough space and shade and food and water at libitum. Two animals died 1 week after the experiment started due to diarrhea caused by a coccidian. At that time, all animals were treated with Baycox® (Bayer) at a dose of 20 mg/kg. One animal from the control group died 1 week prior to slaughter; in a necropsy, numerous lesions compatible with TB were observed in the lungs. All animals tested negative for paratuberculosis in an ID screen® diagnostic kit for the serum and plasma samples (LABGENE Scientific SA, Châtel-Saint-Denis, Switzerland). An experienced goat caretaker oversaw the monitoring and feeding of the animals on a daily basis. Experienced veterinarians from our working group performed the handling, tuberculin testing, and sampling of the experimental animals. All animals were confirmed negative to TB by the tuberculin caudal-fold and by the Interferon- γ (IFN- γ) assay (Bovigam, Prionics AG, Zurich, Switzerland) tests.

BCG vaccine strain. The Phipps strain (American Type Culture Collection (ATCC®) 35744™) was selected based on the results from a previous study in which it was the most efficient in providing protection against pathologic damage after a challenge in mice where 10 BCG daughter strains were compared [58]. The strain was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Briefly, reactivation of the BCG was performed as follows: 300 mL of culture medium containing 1.41 g of Middlebrook 7H9 base medium (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and 1.32 g of sodium pyruvate (Golden Bell,

crystals 110.05) in 270 mL of distilled water with 0.6 mL of glycerol. This was autoclaved at 121 °C for 10 min. After sterilization, it could cool to 50–55 °C, and then, 30 mL of ADC (BD BBL Enrichment for Middlebrook) was added in a laminar flow hood. This medium was incubated at 37 °C for 48 h to verify sterility. After that, the original bacterial pellet containing the *Mycobacterium bovis* BCG Phipps strain was added, and this incubated at 37 °C for 6 weeks. Subsequently, this was passed to a Stonebrink and Lowenstein Jensen medium and incubated at 37 °C until growth occurred at 6 weeks.

BCG Phipps *M. bovis* growth. The vaccine strain was grown in enriched culture Middlebrook medium 7H9 broth + ADC + 20% Tween 80. A total of 1000 mL of culture medium was prepared with 4.7 g of Middlebrook 7H9 base medium (Difco™) and 900 mL of distilled water with 2.5 mL of 20% Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). This was then placed in a flask and autoclaved at 121 °C for 10 min. Once sterilized, it was allowed to cool to 50–55 °C, and then, 100 mL of ADC was added with a 0.2-µm Nalgene syringe filter in a laminar flow hood. The medium was incubated at 37 °C for 48 h to check for sterility. Then, several *M. bovis* colonies from the Stonebrink and Lowenstein-Jensen reactivation culture media were taken, passed into these media, and incubated at 37 °C for 4 weeks. Then, 1000 mL of culture medium was prepared to contain 4.7 g of the Middlebrook 7H9 based medium (Difco™) in 900 mL of distilled water with 2 mL of glycerol and was placed into four 250-mL flasks and autoclaved at 121 °C for 10 min. Once sterilized, this could cool to 50–55 °C, and then, 100 mL of ADC sterilized by a 0.2-µm Nalgene syringe filter in a laminar flow hood was added. This medium was incubated at 37 °C for 48 h to verify the sterility. At about 4 weeks, the colony growth was observed. These cultures were then centrifuged (20 min × 1008 g) and added to a (SPGA) solution at a 1:1 concentration with sterile PBS for bacterial separation with a 23-G needle. Bacterial count and dose preparations were performed and maintained at –70 °C until their use.

BCG chitosan coating. The chitosan suspension was prepared at a 0.001% concentration, where 500 mg of low molecular weight chitosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 4.5 g of sodium chloride (NaCl) were added to 500 mL of water with 5 mL of acetic acid at pH 6. A BCG Middlebrook 7H9 culture medium was used for BCG chitosan coating. It was first centrifuged (10 min × 1008 g); then, the pellet was washed twice with 0.9% NaCl and sonicated in a water bath for 10 min to separate the clumped bacteria. The suspension obtained was passed 10 times through a 23-G needle to break up the bacterial clumps. During this step, the chitosan solution (0.5 mL/mL) was added and was maintained in an orbital shaker for 20 min. The new solution was washed twice with 0.9% NaCl and passed once more through a 23-G needle to separate the coated bacteria. This bacterial suspension was added to the Middlebrook 7H9 + ADC + glycerol culture medium and left in incubation for 4 weeks. To verify that chitosan is harmless for BCG bacilli in vitro, a bacterial viability test was performed by growing BCG and BCG chitosan coated in a Middlebrook 7H9 + ADC + glycerol medium. On day 31, 100-µL samples of the culture medium were obtained for electron microscopy scanning. BCG and BCG chitosan-coated suspensions were isolated in a Stonebrink solid medium by serial dilutions ranging from 10¹–10⁸ to obtain the CFU/mL. The cultures were incubated at 37 °C for 4 weeks with checks each week to verify the culture growth.

CFP production and CFP-PLGA coating. The field strain obtained from a cow's lymph node lesion was grown in Stonebrink solid medium. After 8 weeks, the colonies were harvested and placed on the wall of a flask wall of a Middlebrook 7H9 + ADC + glycerol medium. This culture was centrifuged for 10 min at 1008 g. The supernatant passed three times through a 0.2-µm Nalgene syringe filter and then transferred through a molecular weight filter (Millipore 4307 Centriprep YM-30, 30-kDa NMWL) to obtain a final volume of 60 mL. Protein quantification was performed with the Biuret reagent (MEYER TG1118618 Reagent) for a final CFP protein concentration of 1250 µg/µL.

Encapsulation of the CFP was performed with 1 mL of CFP in 3.7 mL of a 3% solution of Poly (D, L-lactide-co-glycolide) lactide:glycolide; PLGA) (75:25; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and chloroform, which was then stirred in a vortex for 1 min to form

the first emulsion. This emulsion was added with Poly (Vinyl Alcohol) (PVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, UA; 87–89% hydrolyzed) at 10% at a 1:1 ratio and maintained under magnetic stirring for 24 h. This was then stirred in a PowerLyzer (2800G with two cycles of 0.45 s and a rest of 0.30 s) and centrifuged for 10 min at 11,200 g. The supernatant was removed to quantify the nonencapsulated protein with a Biuret reagent. The pellet was washed three times with distilled water for 5 min at 11,200 g. Finally, it was suspended in sterile PBS. A sample of 100 µL was taken for electron microscopy scanning. The CFP booster formulations were prepared with 900 µL of CFP and 100 µL of adjuvant (Montanide™) and oil-based adjuvant composed of a natural metabolizable oil and a highly refined emulsifier from the manide monooleate family [59].

Vaccination, boosting, and challenge: Animals were allocated throughout a completely randomized experimental design into five experimental groups (Table 1). Vaccinated groups were inoculated subcutaneously on the right side of the neck with a dose of 1×10^3 CFU and the chitosan-coated BCG at 1×10^8 cells in a 2-mL diluent at week one. Boosted groups were inoculated subcutaneously 4 weeks after prime BCG vaccination with 720 µg/µL of CFP inoculated with the different boosting protocols. The vaccine dose was determined as lower to those reported in previous studies in goats to prevent premature deaths [25,26,56]. The adjuvant used was Montanide™ as 10% of the used formula. The challenge inoculum was prepared with a mid-log phase of a wild-type *Mycobacterium bovis* grown in Stonebrink + pyruvate culture medium. The challenge strain was collected from a cow's lymph nodes in 2010 in Mexico and was maintained in glycerol at -70 °C. Bacilli were pelleted by centrifugation at 750 g and washed twice with a Phosphate-Buffered Saline solution (PBS; 0.01 M, pH 7.2). This was then homogenized in PBS and shaken with glass beads continuously at 200 rpm for 1 h. The homogenate was sterile-filtered twice through a 40-µm syringe filter and diluted to the established doses (1×10^6 CFU) in 0.5 mL of PBS. Goat kids sedated with 0.25 mg/kg xylazine were challenged by direct inoculation into the trachea using a 3-mL (23G × 25 mm) syringe.

Table 1. Experimental groups to determine the efficacy of the BCG vaccine in different protocols of vaccination in a goat model. CFP: culture filtrate protein and PLGA: PolyLactic-co-Glycolic Acid.

Group Number	Priming Formulation	Boosting Formulation	Boosting Adjuvant
1	None	None	None
2	BCG	None	None
3	BCG	CFP	Montanide™
4	Chitosan-coated BCG	CFP + Chitosan + PLGA	Montanide™
5	Chitosan-coated BCG	CFP + Chitosan	Montanide™

Blood sampling and antigen stimulation. Blood samples for the IFN-γ release assay were collected every 2 to 3 weeks until the end of the experiment (Figure 1). Blood samples ($n = 13$) were collected from the jugular vein and placed in heparin tubes. Then, 750 µL of the whole blood of each animal was incubated on microplates in duplicate with 50 µL of each antigen; that is, bovine-purified protein derivative (PPD) and avian PPD. PBS was used as negative control for each animal tested and 50 µL of pokeweed mitogen of a 1-mg/mL concentration solution (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) as the positive control. Microplates were then incubated in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C for 20 h. Optical Densities (OD) of PBS from the control wells were employed to normalize individual readouts and to calculate the OD. The final OD readings were obtained by subtracting sample readings from the PBS control readings. The IFN-γ release in whole-blood cultures after 16 h in vitro were performed on a commercial bovine IFN-γ microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit (ELISA; Bovigam®; Prionics AG, USA).

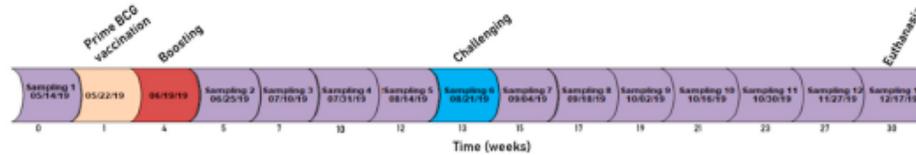


Figure 1. Dates of sampling, BCG prime vaccination, boosting, challenging, and euthanasia of vaccinated and nonvaccinated animals against tuberculosis in a goat model.

Slaughter and lesion scoring. About 6 months after the challenge, experimental animals were sent to slaughter for carcass inspection and lesion scoring and for tissue sampling collection for histopathological and microbiological analyses. The animals were euthanized by electro insensitization following NORMA Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 Guidelines, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres (Mexican Official Norm for the Humanitarian Slaughter of Domestic and Wildlife Animals). Criteria for animal scoring are presented in Table 2. Instead of counting or classifying individual lesions, the score for the whole animal was based on the magnitude of tissue damage in affected organs and the characteristics of the lesions. To determine the presence and magnitude of the lesions, all organs were carefully removed and sliced. Complete lymph nodes were removed; one-half of these was frozen for bacteriologic analysis, and the remaining half was placed in a 10% formalin buffer solution for histopathological analysis. In addition, about four square centimeters of the cranial lung's lobe from all animals were collected for bacteriological and histopathological analyses. In order to perform a careful inspection of the carcasses, the animals were slaughtered over a 2-week period, one animal randomly selected from each experimental group at the same time. Carcass inspection focused on the lymph nodes of the head (retropharyngeal), thorax (mediastinal and tracheobronchial), abdomen (mesenteric), lungs, and liver; examples of score values for the lesions are found in Figure 2. At slaughter, the number and the treatment group of the animals were blinded to the veterinarian who scored the lesions.

Statistical analysis. The average IFN- γ concentration (OD raw data) per experimental group for each sampling period was compared with a one-way Analysis of Variance (ANOVA) test. The average lesion scores per group were compared with the H statistic in the Kruskal-Wallis test. A p -value of ≤ 0.05 was considered significant. A relation between the number of lesions and the animal lesion scores was determined with Spearman's correlation coefficient. All statistical analyses were performed with SPSS version 22 statistical software.

Table 2. Definition of lesion scores in the carcass inspections at slaughter of goats vaccinated against tuberculosis (TB) with different BCG vaccine protocols and challenged with a wild-type strain of *Mycobacterium bovis*.

Score	Score Definition
0	No visible lesions
1–1.9	Few lesions (≤ 20) in lung or lymph nodes
2–2.9	Few lesions (≤ 20) in lung and lymph nodes
3–3.9	Between 21 and 50 lesions in lung or lymph nodes
4–4.9	Between 21 and 50 lesions in lung and lymph nodes
5–5.9	Multiple lesions (between 51 and 100) localized in lung or lymph nodes
6–6.9	Multiple lesions (between 51 and 100) localized in lung and lymph nodes
7–7.9	Multiple lesions (≥ 101) disseminated in lung or lymph nodes
≥ 8	Multiple lesions (≥ 101) disseminated in lung and lymph nodes.

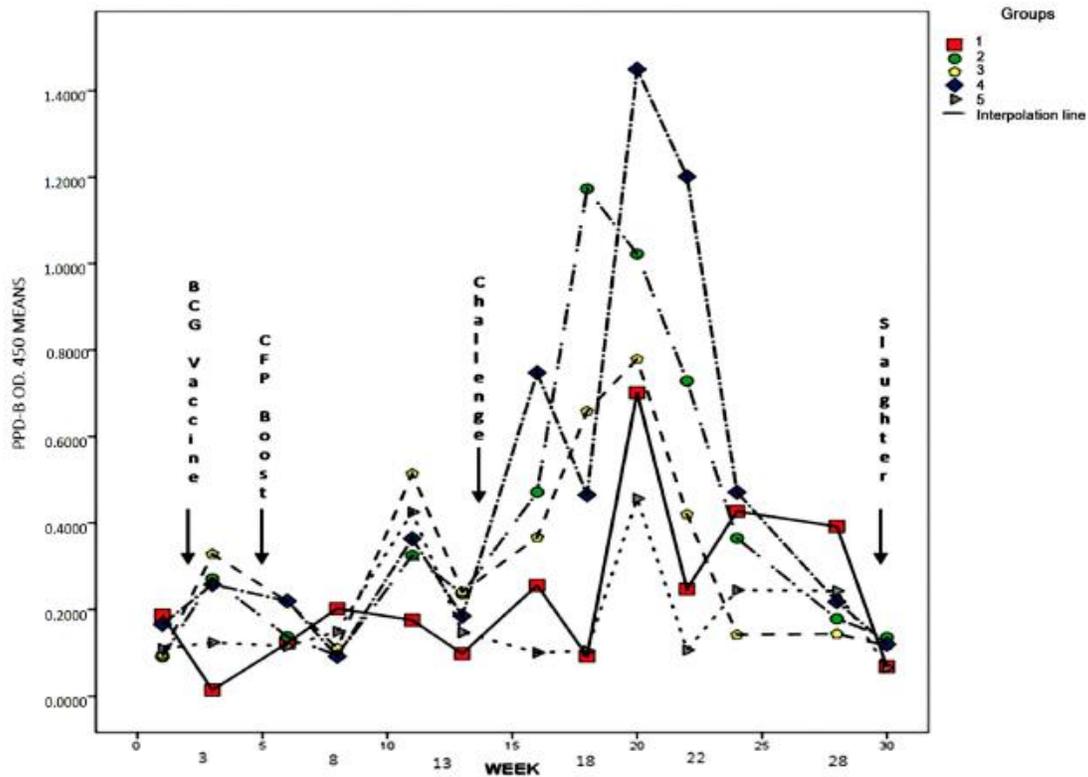


Figure 2. Antigen-specific Interferon gamma (IFN- γ) response in goats after vaccination, boosting, and challenging with a *Mycobacterium bovis* wild-type strain. The purified protein derivative (PPD) bovis was used in the stimulation of whole blood in vitro. IFN- γ release values per group are expressed as the mean Optical Densities (OD 450 nm).

3. Results

With the exception of some sneezing associated with powder derived from the food provided (a combination of ground forage, alfalfa, and corn), no clinical sign suggestive of TB was observed in the experimental animals. All animals, including those with high scores of lesions at postmortem, had a good body condition and life behavior. At slaughter, only one animal exhibited a subcutaneous TB lesion at the vaccine injection site, suggesting that the inoculation method worked well.

3.1. IFN- γ

The mean IFN- γ release, and the ANOVA p -value for the comparison of groups at each sampling week, measured as 450-nm optical density (OD) in an ELISA test, are depicted in Table 3. There was no significant difference between the experimental groups at sampling weeks one, three, and six ($p > 0.05$), even though group 1 had a lower IFN- γ release than the vaccinated groups, groups 2–5. Nor was there any significant difference between the groups at the end of the experiment at weeks 24, 28, and 30 ($p > 0.05$), when the IFN- γ release returned to the baseline levels. In general, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the vaccinated and the control groups at sampling weeks 8–22, except for certain weeks during which the difference was variable, and there was no significant difference between some of the vaccinated groups and the control (Table 3). The peak IFN- γ release was reached at week 20 in all of the experimental groups. Five weeks after the challenge, groups 5, 4, 2, and 3, in descending order, had the best IFN- γ responses, and

the controls exhibited lower IFN- γ responses. All groups returned to the baseline levels at week 30 (Figure 2).

Table 3. Average, standard deviation, and 95% confidence intervals for the means of IFN- γ release for all experimental groups of goats vaccinated and challenged with a wild-type *Mycobacterium bovis* strain at each sampling week.

Sampling Week	Experimental Group	Mean * IFN- γ Release (OD 450 nm)	Standard Deviation	95% CI	p-Value	
1	Prime BCG vaccination	1	0.1866 ^a	0.2419	−0.0672; 0.4405	0.713
		2	0.0914 ^a	0.0164	0.0762; 0.1066	
		3	0.0970 ^a	0.0366	0.0361; 0.1308	
		4	0.1661 ^a	0.2277	−0.0440; 0.3767	
		5	0.1101 ^a	0.0751	0.0313; 0.1890	
3	Groups 3–5 boosting	1	0.01453 ^a	0.0350	0.1085; 0.1821	0.25
		2	0.2711 ^a	0.0350	−0.0340; 0.5763	
		3	0.3282 ^a	0.1801	0.1616; 0.4949	
		4	0.2578 ^a	0.1251	0.1421; 0.3736	
		5	0.1245 ^a	0.0331	0.0897; 0.1592	
6	All groups challenging	1	0.1235 ^a	0.0367	0.0849; 0.1620	0.357
		2	0.1377 ^a	0.0772	0.0662; 0.2091	
		3	0.2185 ^a	0.1406	0.0884; 0.3486	
		4	0.2197 ^a	0.2122	0.0233; 0.460	
		5	0.1158 ^a	0.0275	0.0869; 0.1447	
8		1	0.2021 ^b	0.0180	0.1831; 0.2211	0.0001
		2	0.0947 ^a	0.0106	0.0849; 0.1044	
		3	0.1114 ^a	0.0352	0.0788; 0.1440	
		4	0.0925 ^a	0.0366	0.0586; 0.1264	
		5	0.1495 ^{a,b}	0.0663	0.0798; 0.2191	
11		1	0.1755 ^a	0.0436	0.1296; 0.2213	0.05
		2	0.3252 ^{a,b}	0.0759	0.2550; 0.3954	
		3	0.5140 ^b	0.1366	0.3877; 0.6402	
		4	0.3640 ^{a,b}	0.2260	0.1750; 0.5529	
		5	0.4252 ^{a,b}	0.3734	−0.0385; 0.8889	
13		1	0.0988 ^a	0.0204	0.0773; 0.1203	0.049
		2	0.2364 ^a	0.1450	0.1022; 0.3705	
		3	0.2405 ^a	0.0820	0.1647; 0.3164	
		4	0.1848 ^a	0.1010	0.0914; 0.2783	
		5	0.1475 ^a	0.0401	0.1053; 0.1896	
16		1	0.2556 ^a	0.1852	0.0612; 0.4501	0.002
		2	0.4712 ^{a,b}	0.2387	0.2504; 0.6921	
		3	0.3667 ^{a,b}	0.2463	0.1389; 0.5945	
		4	0.7475 ^b	0.4321	0.3478; 1.1472	
		5	0.1013 ^a	0.04951	0.0493; 0.1532	
18		1	0.0933 ^a	0.0205	0.0717; 0.1149	0.002
		2	1.1730 ^b	0.8178	0.4166; 1.9293	
		3	0.6585 ^{a,b}	0.4943	0.2014; 1.1157	
		4	0.4650 ^{a,b}	0.3746	0.1184; 0.8115	
		5	0.1053 ^a	0.0307	0.0730; 0.1375	
20		1	0.7015 ^{a,b}	0.2699	0.4181; 0.9848	0.050
		2	1.022 ^{a,b}	0.6780	0.3949; 1.6490	
		3	0.7787 ^{a,b}	0.5017	0.3146; 1.2427	
		4	1.4491 ^{b,c}	0.8747	0.6401; 2.2581	
		5	0.4566 ^{a,b}	0.3581	0.0807; 0.8325	

Table 3. Cont.

Sampling Week	Experimental Group	Mean * IFN- γ Release (OD 450 nm)	Standard Deviation	95% CI	p-Value
22	1	0.2473 ^a	0.1335	0.1072; 0.3874	0.001
	2	0.7285 ^{a,b}	0.5109	0.2560; 1.2011	
	3	0.4198 ^{a,b}	0.3974	0.0522; 0.7874	
	4	1.2011 ^b	0.7193	0.5357; 1.8665	
	5	0.1071 ^a	0.0343	0.0711; 0.1432	
24	1	0.4270 ^a	0.2106	0.2059; 0.6480	0.137
	2	0.3648 ^a	0.2789	0.1068; 0.6228	
	3	0.1421 ^a	0.0583	0.0881; 0.1960	
	4	0.4712 ^a	0.4152	0.0872; 0.8553	
	5	0.2450 ^a	0.1186	0.1204; 0.3695	
28	1	0.3918 ^a	0.3512	0.0232; 0.7604	0.158
	2	0.1785 ^a	0.0802	0.1043; 0.2528	
	3	0.1441 ^a	0.0780	0.0719; 0.2163	
	4	0.2178 ^a	0.1717	0.0590; 0.3676	
	5	0.2430 ^a	0.0725	0.1668; 0.3191	
30 Euthanasia	1	0.0688 ^a	0.0138	0.0542; 0.0833	0.180
	2	0.1361 ^a	0.0556	0.0847; 0.1875	
	3	0.1174 ^a	0.0529	0.0684; 0.1663	
	4	0.1205 ^a	0.0498	0.0744; 0.1667	
	5	0.0665 ^a	0.0079	0.0581; 0.0748	

* Means with similar literals are not statistically different in an honest significant difference (HSD) Tukey's test ($p > 0.05$). ^a, ^b and ^c: Similar superscript letters indicate not-statistical significant difference between means ($p > 0.05$)

3.2. Lesions in the Animals

The number and the proportion of animals with lesions and the average score of the lesions per experimental group are listed in Table 4. All animals in group 1, and six of the seven animals in group 2, had lesions at slaughter. Only two of seven animals from groups 3 and 4 had lesions. Group 5 had four out of six animals with lesions. A significant difference ($p < 0.05$) was observed between groups 3 and 4 compared with groups 1 and 2. This result shows that groups 3 and 4 perform better than the rest of the groups in protecting against the development of lesions of TB.

Table 4. Number and percentage of animals with visible lesions, average, standard deviation, and 95% confidence intervals for lesion scores after vaccination against TB and challenged with a wild-type strain in a goat model.

Experimental Group	Animals with Lesion */Animals Challenged (%)	Average Lesion Score **	95% CI
1	6/6 (100)	6.33 ^b \pm 3.2	2.97; 9.69
2	6/7 (86)	3.00 ^{ab} \pm 2.2	0.98; 5.01
3	2/7 (28)	1.07 ^a \pm 2.2	-1.00; 3.14
4	2/7 (28)	1.43 ^a \pm 3.2	-1.51; 4.35
5	4/6 (67)	1.75 ^a \pm 1.5	0.20; 3.29

* Lesions in lungs and/or lymph nodes (retropharyngeal, tracheobronchial, mediastinal, and mesenteric). ** Average lesion scores with similar literals are not statistically different in an HSD Tukey's test ($p > 0.05$). ^a and ^b: Similar superscript letters indicate not-statistical significant difference between means ($p > 0.05$).

The mean lesion scores for all experimental groups are also to be found in Table 4, and examples of the specific lesion scores are illustrated in Figure 3. No significant differences were observed for the lesions' average scores between group 1 (6.3 ± 3.2) and the BCG-alone vaccinated group (3.0 ± 2.2) in a post-hoc Tukey's test. In addition, no significant difference was observed either among all of the vaccinated groups, 2–5 ($p > 0.05$). Average lesion scores for groups 3–5 (1.1 ± 2.2 , 1.4 ± 3.2 , and 1.7 ± 1.5 , respectively) were considerably lower than that in group 2, the BCG-alone vaccinated group. This result shows that

the polymers chitosan and PLGA in the vaccine formula made no significant differences compared to that shown by the BCG prime-vaccinated and CFP-boosted formula (group 3).

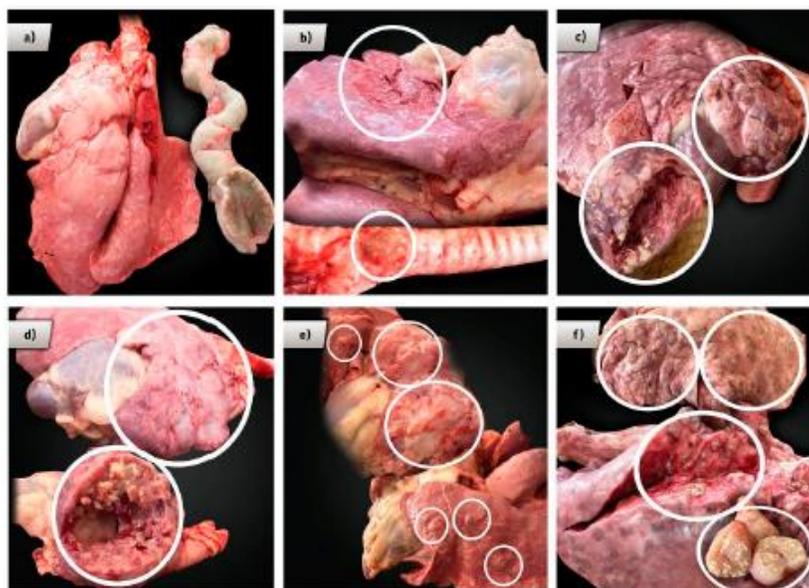


Figure 3. Illustration of the score values in experimental animals vaccinated against tuberculosis (TB) with different vaccine protocols and challenged with a *Mycobacterium bovis* wild-type strain. (a) Score 0, no visible lesions, (b) Score 2, small focal purulent tuberculous lesion in the lung's cranial lobe, (c) Score 4, medium-sized purulent tuberculous lesion in the lung's cranial lobe, (d) Score 6, large purulent tuberculous lesion in pulmonary cranial lobe, (e) Score 8, multiple small focal tuberculous lesions in lungs, and a medium-size purulent lesion in the cranial lobe, and (f) Score 10, multiple small tuberculous lesions covering the lungs and large lesions in the pulmonary cranial lobe and the lymph nodes.

One important issue in TB vaccine testing in animals lies in the identification of surrogates for vaccine efficacy. To date, the best option is the determination of IFN- γ in the blood [16,60]; the concentration of IFN- γ is associated with the development of lesions in infected animals. In this study, no significant relationship ($r = -0.250$; $p = 0.16$) was found between the blood-IFN- γ concentration in the week prior to the challenge and the presence of a lesion at slaughter (Figure 4).

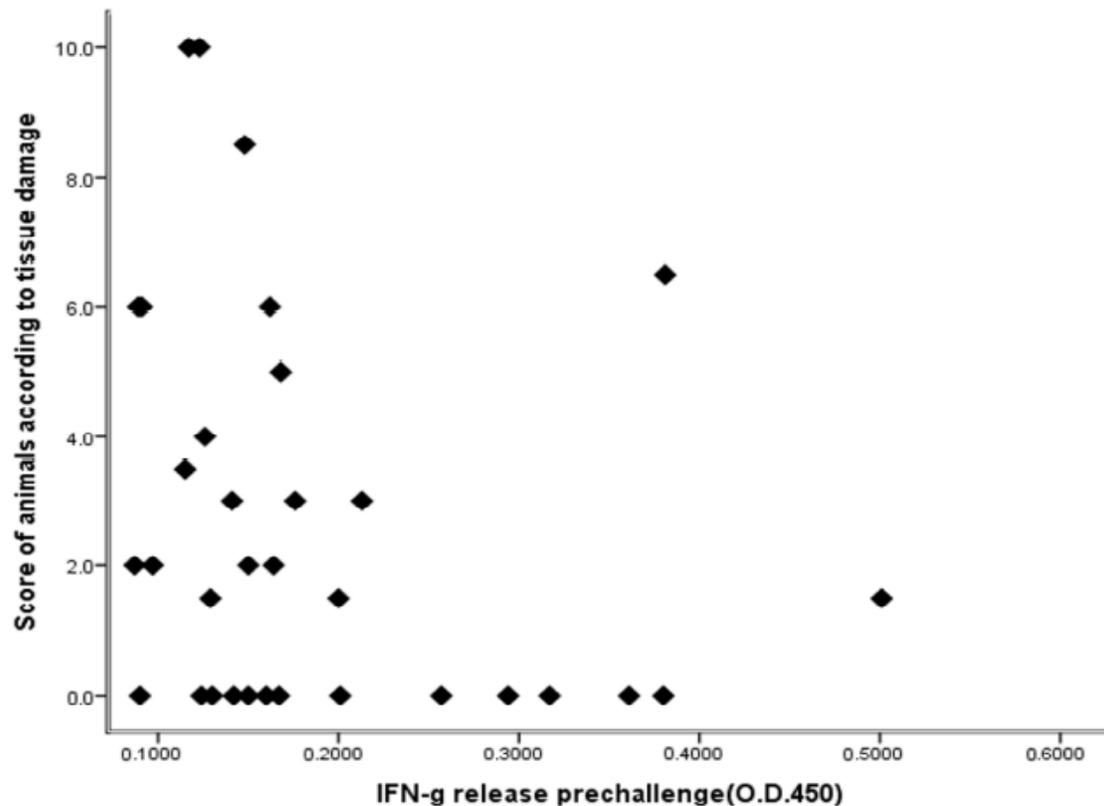


Figure 4. Relationship between the blood IFN- γ release 1 week prior to challenge and the lesion scores of the experimental animals vaccinated against TB with a BCG strain and challenged with a *Mycobacterium bovis* wild-type strain.

4. Discussion

The experimental efficacy of BCG to reduce the pathological damage in vaccinated animals against tuberculosis in cattle and other animal species has shown some variations [10,11,19,53,61,62]: factors such as the vaccine strain, doses, and route of inoculation [63] play a role. In this study, we used the Phipps strain, because it showed better protection than other BCG strains in a mice model [58]. However, most studies have used the Pasteur or the Danish strains and found no differences in the protection [12,14,15,64]. Concerning the vaccine dose (1×10^3 CFU for BCG alone and 1×10^2 CFU BCG chitosan-coated), which was somewhat lower than that utilized in other studies [22,23,25], was to prevent the sudden death of the animals and have the opportunity to evaluate how long the immunity lasted in the vaccinated animals. Based on the high level of pathological damage observed in the control group, this dose is adequate for experimental studies in goats and for preventing the development of tuberculous lesions in vaccinated animals.

Different routes of inoculation have been used to test the vaccine efficacy [17,55]. In this experiment, we utilized the subcutaneous (sc) route, because, as others proposed, we believe that would be the most practical route if a massive vaccination of cattle were to be approved [11,61]. Previous studies have reported the role of boosting in the immune response to vaccination [10,11,65–69]. Our results agree with those reports: all of the

boosted groups demonstrated a better performance in lesion scores than the BCG-alone vaccinated group. It is interesting that group 3, which was primed with BCG and boosted with CFP plus an adjuvant with no polymers added, exhibited the best performance in preventing pathological damage, suggesting that this protocol is sufficient to reduce disease and, in consequence, TB dissemination. This result agrees with the previous findings reported by our group in experiments with cattle [8].

A significant difference in the lesion scores' average was observed between group 1; the control group; and the vaccinated boosted groups (groups 3, 4 and 5; Table 4). This difference could have been greater; one animal in the control group showed a large tuberculous lesion at the challenge site, suggesting that the inoculum were injected out of the trachea, possibly reducing this difference. Thus, the animal showed few lesions in the lungs and lymph nodes at slaughter. None of the remaining animals demonstrated a lesion as large as this at the challenge application site. IFN- γ production has been employed as a surrogate for vaccine efficacy [10,70–72]; however, there is a trend that animals with high IFN- γ release have less lesions [73–75]. In this study, we found that the correlation between IFN- γ release and the lesion score was not significant ($r = -0.250$; $p = 0.16$, Figure 4); contrary to the findings by our group working with cattle [8], where this relationship was significant ($p < 0.05$).

No statistical difference in the lesion scores' average was observed among groups 2–5, the vaccinated groups (Table 4). However, group 2, that vaccinated with BCG alone, was not statistically different from group 1, while in groups 3–5, the boosted groups were statistically different. This result agrees with previous reports in which it was shown that boosting significantly increases the protection against the pathological damage of TB [8,10,70–72]. It was surprising that, about 15 weeks after the challenge, animals in the control group with large pathological damage in the lungs and lymph nodes and lesion scores of 10 at euthanasia showed no signs of TB and had similar life behaviors to those of the vaccinated animals. In some countries, there is a popular belief that goats are naturally resistant to TB; however, there is no scientific evidence that supports this hypothesis.

Our results show that vaccination protocols with BCG and boosting with proteins has the potential to reduce the dissemination of TB in animal populations by reducing the pathological damage in those vaccinated. This supports the hypothesis that vaccinations, incorporated into the current control programs, could be useful to accelerate the elimination of this disease in infected herds. Our working group is now prepared to go to the next step, large-scale field trials in commercial herds.

5. Conclusions

This study shows that BCG vaccine priming with CFP + MontanideTM boost or chitosan-coated BCG priming with CFP + Montanide boost + PGLA reduces the pathological damage in vaccinated, compared to not vaccinated, goats. These findings can potentially be extended to other animal species.

Author Contributions: Conceptualization, E.R.-H.; methodology, Y.G.C.-M. and S.L.S.-G.; validation, Y.G.C.-M., Á.H.Á. and S.L.S.-G.; formal analysis, M.D.-A. and I.B.-R.; investigation, Y.G.C.-M. and S.L.S.-G.; resources, F.M.-S.; data curation, F.A.A.-S. and S.G.-R.; writing—original draft preparation, Y.G.C.-M. and F.M.-S.; writing—review and editing, F.M.-S., E.R.-H., S.L.S.-G. and G.J.C.-A.; visualization, G.J.C.-A.; supervision, F.M.-S.; project administration, F.M.-S.; and funding acquisition, F.M.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by CONACYT, grant number FON.INST./239/2018.

Institutional Review Board Statement: The study was carried out in strict accordance with the recommendations from the Guide for the Care and Use of Animals of the Autonomous University of Querétaro, Mexico. The Ethics Committee of Animal Experiments of the Autonomous University of Querétaro approved the protocol (Protocol Number: 20FCN2019). Every effort was always made to minimize animal suffering.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Luis Bojórquez-Narváez from AVILAB, México for his assistance in the vaccine elaboration, M.V.Z. Orlando F. Chávez-Moreno from FCN-UAQ for his assistance in the challenge delivery, and M.C. Alejandro E Vázquez from FCN-UAQ for his assistance in the slaughter and lesion scoring of the experimental animals.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Buddle, B.M. Vaccination of cattle against *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* **2001**, *81*, 125–132. [CrossRef] [PubMed]
- Waters, W.R.; Palmer, M.V.; Buddle, B.M.; Vordermeier, H.M. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* **2012**, *30*, 2611–2622. [CrossRef]
- OIE. 2018. Available online: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/bovine-tuberculosis/> (accessed on 8 February 2021).
- Chandran, A.; Williams, K.; Mendum, T.; Stewart, G.; Clark, S.; Zadi, S.; Lanni, F.; McLeod, N.; Williams, A.; Villarreal-Ramos, B.; et al. Development of a diagnostic compatible BCG vaccine against Bovine tuberculosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17791. [CrossRef] [PubMed]
- Griffin, J.F. Veterinary tuberculosis vaccine development. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *3*, S223–S228. [CrossRef] [PubMed]
- Buddle, B.M.; Pollock, J.M.; Skinner, M.A.; Wedlock, D.N. Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens. *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 555–566. [CrossRef]
- Vordermeier, H.M.; Jones, G.J.; Buddle, B.M.; Hewinson, R.G.; Villarreal-Ramos, B. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 87–109. [CrossRef]
- Alarcon, G.J.C.; Venegas, Y.R.; Narváez, L.B.; Martínez, O.E.P.; Casanova, L.G.; Gallegos, S.S.; Vargas, A.N.; Ramírez, A.M.O.; Suazo, F.M. Efficacy of a vaccine formula against tuberculosis in cattle. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76418.
- Buddle, B.M. Tuberculosis vaccines for cattle: The way forward. *Expert Rev. Vaccines* **2010**, *9*, 1121–1124. [CrossRef] [PubMed]
- Buddle, B. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* **1995**, *13*, 1123–1130. [CrossRef]
- Buddle, B.M.; Parlane, N.A.; Keen, D.L.; Aldwell, F.E.; Pollock, J.M.; Lightbody, K.; Andersen, P. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated and *M. bovis*-Infected Cattle by Using Recombinant Mycobacterial Antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1999**, *6*, 1–5. [CrossRef]
- Ameni, G.; Tibbo, M. Kinetics of Interferon- γ (IFN- γ) Release in the Peripheral Blood of Calves Vaccinated with BCG. *J. Immunoass. Immunochem.* **2002**, *23*, 245–253. [CrossRef]
- Hope, J.C.; Thom, M.L.; Villarreal-Ramos, B.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Howard, C.J. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *139*, 48–56. [CrossRef]
- Cai, H.; Yu, D.H.; Hu, X.D.; Li, S.X.; Zhu, Y.X. A Combined DNA Vaccine-Prime, BCG-Boost Strategy Results in Better Protection Against *Mycobacterium bovis* Challenge. *DNA Cell Biol.* **2006**, *25*, 438–447. [CrossRef] [PubMed]
- Wedlock, D.N.; Denis, M.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Buddle, B.M. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2007**, *118*, 50–58. [CrossRef] [PubMed]
- Milián-Suazo, E.; Gutiérrez-Pabello, J.A.; Bojórquez-Narváez, L.; Anaya-Escalera, A.M.; Cantó-Alarcón, G.J.; González-Enriquez, J.L.; Campos-Guillén, J. IFN- γ response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *90*, 419–424. [CrossRef]
- Palmer, M.V.; Thacker, T.C.; Waters, W.R. Vaccination of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Vaccine* **2007**, *25*, 6589–6597. [CrossRef]
- Chambers, M.A.; Carter, S.P.; Wilson, G.J.; Jones, G.; Brown, E.; Hewinson, R.G.; Vordermeier, M. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: An overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Vet. Rec.* **2014**, *175*, 90–96. [CrossRef] [PubMed]
- Cornier, L.A.L.; Buddle, B.M.; Pfeiffer, D.U.; Morris, R.S. Aerosol vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) with bacille Calmette-Guérin: The duration of protection. *Vet. Microbiol.* **2001**, *81*, 181–191. [CrossRef]
- Aldwell, F.E.; Tucker, I.G.; de Lisle, G.W.; Buddle, B.M. Oral Delivery of *Mycobacterium bovis* BCG in a Lipid Formulation Induces Resistance to Pulmonary Tuberculosis in Mice. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 101–108. [CrossRef]
- Bezos, J.; de Juan, L.; Romero, B.; Álvarez, J.; Mazzucchelli, E.; Mateos, A.; Domínguez, L.; Aranaz, A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *133*, 269–275. [CrossRef] [PubMed]
- Pérez de Val, B.; Villarreal-Ramos, B.; Nofrarias, M.; López-Soria, S.; Romera, N.; Singh, M.; Abad, F.X.; Xing, Z.; Vordermeier, H.M.; Domingo, M. Goats Primed with *Mycobacterium bovis* BCG and Boosted with a Recombinant Adenovirus Expressing Ag85A Show Enhanced Protection against Tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 1339–1347. [CrossRef] [PubMed]

23. De Val, B.P.; Vidal, E.; Nofrarias, M.; López-Soria, S.; Cardona, P.-J.; Domingo, M. Assessment of Goat Tuberculosis Model for Use in Vaccine Trials. *Procedia Vaccinol.* **2014**, *8*, 43–49. [[CrossRef](#)]
24. Pérez de Val, B.; Vidal, E.; López-Soria, S.; Marco, A.; Cervera, Z.; Martín, M.; Mercader, I.; Singh, M.; Raeber, A.; Domingo, M. Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine* **2016**, *34*, 881–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Vidal, E.; Arrieta-Villegas, C.; Grasa, M.; Mercader, I.; Domingo, M.; Pérez de Val, B. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis in goats. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 252. [[CrossRef](#)]
26. 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. Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196948. [[CrossRef](#)]
27. Gonzalez-Juantero, M.; Bosco-Lauth, A.; Podell, B.; Soffler, C.; Brooks, E.; Izzo, A.; Sanchez-Campillo, J.; Bowen, R. Experimental aerosol *Mycobacterium bovis* model of infection in goats. *Tuberculosis* **2013**, *93*, 558–564. [[CrossRef](#)]
28. Gong, W.; Liang, Y.; Wu, X. Animal Models of Tuberculosis Vaccine Research: An Important Component in the Fight against Tuberculosis. *BioMed Res. Int.* **2020**, 4263079. [[CrossRef](#)]
29. Sanchez, J.; Tomás, L.; Ortega, N.; Buendía, A.J.; del Rio, L.; Salinas, J.; Bezos, J.; Caro, M.R.; Navarro, J.A. Microscopical and Immunological Features of Tuberculoid Granulomata and Cavitory Pulmonary Tuberculosis in Naturally Infected Goats. *J. Comp. Pathol.* **2011**, *145*, 107–117. [[CrossRef](#)]
30. Nugent, G.; Yockney, I.J.; Cross, M.L.; Buddle, B.M. Low-dose BCG vaccination protects free-ranging cattle against naturally acquired bovine tuberculosis. *Vaccine* **2018**, *36*, 7338–7344. [[CrossRef](#)]
31. Buddle, B.M.; Parlane, N.A.; Wedlock, D.N.; Heiser, A. Overview of Vaccination Trials for Control of Tuberculosis in Cattle, Wildlife and Humans. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60*, 136–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Buddle, B.M. Development of tuberculosis vaccines for cattle. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **2010**, *2*. [[CrossRef](#)]
33. Speth, M.T.; Repnik, U.; Griffiths, G. Layer-by-layer nanocoating of live Bacille-Calmette-Guérin mycobacteria with poly(I:C) and chitosan enhances pro-inflammatory activation and bactericidal capacity in murine macrophages. *Biomaterials* **2016**, *111*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cappellano, G.; Comi, C.; Chiocchetti, A.; Dيازani, U. Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 204. [[CrossRef](#)]
35. Bakhru, P.; Sirisaengtaksin, N.; Soudani, E.; Mukherjee, S.; Khan, A.; Jagannath, C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. *Cell. Immunol.* **2014**, *287*, 53–61. [[CrossRef](#)]
36. Hwang, S.-A.; Actor, J.K. Lactoferrin modulation of BCG-infected dendritic cell functions. *Int. Immunol.* **2009**, *21*, 1185–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Costa-Gouveia, J.; Ainsa, J.A.; Brodin, P.; Lucia, A. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 600–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Gang, N.K.; Dwivedi, P.; Jain, A.; Tyagi, S.; Sahu, T.; Tyagi, R.K. Development of novel carrier(s) mediated tuberculosis vaccine: More than a tour de force. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *62*, 227–242. [[CrossRef](#)]
39. Mohan, T.; Verma, P.; Rao, D.N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J. Med. Res.* **2013**, *138*, 779–795.
40. Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A.N.; Davis, S.S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *51*, 81–96. [[CrossRef](#)]
41. Soane, R.J.; Frier, M.; Perkins, A.C.; Jones, N.S.; Davis, S.S.; Illum, L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* **1999**, *178*, 55–65. [[CrossRef](#)]
42. Zhu, B.D.; Qie, Y.Q.; Wang, J.L.; Zhang, Y.; Wang, Q.Z.; Xu, Y.; Wang, H.H. Chitosan microspheres enhance the immunogenicity of an Ag85B-based fusion protein containing multiple T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 318–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Feng, G.; Jiang, Q.; Xia, M.; Lu, Y.; Qiu, W.; Zhao, D.; Lu, L.; Peng, G.; Wang, Y. Enhanced Immune Response and Protective Effects of Nano-chitosan-based DNA Vaccine Encoding T Cell Epitopes of Esat-6 and FL against *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Khademi, F.; Taberi, R.-A.; Yousefi Avarvand, A.; Vaez, H.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Soleimanpour, S. Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines? *Microb. Pathog.* **2018**, *121*, 218–223. [[CrossRef](#)]
45. Zaharoff, D.A.; Rogers, C.J.; Hance, K.W.; Schlom, J.; Greiner, J.W. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* **2007**, *25*, 2085–2094. [[CrossRef](#)]
46. Gutjahr, A.; Phelip, C.; Coolen, A.-L.; Monge, C.; Boisgard, A.-S.; Paul, S.; Verrier, B. Biodegradable Polymeric Nanoparticles-Based Vaccine Adjuvants for Lymph Nodes Targeting. *Vaccines* **2016**, *4*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Smith, J.D.; Morton, L.D.; Ulery, B.D. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 217–224. [[CrossRef](#)]
48. Ashhurst, A.S.; Parumasivam, T.; Chan, J.G.Y.; Lin, L.C.W.; Flórido, M.; West, N.P.; Chan, H.-K.; Britton, W.J. PLGA particulate subunit tuberculosis vaccines promote humoral and Th17 responses but do not enhance control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194620. [[CrossRef](#)]

49. Dobrovolskaia, M.A.; McNeil, S.E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 469–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kirby, D.J.; Rosenkrands, I.; Agger, E.M.; Andersen, P.; Coombes, A.G.A.; Perrie, Y. PLGA microspheres for the delivery of a novel subunit TB vaccine. *J. Drug Target.* **2008**, *16*, 282–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Luo, M.; Samandi, L.Z.; Wang, Z.; Chen, Z.J.; Gao, J. Synthetic nanovaccines for immunotherapy. *J. Control. Release* **2017**, *263*, 200–210. [[CrossRef](#)]
52. Liu, B.; Wu, Z.; Liu, T.; Qian, R.; Wu, T.; Liu, Q.; Shen, A. Polymeric Nanoparticles Engineered as a Vaccine Adjuvant-Delivery System. In *Immunization—Vaccine Adjuvant Delivery System and Strategies*; Wang, E.N., Wang, T., Eds.; IntechOpen: Hefei, China, 2018. [[CrossRef](#)]
53. Skinner, M.A.; Wedlock, D.N.; Buddle, B.M. Vaccination of animals against *Mycobacterium bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2001**, *20*, 112–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Buddle, B.M.; Wards, B.J.; Aldwell, F.E.; Collins, D.M.; de Lisle, G.W. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* **2002**, *20*, 1126–1133. [[CrossRef](#)]
55. Buddle, B.M.; Wedlock, D.N.; Parlane, N.A.; Corner, L.A.L.; de Lisle, G.W.; Skinner, M.A. Revaccination of Neonatal Calves with *Mycobacterium bovis* BCG Reduces the Level of Protection against Bovine Tuberculosis Induced by a Single Vaccination. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 6411–6419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Bezos, J.; Casal, C.; Álvarez, J.; Roy, A.; Romero, B.; Rodríguez-Bertos, A.; Bárcena, C.; Díez, A.; Juste, R.; Gortázar, C.; et al. Evaluation of the *Mycobacterium tuberculosis* SO₂ vaccine using a natural tuberculosis model in goats. *Vet. J.* **2017**, *223*, 60–67. [[CrossRef](#)]
57. Roy, Á.; Risalde, M.A.; Bezos, J.; Casal, C.; Romero, B.; Sevilla, I.; Díez-Guerrier, A.; Rodríguez-Bertos, A.; Domínguez, M.; Garrido, J.; et al. Response of goats to intramuscular vaccination with heat-killed *Mycobacterium bovis* and natural challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *60*, 28–34. [[CrossRef](#)]
58. Castillo-Rodal, A.I.; Castañón-Arreola, M.; Hernández-Pando, R.; Calva, J.J.; Sada-Díaz, E.; López-Vidal, Y. *Mycobacterium bovis* BCG Substrains Confer Different Levels of Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in a BALB/c Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 1718–1724. [[CrossRef](#)]
59. Khabazzadeh Tehrani, N.; Mahdavi, M.; Maleki, F.; Zarrati, S.; Tabatabaie, F. The role of Montanide ISA 70 as an adjuvant in immune responses against *Leishmania major* induced by thiol-specific antioxidant-based protein vaccine. *J. Parasit. Dis.* **2016**, *40*, 760–767. [[CrossRef](#)]
60. Hope, J.C.; Thom, M.L.; McAulay, M.; Mead, E.; Vordermeier, H.M.; Clifford, D.; Hewinson, R.G.; Villarreal-Ramos, B. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. *Clin. Vaccine Immunol.* **2011**, *18*, 373–379. [[CrossRef](#)]
61. Corner, L.A.L.; Buddle, B.M.; Pfeiffer, D.U.; Morris, R.S. Vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) against *Mycobacterium bovis* infection with bacille Calmette-Guérin: The response to multiple doses. *Vet. Microbiol.* **2002**, *84*, 327–336. [[CrossRef](#)]
62. Francis, J. Control of infection with the bovine tubercle bacillus. *Lancet* **1950**, *1*, 34–39. [[CrossRef](#)]
63. Vordermeier, H.M.; Chambers, M.A.; Buddle, B.M.; Pollock, J.M.; Hewinson, R.G. Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. *Vet. J.* **2006**, *171*, 229–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. 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. A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG Boost Vaccination Strategy for Cattle Induces Protection against Bovine Tuberculosis. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 4901–4907. [[CrossRef](#)]
65. Ferraz, J.C.; Stavropoulos, E.; Yang, M.; Coade, S.; Espitia, C.; Lowrie, D.B.; Colston, M.J.; Tascon, R.E. 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.* **2004**, *72*, 6945–6950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. McShane, H.; Hill, A. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. *Microbes Infect.* **2005**, *7*, 962–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. McShane, H.; Pathan, A.A.; Sander, C.R.; Goonetilleke, N.P.; Fletcher, H.A.; Hill, A.V.S. Boosting BCG with MVA85A: The first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis* **2005**, *85*, 47–52. [[CrossRef](#)]
68. Vordermeier, H.M.; Rhodes, S.G.; Dean, G.; Goonetilleke, N.; Huygen, K.; Hill, A.V.S.; Hewinson, R.G.; Gilbert, S.C. Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Guérin. *Immunology* **2004**, *112*, 461–470. [[CrossRef](#)]
69. 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. 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.* **2005**, *73*, 3540–3546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Buddle, B.M.; Aldwell, F.E.; Skinner, M.A.; Lisle GW de Denis, M.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; Wedlock, D.N. Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* **2005**, *23*, 3581–3589. [[CrossRef](#)]
71. Logan, K.E.; Chambers, M.A.; Hewinson, R.G.; Hogarth, P.J. Frequency of IFN- γ producing cells correlates with adjuvant enhancement of bacille Calmette-Guérin induced protection against *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* **2005**, *23*, 5526–5532. [[CrossRef](#)]

72. Wedlock, D.N.; Skinner, M.A.; Parlane, N.A.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, R.G.; de Lisle, G.W.; Buddle, B.M. Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis. *Tuberculosis* **2003**, *83*, 339–349. [[CrossRef](#)]
73. Elias, D.; Akuffo, H.; Britton, S. PPD induced in vitro interferon gamma production is not a reliable correlate of protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *99*, 363–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Kipnis, A.; Irwin, S.; Izzo, A.A.; Basaraba, R.J.; Orme, I.M. Memory T Lymphocytes Generated by *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination Reside within a CD4 CD44^{lo} CD62 Ligand^{hi} Population. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 7759–7764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Langermans, J.A.M.; Andersen, P.; van Soolingen, D.; Vervenne, R.A.W.; Frost, P.A.; van der Laan, T.; van Pinxteren, L.A.H.; van den Hombergh, J.; Kroon, S.; Peekel, I.; et al. Divergent effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccination on *Mycobacterium tuberculosis* infection in highly related macaque species: Implications for primate models in tuberculosis vaccine research. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11497–11502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]