

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS DE CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA ESPECIE CAPRINA: VACUNACIÓN Y DIAGNÓSTICO**

**Cristian David Melgarejo Torres**

**Tesis Doctoral**

**Bellaterra, 2024**

**EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS DE CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA ESPECIE CAPRINA:  
VACUNACIÓN Y DIAGNÓSTICO**

*EVALUATION OF TUBERCULOSIS CONTROL TOOLS IN GOATS: VACCINATION AND DIAGNOSIS*

Tesis doctoral presentada por **Cristian David Melgarejo Torres** para acceder al grado de Doctor en el marco del programa de doctorado en Medicina y Sanidad Animales de la *Facultat de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, bajo la dirección del Dr. Bernat Pérez de Val y el Dr. Enric Vidal i Barba y la tutoría del Dr. Alberto Allepuz Palau.

Bellaterra, 28 de junio de 2024

El Dr. **Enric Vidal i Barba** y el Dr. **Bernat Pérez de Val**, investigadors del Centre de Recerca en Sanitat Animal de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-CReSA); El Dr. **Alberto Allepuz Palau**, professor agregat del Departament de Sanitat i Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Certifiquen:

Que la memòria titulada "**EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS DE CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA ESPECIE CAPRINA: VACUNACIÓN Y DIAGNÓSTICO**" presentada per **Cristian David Melgarejo Torres** per a l'obtenció del grau de Doctor en Medicina i Sanitat Animals, s'ha realitzat sota la seva supervisió i tutoria, i autoritzen la seva presentació per a que sigui valorada per la comissió establerta.

I perquè així consti als efectes oportuns, signen el present certificat Bellaterra (Barcelona), a 28 de junio de 2024

Dr. Enric Vidal i Barba

Dr. Bernat Pérez de Val

Dr. Alberto Allepuz Palau

Director

Director

Tutor

Cristian David Melgarejo Torres

Doctorand

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por el bacilo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y afecta tanto a animales como a humanos y por ende es una zoonosis de gran importancia tanto para la salud pública como para la salud animal. En caprinos la enfermedad se produce mayoritariamente por *M. bovis* y *M. caprae* y en menor medida por otros miembros del CMTB. Además de representar un riesgo sanitario, la TB genera pérdidas económicas significativas en la producción ganadera debido a la disminución de la productividad y los costos asociados al manejo y el control de la enfermedad.

A pesar de los esfuerzos por controlar la TB, su erradicación sigue siendo un desafío. En este contexto, en la tesis doctoral se ha propuesto tres estudios que pueden contribuir a mejorar las herramientas de control de la TB en la especie caprina.

En el primer estudio se evaluó la eficacia de una autovacuna de *M. caprae* inactivada por calor (HIMC) contra la infección de *M. caprae* en cabras. Las cabras vacunadas con HIMC mostraron una mejor protección frente a la infección pulmonar en comparación con la protección heteróloga conferida por una vacuna de *M. bovis* inactivada (HIMB), con una disminución significativa de la carga bacteriana y la extensión de lesiones pulmonares en comparación con las no vacunadas. Ambas vacunas también redujeron la diseminación extrapulmonar de la TB y mejoraron los parámetros clínicos, como el aumento de peso corporal y la disminución de la temperatura rectal, demostrando que la autovacuna puede ser una estrategia válida para el control de la TB en entornos de alta prevalencia.

El segundo estudio se centró en comparar dos vías de infección experimental en cabras con *M. caprae*: la nebulización intranasal (IN) y la inoculación endobronquial (EB) con el objetivo de evaluar las ventajas e inconvenientes de diferentes modelos de infección experimental en la especie caprina. Los resultados mostraron que la vía IN resultó en una progresión más lenta de la infección y menor gravedad de las lesiones pulmonares (mostrando un cuadro lesional parecido a la infección natural), mientras que la EB aceleró la progresión de la infección y aumentó la severidad de las lesiones. Sin embargo, también se observó una exacerbación de lesiones en la región de la cabeza en los animales desafiados por vía IN, indicando que este modelo todavía debe ser refinado.

En el último estudio se evaluó los efectos de la infección experimental de cabras con *M. microti* en el inmunodiagnóstico y se abordó la caracterización de la infección por este agente mediante diferentes rutas y dosis. Los resultados mostraron que la ruta endobronquial con una alta dosis (EB-HD) fue la única capaz de inducir una infección pulmonar subclínica, ya que la bacteria se aisló de los nódulos linfáticos pulmonares de todos los animales del grupo. Además, algunas de las cabras infectadas presentaron lesiones pulmonares mínimas y, en algunos casos, respuestas a las pruebas cutáneas de tuberculina, lo que sugiere que *M. microti* puede interferir con las pruebas de diagnóstico de TB actualmente utilizadas en campañas de erradicación de TB bovina y caprina. Estas respuestas desaparecieron cuando se utilizaron antígenos definidos. Estos hallazgos muestran la necesidad de utilizar reactivos basados en antígenos específicos en pruebas *antemortem* para evitar interferencias con el diagnóstico de *M. bovis* y *M. caprae*.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex bacillus (CMTB) and affects both animals and humans and is therefore a zoonosis of great importance for both public and animal health. In goats, the disease is mainly caused by *M. bovis* and *M. caprae* and to a lesser extent by other members of the CMTB. In addition to representing a health risk, TB generates significant economic losses in livestock production due to decreased productivity and the costs associated with the management and control of the disease.

Despite efforts to control TB, its eradication remains a challenge. In this context, the doctoral thesis has proposed three studies that can contribute to improving the tools for controlling TB in the goat species.

The first study evaluated the efficacy of a heat-inactivated *M. caprae* autovaccine (HIMC) against *M. caprae* infection in goats. Goats vaccinated with HIMC showed better protection against lung infection compared to the heterologous protection conferred by an inactivated *M. bovis* vaccine (HIMB), with a significant decrease in bacterial load and extent of lung lesions compared to the unvaccinated animals. Both vaccines also reduced extrapulmonary dissemination of TB and improved clinical parameters, such as body weight gain and rectal temperature reduction, demonstrating that autovaccine can be a valid strategy for TB control in high prevalence settings.

The second study focused on comparing two routes of experimental infection in goats with *M. caprae*: intranasal nebulization (IN) and endobronchial inoculation (EB) with the aim of evaluating the advantages and disadvantages of different models of experimental infection in the goat. The results showed that the IN route resulted in a slower progression of the infection and less severity of the lung lesions (showing a lesion pattern similar to natural infection), while the EB accelerated the progression of the infection and increased the severity of the lesions. However, an exacerbation of lesions in the head region was also observed in IN-challenged animals, indicating that this model still needs to be refined.

In the last study, the effects of experimental infection of goats with *M. microti* on immunodiagnostic were evaluated and the characterization of infection by this agent was addressed using different routes and doses. The results showed that the endobronchial route with a high dose (EB-HD) was the only one capable of inducing a subclinical pulmonary infection, since the bacteria was isolated from the pulmonary lymph nodes of all the animals in the group. Additionally, some of the infected goats showed minimal lung lesions and, in some cases, responses to tuberculin skin tests, suggesting that *M. microti* may interfere with TB diagnostic tests currently used in bovine and caprine TB eradication campaigns. These responses disappeared when defined antigens were used. These findings show the need to use specific antigen-based reagents in *antemortem* testing to avoid interference with the diagnosis of *M. bovis* and *M. caprae*.

## RESUM

La tuberculosi (TB) és una malaltia infecciosa crònica causada pel bacil del complex *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que afecta tant a animals com a humans i, per tant, és una zoonosi de gran importància tant per a la salut pública com per a la salut animal. En caprins, la malaltia es causada majoritàriament per *M. bovis* i *M. caprae* i en menor mesura per altres membres del CMTB. A més de representar un risc sanitari, la TB genera pèrdues econòmiques significatives a la producció ramadera a causa de la disminució de la productivitat i els costos associats al maneig i el control de la malaltia.

Tot i els esforços per controlar la TB, la seva erradicació continua suposant un desafiament. En aquest context, a la tesi doctoral s'han proposat tres estudis que poden contribuir a millorar les eines de control de la TB en l'espècie caprina.

En el primer estudi es va avaluar l'eficàcia d'una autovacuna de *M. caprae* inactivada per calor (HIMC) contra la infecció de *M. caprae* en cabres. Les cabres vacunades amb HIMC van mostrar una millor protecció davant de la infecció pulmonar en comparació amb la protecció heteròloga conferida per una vacuna de *M. bovis* inactivada (HIMB), amb una disminució significativa de la càrrega bacteriana i l'extensió de lesions pulmonars en comparació amb les no vacunades. Les dues vacunes també van reduir la disseminació extrapulmonar de la TB i van millorar els paràmetres clínics, com ara l'augment de pes corporal i la disminució de la temperatura rectal, demostrant que l'autovacunació pot ser una estratègia vàlida per al control de la TB en contextos d'alta prevalença.

El segon estudi es va centrar en comparar dues vies d'infecció experimental de cabres amb *M. caprae*: la nebulització intranasal (IN) i la inoculació endobronquial (EB), amb l'objectiu d'avaluar els avantatges i els inconvenients de diferents models d'infecció experimental en l'espècie caprina. Els resultats van mostrar que la via IN va presentar una progressió més lenta de la infecció i una menor gravetat de les lesions pulmonars (mostrant un quadre lesional semblant al de la infecció natural), mentre que la via EB va accelerar la progressió de la infecció i va augmentar la severitat de les lesions. Tot i això, també es va observar una exacerbació de lesions a la regió del cap en els animals desafiats per via IN, indicant que aquest model encara ha de ser refinat.

En l'últim estudi es van avaluar els efectes de la infecció experimental de cabres amb *M. microti* en l'immunodiagnòstic i es va abordar la caracterització de la infecció per aquest agent mitjançant diferents rutes i dosis. Els resultats van mostrar que la ruta endobronquial amb una alta dosi (EB-HD) va ser l'única capaç d'induir una infecció pulmonar subclínica, ja que el bacteri es va aïllar dels nòduls limfàtics pulmonars de tots els animals del grup. A més, algunes de les cabres infectades van presentar lesions pulmonars mínimes i, en alguns casos, respostes a les proves cutànies de tuberculina, fet que suggereix que *M. microti* pot interferir amb les proves de diagnòstic de TB actualment utilitzades en campanyes d'erradicació de TB bovina i caprina. Aquestes respostes van desaparèixer quan es van utilitzar antígens definits. Aquestes troballes mostren la necessitat d'utilitzar reactius basats en antígens específics en proves *antemortem* per evitar interferències amb el diagnòstic de *M. bovis* i *M. caprae*.

La tesis doctoral se ha desarrollado gracias al apoyo de:

- Programa Nacional de Becas de Postgrado en el Exterior “Don Carlos Antonio López” (BECAL).
- Proyecto “Red de investigación transpirenaica para el control de la tuberculosis animal (INNOTUB)”. EFA 357/19, Programa POCTEFA 2004-2020 (INTERREG V-A) de la Comisión Europea (cofinanciado por el FEDER).
- Proyecto “Nuevas estrategias de inmunización y herramientas de diagnóstico para el control de la tuberculosis caprina (GoatTBfree)”. PID2019-105155RB-C32/AEI/10.13039/501100011033, Agencia Estatal de Investigación.



## Agradecimientos

En este apartado quiero expresar mi gratitud o agradecimientos a todas las personas que me han acompañado y apoyado en este camino académico, el de la tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis abuelos Urbana González y Marcial Melgarejo por todo el apoyo que siempre me dieron y la confianza que siempre depositaron en mí, nunca voy a olvidar cuando me dijeron “tereho katu che memby ha tereho katu che ra'ý tereikuaa upetyo (porohayhueterei)”. A mis padres Elber y Norma por darme también su apoyo en la distancia. Y como no agradecer a mis tíos de siempre, los que siempre están y con los que crecí, y por eso mi familia fue numerosa: Fanny, Dolly, mis madres que siempre cuidaron de mí desde chico, mis tíos Javier, Mario y Derlis que fueron como mis hermanos. Cada uno aportando siempre el grano de arena para sentirme mejor en la distancia. Y como no agradecer a mi familia desde el comienzo de la universidad, allá por el año 2010 conformada por mis tíos Javier y Fátima, si voy a Chile, me vienen a ver, si voy a Europa también, ahora debo ir buscando a que país voy a ir para cumplir con las altas exigencias de Jesús (hahaha).

Agradezco también a mis directores de tesis Bernat y Enric, por la paciencia, por las orientaciones, enseñanzas y como no por cada comentario que me hicieron y hacen para mejorar la calidad de esta investigación y debo decir que para que pueda mejorar a nivel profesional también. Sin duda para mí haber compartido con ustedes estos años fue positivo. Igual estar pendiente por si me preguntas algo en necropsias Enric me da una mini ansiedad, pero sé que es para mi bien haha. Y Bernat gracias por escarbar el conocimiento que tengo con tus preguntas insistentes, para ayudarme a encontrar la respuesta. Moltes gràcies a los dos!

Agradezco al equipo de tuberculosis, wow: Zori muchas gracias por enseñarme, por la paciencia y cariño que recibí estando en el laboratorio y fuera de él, Julia por dios muchas gracias, hablamos tanto y de tanto que voy a extrañar también cuando trabaja en el laboratorio y Abel gracias por ser mi partner y por las largas conversaciones en P3. Definitivamente estar en P3 con ustedes fue genial. Para Miriam y Patricia éxito en esta etapa, el camino no es fácil, pero si era fácil no iba a ser divertido, mucha fuerza tubercologas/tubercologuis/tuberculosos. Y como no, Claudia, gracias por ayudarme en las dudas que tuve y por estar ahí cada vez que te preguntaba. A Alberto Allepuz gracias por identificar hacia donde tenía que apuntar para crecer en lo profesional.

Y como no agradecer al equipo de AP, Mónica, Rosa por darme una mano siempre que necesite de su ayuda y al Cobos por ayudarme a usar el microscopio o macro, depende de que día sea. Mis agradecimientos van también a los/las chicos/cas de estabulario que estuvieron siempre para darme una mano, sobre todo a Oscar e Ivan vaya gente eeh, la pase muy bien con ustedes y por sobre todo he aprendido. ¡La experimental con todos ustedes fueron la mejor parte, muchas gracias! Gracias Diego, que siempre tenías todo listo por si salíamos al campo y por la buena onda.

Ahora el agradecimiento al despacho de becarios, madre mía del amor hermoso (haikuepe) acá sí que tengo que agradecer, cada sentimiento se vive minuto a minuto y con una intensidad cabe mencionar que sobre todo en la sala de becarios he aprendido un montón también: Alicia la de 100cia gracias esas conversaciones super productivas de la tesis y muy elaboradas, Leira, Judith, Pau, Laura, David, Carlos, María José gracias por ayudarme en todo este proceso de escritura, presentaciones, poster y todo, Albert, Oussamis, las hermanitas Aida y Carla muchas gracias por el apoyo y cariño,

Alejandro siii perro vamos contra Mendeley y al índice, Monica, Pilar Patricia orejitas, a mis hermanas del Mercosur Ayelén y Ana por el apoyo incondicional y amistad, Enriquito, Patricia Martinez si tú gracias joven pequeña, Aruna, Junhao, Oscar, Beatriz, Inés, Lorena. Les agradezco su compañía durante todo este tiempo.

Guille, Aga, Karen, Karol, Libni y Lore, grandes amigos muchas gracias por el apoyo moral y por la compañía en todo este proceso que también lo han vivido conmigo y cuando no teníamos nada más que decir, con la simple compañía ya era más que suficiente. Fernando, Laia, Mercedes, Sebastián mis compañeros de infecciosas gracias por el aguante durante este proceso y también por el apoyo dándome ánimos. Y como no podía faltar al hermoso grupo que salíamos del CReSA para ir a entrenar al SAF y soltar el estrés; a la Jordana, Martha, Paula, Carla y Ayelén de nuevo, pero también ocasionalmente muy pero muy ocasionalmente al Deivis, Adriana y Patricia, aunque a veces desviamos para tomar cañas, pero bueno eso es normal. También gracias, Diego por los tupperts de comida durante casi todo el doctorado.

Gracias a todas estas personas.

## INDICE

### RESUMEN

### ABSTRACT

### RESUM

### Agradecimientos

<b>1- INTRODUCCION GENERAL</b> .....	1
<b>1.1. Historia de la Tuberculosis</b> .....	3
<b>1.2. Antecedentes de la tesis</b> .....	5
<b>1.3. Epidemiología de la tuberculosis</b> .....	6
<b>1.3.1. Tuberculosis humana y tuberculosis zoonótica</b> .....	6
<b>1.3.2. Tuberculosis animal</b> .....	8
<b>1.3.3. Tuberculosis en cabras</b> .....	10
<b>1.4. Etiología</b> .....	11
<b>1.4.1. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMTB)</b> .....	11
<b>1.4.2. <i>Mycobacterium caprae</i></b> .....	11
<b>1.4.3. <i>Mycobacterium microti</i></b> .....	12
<b>1.5. Patogénesis y Respuesta Inmune</b> .....	12
<b>1.5.2. Inmunidad adaptativa</b> .....	16
<b>1.5.2.1. Respuesta mediada por células</b> .....	16
<b>1.5.2.2. Respuesta Humoral</b> .....	17
<b>1.6. Inmunodiagnóstico</b> .....	17
<b>1.6.1. Pruebas de Intradermorreacción (IDR)</b> .....	17
<b>1.6.2. Prueba de liberación de interferón gamma (IGRA)</b> .....	19
<b>1.7. Evaluación de la lesión tuberculosa</b> .....	21
<b>1.7.1. Diagnóstico Anatomopatológico</b> .....	21
<b>1.7.2. Tomografía axial computarizada (TAC)</b> .....	22
<b>1.8. Cultivo microbiológico y Biología molecular</b> .....	22
<b>1.9. Estrategias de control de la tuberculosis</b> .....	23
<b>1.9.1. Prueba y sacrificio</b> .....	23
<b>1.9.2. Vacunación</b> .....	23
<b>1.9.3. Diferenciación entre animales vacunados e infectados (DIVA)</b> .....	24
<b>1.10. Modelos experimentales de tuberculosis</b> .....	25
<b>1.10.1. Modelos Animales</b> .....	25
<b>1.10.1.1. Ratón</b> .....	25

1.10.1.2. Rata .....	25
1.10.1.3. Conejillo de indias.....	26
1.10.1.4. Conejo .....	26
1.10.1.5. Pez cebra .....	26
1.10.1.6. Primates no humanos .....	26
1.10.1.7. Modelo Bovino .....	27
1.10.1.8. Modelo Caprino.....	27
<b>2- HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3. ESTUDIO I: .....</b>	<b>33</b>
<b>A proof-of-concept study to investigate the efficacy of heat-inactivated autovaccines in <i>Mycobacterium caprae</i> experimentally challenged goats.....</b>	<b>33</b>
<b>4. ESTUDIO II: .....</b>	<b>52</b>
<b>Experimental infection of goats with <i>Mycobacterium caprae</i> through the intranasal nebulization and the endobronquial instillation display different pathological features.....</b>	<b>52</b>
<b>5. ESTUDIO III: .....</b>	<b>72</b>
<b>Experimental infection of goats with <i>Mycobacterium microti</i> induces subclinical pulmonary tuberculosis and mild responses to tuberculin skin tests .....</b>	<b>72</b>
<b>6- DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>83</b>
<b>7- CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>93</b>
<b>8- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>97</b>
<b>9. Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>127</b>

# **1- INTRODUCCION GENERAL**



### 1.1. Historia de la Tuberculosis

En la antigua Grecia, la Tuberculosis (TB) en humanos era conocida con el nombre de *Phthisis* o “tisis” (460-377 a.C). En el siglo XIX con los aportes del médico Laennec sobre todo en la patología pulmonar de la tuberculosis gracias al estetoscopio se (Laennec, 1819) mencionó que las lesiones se describían con forma de tubérculos dentro del pulmón (tisis pulmonar) pero también en otros órganos.

A lo largo de la historia, la TB ha sido una enfermedad presente en la evolución de los seres humanos y también en otros animales. Se describe que la TB humana estaba presente en el Neolítico (Buzic and Giuffra, 2020). La identificación de ADN de micobacterias en restos fósiles ha arrojado luz sobre este patógeno. Se ha encontrado material genético de Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) en muestras de bisontes provenientes en una cueva en Wyoming, estas corresponden a 17.000 años atrás aproximadamente.

También se ha detectado en muestras de restos humanos *Mycobacterium tuberculosis* que datan de hace 9.000 años atrás en el Mediterráneo Oriental (Hershkovitz et al., 2008; Rothschild et al., 2001). Estos hallazgos nos indican que la enfermedad se extendió mucho más allá de la antigua civilización egipcia, pero en el registro escrito de esta civilización se menciona por primera vez en el papiro de Ebers y se ha demostrado su existencia en momias que datan del periodo entre 1500 y 500 años a.C (Donoghue et al., 2004).

Hoy en día sabemos que los miembros del CMTB son muy poco diversos genéticamente entre ellos, mostrando así una identidad superior al 99,9% de similitud a nivel de nucleótidos. Las cepas de *M. tuberculosis* se dividen en dos categorías: cepas ancestrales y las modernas (Brosch et al., 2002). Desde este aspecto podemos mencionar que el ancestro común de los miembros del CMTB están relacionado con las cepas modernas de *M. tuberculosis*. Gracias a la secuenciación del genoma completo de *M. bovis* (Garnier et al., 2003) se ha sugerido que es probable que *M. bovis* derive de *M. tuberculosis*, como un “ecotipo” adaptado a los bovinos y que probablemente surgió en África durante el neolítico coincidiendo con la domesticación de animales y posteriormente se propago con la migración a los otros continentes (Galagan, 2014). Por su parte, *M. caprae* sería evolutivamente más antiguo que *M. bovis*, pero ambas especies provendrían de un ancestro común que a su vez deriva de *M. tuberculosis*, a partir del cual se fueron adaptando a sus distintos hospedadores principales (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2005).

En un paso significativo en el camino hacia el conocimiento de la TB, Jean Antoine Villemin en 1865 inoculó sangre/esputo de conejo infectado con tuberculosis a las cobayas, conejos y otros animales y se replicó la enfermedad en estos animales, por lo tanto, demostró que la enfermedad es de carácter infecciosa (Villemin, 1865).

Otro hito importante en el marco de la medicina y para la microbiología ocurrió en marzo de 1882, cuando Robert Koch presento en Berlín una de sus investigaciones en donde logró aislar el bacilo de la tuberculosis, Koch también fue capaz de reproducir la enfermedad en cobayas, realizar cultivos de las lesiones del pulmón, también fue capaz de teñir los bacilos con azul de metileno (extracto de los bacilos de la tuberculosis) (Koch, 1882).

Koch también presentó por primera vez la “tuberculina” en 1890 pero como una herramienta para el tratamiento de esta enfermedad. Esta tuberculina se obtuvo mediante el cultivo de la bacteria en un medio de patata con bilis de buey con glicerol, luego esta pasó por un proceso de filtrado (extracto de los bacilos de tuberculosis en solución con un 50% de glicerol) y recibió el nombre de “Tuberculina Vieja” de Koch (CDC, 2023). En el campo de la medicina veterinaria, Bernhard Bang comenzó a aplicar la “Tuberculina Vieja” de Koch como herramienta de diagnóstico en el programa de Erradicación de la tuberculosis bovina en Dinamarca (Bang, 1908; Good et al., 2018).

Un aspecto importante en el marco de la lucha contra la TB fue el desarrollo de la vacuna viva atenuada BCG (Bacilo Calmette-Guèrin), esta vacuna debe su nombre a los científicos Albert Calmette (médico) y Camille Guèrin (veterinario) y se desarrolló mediante cultivo de una cepa de *M. bovis* procedente de una vaca con mastitis y se llevó a cabo en el instituto Pasteur de Lille. El cultivo contenía patata, glicerol y bilis de buey y se realizaron otros subcultivos (cada 3 semanas) y después de realizar varios pases lograron la atenuación de la cepa virulenta, realizaron pruebas en animales como conejos, cobayas y ganado (Calmette, 1923). En el año 1921 se realiza la primera administración de la vacuna BCG en humanos (Calmette, 1931).

Ante el avance de la enfermedad en las poblaciones humanas, en la década de 1940 se marcó un gran avance para el tratamiento de esta enfermedad y esto significó una reducción de la mortalidad gracias al desarrollo del primer antibiótico efectivo contra *M. tuberculosis*: la estreptomina. Décadas después han aparecido los fármacos rifampicina, la isoniazida, pirazinamida y etambutol (Kolyva, 2012). Actualmente existen una gran cantidad de micobacterias con resistencia frente a antibióticos contra la tuberculosis, incluso existen cepas de *M. tuberculosis* totalmente resistentes a todos los fármacos para el tratamiento (Galagan, 2014), o *M. bovis* con resistencia natural a la pirazinamida (Thoen et al., 2014), o resistencias encontradas en otros miembros del CMTB (Feuerriegel et al., 2014). Se puede atribuir la problemática de la farmacorresistencia debido a diferentes factores como un tratamiento inadecuado, toxicidad de algunos fármacos, costos de estos y la duración de tratamiento, esto hace que existan cambios en la secuencia de genes que codifican para las dianas de los antibióticos y así la farmacorresistencia genera un problema para la salud pública (Dean et al., 2017; Diriba et al., 2023).



## 1.2. Antecedentes de la tesis

Mi formación académica en Medicina Veterinaria la realicé en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción (Paraguay). Posteriormente con la beca BECAL Paraguay hice el máster en Ciencias Animales y Veterinarias en la Universidad de Chile (Chile) y con la misma beca realicé esta tesis doctoral (Doctorado en Medicina y Sanidad Animal – UAB) en el grupo de tuberculosis del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA), que es un centro del *Institut de Recerca i tecnologia Agroalimentàries* (IRTA) situado en Bellaterra (Barcelona, Catalunya) dentro del campus de la Universidad Autónoma de Barcelona. En el contexto de la tuberculosis animal, el IRTA-CReSA desempeña un papel esencial, siendo responsable de las pruebas diagnósticas esenciales para el Programa de erradicación de la tuberculosis por encargo del *Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural* de la *Generalitat de Catalunya*. Dentro del centro de investigación se cuenta con la unidad de alta biocontención de nivel 3, en donde se desarrolla una línea de investigación centrada en el estudio de la tuberculosis en la especie caprina. Dentro de esta línea la presente tesis se enfoca en el estudio y mejora de estrategias de vacunación y diagnóstico de la tuberculosis con las actuales herramientas de control disponibles en el modelo experimental caprino.

En el ganado caprino, las principales causantes de tuberculosis son las especies *M. bovis* y *M. caprae*. Es importante destacar que las cabras pueden transmitir esta enfermedad a otras especies, tanto domésticas como silvestres, además de a las personas y se ha comprobado que las cabras desempeñan un papel importante como reservorios domésticos de la tuberculosis bovina, lo que puede tener un impacto significativo en los esfuerzos por erradicar la tuberculosis en el ganado. La presencia de tuberculosis en cabras puede dificultar los programas de control y erradicación de esta enfermedad en el ganado y, por lo tanto, se convierte en un tema relevante para la salud pública y la sanidad animal (Bezós, Marqués, et al., 2014; Napp et al., 2013; Vordermeier et al., 2014).

La prevalencia actual de la tuberculosis bovina es de 1,48% en rebaños en España, y en Catalunya es de un 0,06%. El 26 de enero de 2023 entró en vigor el nuevo estatus sanitario que declara a Catalunya como zona oficialmente libre de tuberculosis bovina (OITB) por parte de la Comisión Europea y esto representa un logro de gran importancia en el esfuerzo continuo por erradicar la tuberculosis en los animales. Esto muestra un avance en la lucha contra la enfermedad en la región, la designación de una zona como libre de esta enfermedad es un paso importante hacia la mejora de la sanidad animal y la protección de la salud pública, de esta manera Catalunya se suma a otras zonas libres como Murcia, Baleares, Asturias, Galicia, Canarias y País Vasco. Es importante mencionar que en España existen zonas geográficas con otra situación epidemiológica respecto a la enfermedad, presentando zonas con altas prevalencias como Andalucía, Castilla la Mancha, Extremadura, La Rioja o Madrid y zonas con bajas prevalencias como Aragón, Cantabria, Castilla y León, Navarra, y finalmente Valencia (MAPA, 2023). Si bien los programas de erradicación se centran en eliminación de los animales positivos a las pruebas, también es importante avanzar en investigaciones para fortalecer la lucha contra la enfermedad, realizando estudios de opciones vacunales, mejoras en diagnóstico y el entendimiento de la patología en los animales afectados, sobre todo en el ganado de producción.

Recientemente en la línea de investigación de TB del CReSA se han llevado a cabo estudios relacionados con la vacunación de cabras con las vacunas BCG (*Mycobacterium bovis* *Bacile Calmette-Guérin*), que es la única vacuna viva atenuada

habilitada para el uso en humanos, pero interfiere en el diagnóstico con las tuberculinas estándar (Vordermeier et al., 2014), también se ha realizado estudios en caprinos con la vacuna HIMB (*M. bovis* inactivado por calor) (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Arrieta-Villegas et al., 2018; Vidal et al., 2017). En cuanto al diagnóstico de la tuberculosis en cabras generalmente se realiza después de la muerte del animal debido a la falta de un programa de erradicación específico en la especie. En los mataderos, se identifican lesiones de tuberculosis, que a menudo son crónicas, indicando una alta transmisión en el rebaño. También se utilizan análisis anatomopatológicos, pruebas de PCR y cultivos para confirmar la enfermedad. Recientemente se ha evaluado el complejo antigénico P22 en cabras vacunadas y no vacunadas como una herramienta de diagnóstico *antemortem* (Arrieta-Villegas, Infantes-Lorenzo, et al., 2020).

Fuera de los estudios experimentales, en granjas, el diagnóstico *antemortem* en ganado bovino se hace a través de la intradermotuberculinización con tuberculinas estándar, también en paralelo con pruebas de interferón gamma para detectar la enfermedad en etapas tempranas (MAPA, 2023). Si bien estos detectan miembros del CMTB como *M. bovis* y *M. caprae*, se piensa que otros miembros como el *M. microti* podrían generar alguna interferencia en el diagnóstico dentro del rebaño (Michelet et al., 2020), sobre todo en zonas geográficas donde existe circulación de esta (Pérez de Val et al., 2019) y que podría llegar a comprometer el estatus sanitario y generar desconfianza en el sector ganadero frente a las pruebas diagnósticas oficiales al aparecer animales reactivos a las pruebas de piel en los que no se logra confirmar la infección por *M. bovis* o *M. caprae*.

### 1.3. Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis puede transmitirse entre animales y humanos (zoonosis), y viceversa (antropozoonosis). La colaboración interdisciplinaria entre autoridades de salud pública y veterinarias, conocida como "One Health" (Una Sola Salud), es respaldada por organizaciones internacionales como la OMS (Organización Mundial de la Salud), la OMSA (Organización Mundial de Sanidad Animal) y la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación).

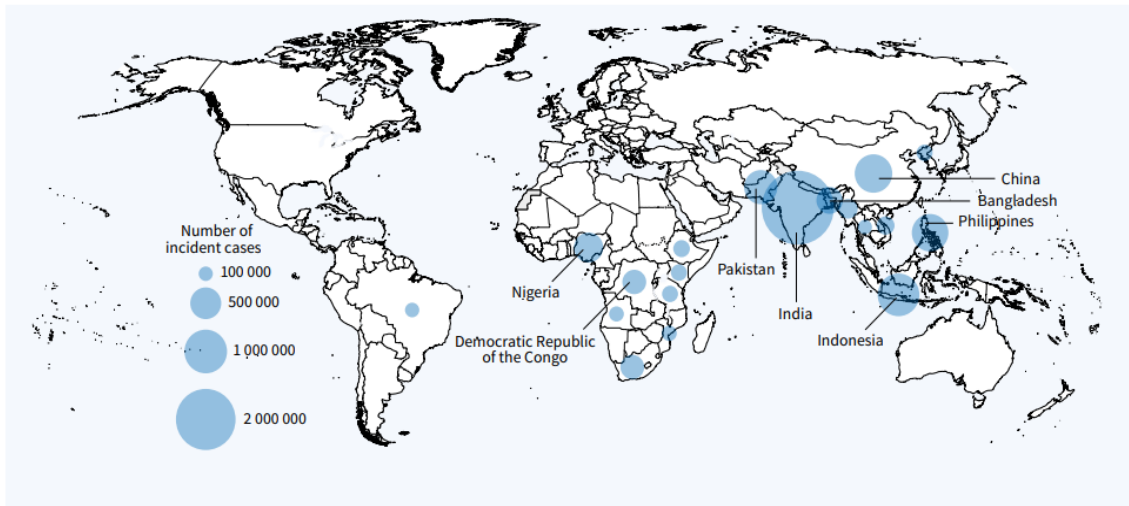
La importancia de la tuberculosis caprina está en su impacto en la salud animal y en la salud pública debido a su carácter zoonótico.

La naturaleza multi-hospedadora del patógeno, la diversidad genética del patógeno y la importancia de la transmisión indirecta agrega complejidad a la epidemiología y control de la enfermedad. Por lo tanto, comprender la epidemiología de la tuberculosis caprina es crucial para controlar y prevenir la propagación de la enfermedad en las poblaciones de cabras y para garantizar la seguridad de la cadena alimentaria y la salud de las personas que dependen de estos animales.

#### 1.3.1. Tuberculosis humana y tuberculosis zoonótica

La tuberculosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, sobre todo en países en desarrollo. La incidencia global de TB se estima que es aproximadamente de 10 millones de casos por año. Un total de 1.6 millones de personas murieron a causa de la enfermedad en el 2021 (WHO, 2023). La coinfección TB/VIH tiene una importancia estadística relevante a nivel global, ya que las personas que viven con VIH representan casi el 9% de los casos nuevos de tuberculosis y también el 20% de las muertes (Letang et al., 2020). El mayor porcentaje de nuevos infectados provienen de países en desarrollo, en el Sudeste Asiático (46%), África (23%) y la región del Pacífico Occidental (18%) y en menor proporción Mediterráneo Oriental (8.1%), las Américas (3.1%) y Europa (2.2%). India (27%), Indonesia (10%), China (7.1%), Filipinas

(7%), Pakistán (5.7%), Nigeria (4.5%), Bangladesh (3.6%) y República Democrática del Congo (3%) la OMS en su informe del 2023 considera que estos países representan el mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad a nivel global (Figura 1). Estos porcentajes nos dan la idea del impacto de la infección en la salud humana sobre todo en países en donde el sistema sanitario es deficiente y se dificulta tanto el acceso al diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis. En el 2021 en países como Bangladesh, Kenia, Mozambique, Uganda, Republica Unida de Tanzania, Zambia y Rusia tuvieron una reducción de mortalidad de aproximadamente del 35% y a nivel mundial de la reducción de la incidencia fue del 10%.



**Figura 1.** Principales Países con Alta Incidencia de Tuberculosis en 2022. Fuente: Informe mundial sobre la tuberculosis 2023. OMS, 2023. Disponible en: [Programa Mundial de Tuberculosis \(who.int\)](https://www.who.int/programa-mundial-de-tuberculosis).

La resistencia de *M. tuberculosis* frente a los medicamentos clásicos para tratamiento como la rifampicina y la isonazida (MDR-TB, *multidrug-resistant TB* por sus siglas en inglés) producen problemas en la salud pública en países con enormes poblaciones como China e India (WHO, 2023). Se ha descrito formas graves de la resistencia, como la tuberculosis extremadamente resistente a medicamentos (XDR-TB, *extensively drug-resistant TB* por sus siglas en inglés) y la tuberculosis totalmente resistente a los medicamentos (TDR-TB *totally drug-resistant tuberculosis* por sus siglas en inglés) (Hameed et al., 2018) y esto está obligando a los programas de salud a dar un enfoque diferente a los tratamientos frente a la infección.

De entre estos casos de tuberculosis aproximadamente 140.000 personas se cuentan como casos anuales de tuberculosis zoonótica a nivel mundial y mayoritariamente se registran en África y Asia sudoriental (Ramos et al., 2020; WHO, 2023).

Mayoritariamente los casos de TB en humanos son causados por *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* y *Mycobacterium africanum*, pero también otras micobacterias miembros del complejo causan enfermedad en humanos, sobre todo con *M. bovis* y *M. caprae* que son las que están relacionadas con el ganado (Thoen et al., 2014). Se han reportado casos de personas infectadas con *M. bovis* del ganado bovino que han pasado al humano (Fritsche et al., 2004), también casos de infección por *M. caprae* (Papaventsis et al., 2021), estos dos casos representan una interacción directa, otros miembros como *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium*

*orygis*, *Mycobacterium canneti* y *Mycobacterium mungy* pueden causar tuberculosis en humanos y otros animales tanto domésticos como silvestres (Brites et al., 2018; Kock et al., 2021).

### 1.3.2. Tuberculosis animal

Desde la OMSA se considera que la TB es la infección en mamíferos causada por los principales miembros del CMTB que afectan a gran cantidad animales domésticos y silvestres que son *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis* y *M. caprae*. El ganado bovino se ve afectado principalmente por *M. bovis* y se considera la primera fuente de infección para los humanos dentro de los casos zoonóticos. La TB es de notificación obligatoria como se indica en el Código Sanitario para los Animales Terrestres.

El control de la TB se ha centrado fundamentalmente en el ganado bovino ya que la producción bovina tiene una gran repercusión económica y social dentro de los países. Por eso, los estudios son en mayor cantidad en esta especie y por ende se tiene mayor cantidad de datos. No obstante, como habíamos mencionado antes la enfermedad se ha reportado en diversas especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres (Gortazar and Cowan, 2013) y cuantos más huéspedes formen parte de la comunidad de hospedadores más difícil será la erradicación.

En varios países, el enfoque para eliminar la tuberculosis se centra en realizar pruebas de diagnóstico *antemortem*, como el uso de las pruebas cutáneas como las Intradermorreacción simple o la Intradermorreacción comparada, seguidas de la eliminación de los animales que arrojan resultados positivos en dichas pruebas. No obstante, en los últimos años, a pesar de los esfuerzos para reducir la tuberculosis bovina a través de esta estrategia de pruebas y sacrificio, se ha observado un estancamiento en la disminución de los casos en países desarrollados, como los de Europa o Nueva Zelanda (EFSA, 2021). Pero también tenemos casos de éxito como es el caso de Australia que es declarada zona libre de la tuberculosis en animales (Glanville, 2023) y el de E.E.U.U que es considerada zona libre de tuberculosis bovina excepto el estado de Michigan (O'Brien et al., 2023).

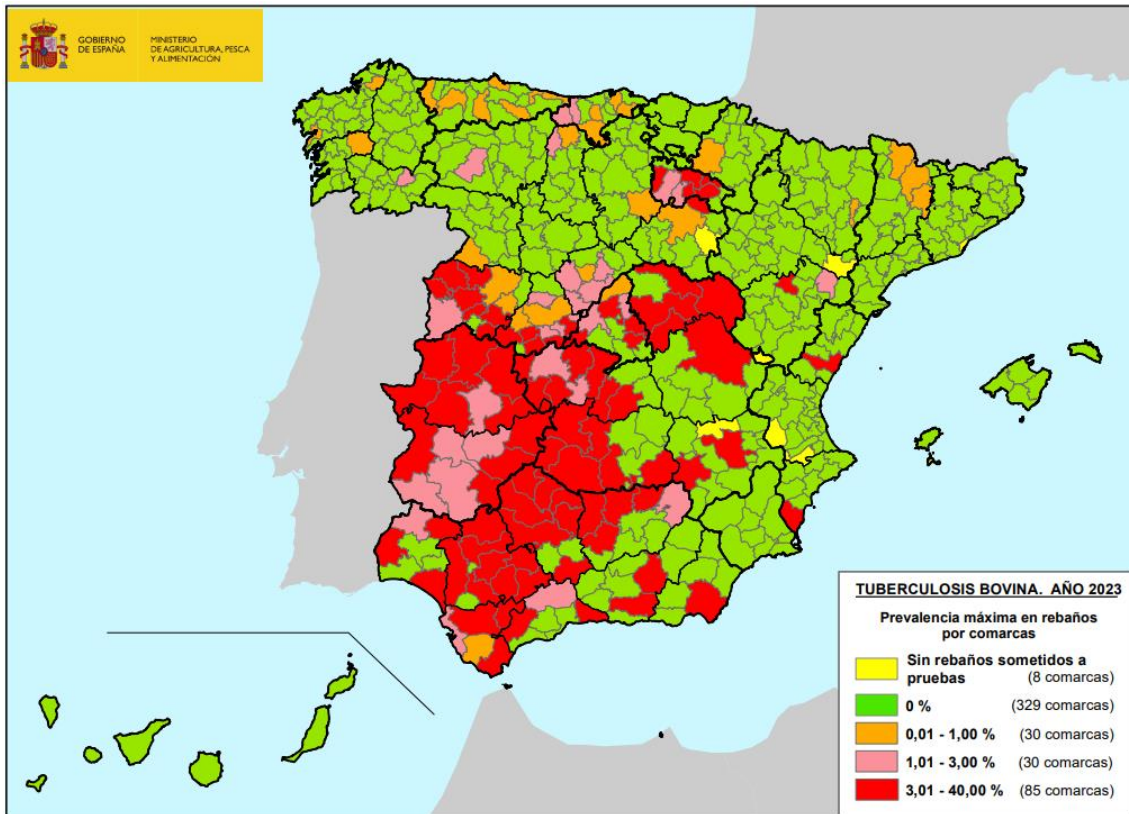
En el marco de la situación europea, entre el 2013-2022 se ha observado una reducción significativa del 46.3% en la cantidad de rebaños bovinos infectados en áreas donde la tuberculosis bovina aún no ha sido eliminada. En 2022 un pequeño porcentaje de rebaños bovinos (0.61% de todos los rebaños) dio positivo para tuberculosis bovina, lo que representa un ligero aumento con respecto al año anterior, cuando fue del 0.54% (EFSA, 2023). Actualmente los estados libres de tuberculosis en la Unión Europea son 17 y quedan 10 países que no tienen el estatus de libre de la enfermedad.

En España la tuberculosis bovina tiene una prevalencia de 1,3% (MAPA, 2023) y en el 2023 se ha sumado regiones geográficas del país que están libres y son Cataluña, Baleares y Murcia, las cuales se suman a Asturias, Canarias, Galicia y País Vasco (Figura 2). Pero la tuberculosis bovina (TB) tiene la mayor prevalencia en las regiones del centro-oeste y sur del país, donde se ubican las poblaciones más grandes de ganado vacuno y taurino (Figura 3).



**Figura 2.** Provincias libres de tuberculosis en el 2023: Las zonas verdes corresponden a las zonas oficialmente libres de tuberculosis en España. Fuente: Programa nacional de erradicación de tuberculosis bovina 2023 (Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*). Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2023\\_tcm30-640045.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2023_tcm30-640045.pdf)

No solo el ganado bovino tiene impacto esta enfermedad, también los animales silvestres actúan como reservorio de la TB. En España, el Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres (PATUBES) tiene como finalidad comprender cómo la fauna salvaje afecta a las diversas situaciones epidemiológicas de la tuberculosis bovina y también busca proponer medidas para reducir la transmisión de la enfermedad entre las especies silvestres y las domésticas (MAPA, 2024).



**Figura 3.** Prevalencia de la tuberculosis bovina en el ganado en las comarcas españolas en 2023. Fuente: Programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina 2024 (Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*). Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2023\\_tcm30-640045.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2023_tcm30-640045.pdf)

### 1.3.3. Tuberculosis en cabras

La TB puede llegar al ganado caprino a través de contacto directo entre animales mediante la inhalación de aerosoles, también la ingestión de agua o alimentos contaminados o de una forma indirecta a través de fómites dentro de la granja (Pesciaroli et al., 2014). Otras formas de que el ganado pueda contraer la infección es que el contagio se produzca durante el movimiento del ganado, manteniendo rebaños mixtos, compartiendo pastos extensivos comunales y generando de esta manera una interfaz o contacto entre rebaños mixtos-animales silvestres (Tschopp et al., 2011).

Tanto como *M. bovis* y *M. caprae* son las principales causantes de la tuberculosis en cabras (Rodríguez et al., 2011; Vidal et al., 2018) pero también se ha descrito que otros miembros del CMTB pueden infectar a los caprinos tales como *M. tuberculosis* (Cadmus et al., 2009; Tschopp et al., 2011), o *M. microti* (Michelet et al., 2016).

En Europa, la TB caprina se ha detectado en Reino Unido, Irlanda, Portugal, Italia, Francia, Grecia y España (Amato et al., 2018; Duarte et al., 2008; EFSA, 2023; Quintas et al., 2010; Rodríguez et al., 2011; Shanahan et al., 2011; ANSES, 2023). España y Grecia son los países europeos que tienen la mayor población de ganado caprino. En España tanto el *M. bovis* como el *M. caprae* afectan en conjunto al ganado, involucrando también al ganado caprino (Rodríguez-Campos et al., 2012) y también las cabras representan una fuente de infección para el ganado vacuno (Napp et al., 2013).

En España, la TB caprina se considera una enfermedad endémica, los datos disponibles sugieren que la prevalencia en los rebaños de cabras es elevada (Bezós et al. 2014; MAPA 2023; Rodríguez et al. 2011), pero es un dato que no se conoce bien debido a la ausencia de un programa oficial de control y erradicación de la TB en esta especie.

En los últimos años se han incorporado a los animales de la especie caprina en el Programa Nacional de Erradicación de TB Bovina cuando tienen interacción o comparten pastos con rebaños de ganado bovino, o cuando se detecta, a través de encuestas epidemiológicas o pruebas genéticas, que son fuente de la enfermedad para los rebaños de ganado bovino en la misma área de explotación o focos de infección (MAPA, 2024). La relación epidemiológica se determina cuando se confirma la presencia de la enfermedad en el ganado bovino en los mismos municipios donde se encuentran los rebaños de cabras. En otras palabras, se están tomando medidas para controlar la tuberculosis bovina en ganado bovino, y esto también involucra a las cabras cuando comparten pastos o campos comunales que pueden contribuir a la propagación de la enfermedad en la misma área. Son varias las Comunidades Autónomas que han implementado programas locales para el control de la tuberculosis caprina (como Murcia, Castilla y León, Andalucía, Extremadura, Valencia, Catalunya y Castilla-La Mancha) (MACAMAPA, 2023).

#### **1.4. Etiología**

##### **1.4.1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB)**

Las micobacterias pertenecen al Phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae* y del género *Mycobacterium*. El género *Mycobacterium* actualmente está compuesto por 197 especies y estas se caracterizan por ser bacilos Gram positivos, ácido-alcohol-resistentes, aeróbicas, no móviles y que no forman esporas (Kanabalan et al., 2021). Este género se clasifica en dos grupos principales; las micobacterias de crecimiento rápido en cultivo y las micobacterias de crecimiento lento en cultivo (Kanabalan et al., 2021). Pero la clasificación que es ampliamente conocida es la que se divide en micobacterias tuberculosas y no tuberculosas (Forbes et al., 2018). La TB es causada por micobacterias que están dentro del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), afecta a una gran cantidad de huéspedes ya sean estos animales domésticos, de vida silvestre y al humano. Las especies miembros del CMTB son: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. mungi*, *M. suricattae*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. canettii* y *M. pinnipedii* (Kanabalan et al., 2021). Aunque Riojas y colaboradores han propuesto que las especies miembros del CMTB pertenecen a una sola especie que es *M. tuberculosis*, ya que estas están relacionadas estrechamente entre sí, indicando que pertenecen a la misma especie y denominar variantes a lo que hoy día conocemos como especies (Riojas et al., 2018).

##### **1.4.2. *Mycobacterium caprae***

Actualmente *M. caprae* es miembro del CMTB, pero anteriormente se consideraba que *M. caprae* era una subespecie de *M. tuberculosis* (Aranaz et al., 2003). *M. caprae* es el principal agente etiológico de tuberculosis en cabras en España (Rodríguez et al., 2011). Este patógeno también se ha aislado en diferentes animales domésticos como el bovino (Napp et al., 2013), conejos de granja (Sevilla et al., 2020), ovino (Vidal et al., 2018), camélidos (Infantes-Lorenzo et al., 2020) y animales silvestres como el zorro (Pérez de Val et al., 2022), jabalíes (Ciaravino et al., 2021), cerdos (Cvetnic et al., 2006), bisonte (Didkowska et al., 2021), ciervos (Dorn-In et al., 2020), primates y elefantes (Shea et al., 2022; Yoshida et al., 2018), finalmente en humanos (Prodinger et al., 2014). En el



continente europeo se han detectado la mayoría de los casos de infección por *M. caprae* (Prodinge et al., 2014). Se han identificado tres grupos distintos relacionados filogenéticamente de *M. caprae*, un grupo que es el principal agente causal de TB en cabras en la Península Ibérica, otro de Centro y Este de Europa (Zwyer et al., 2021) y finalmente Asia (Shea et al., 2022).

### **1.4.3. *Mycobacterium microti***

*M. microti* fue descrita por primera vez como la bacteria causante de la tuberculosis en topillos silvestres (Wells and Oxon, 1937). También se ha descrito en otros animales salvajes (Michelet et al., 2021; Pérez de Val et al., 2019; Pigoli et al., 2021) y animales domésticos (Deforges et al., 2004; Michelet et al., 2015, 2017; Peterhans et al., 2020) y la infección en humanos se ha descrito en pacientes que están inmunocomprometidos (Frank et al., 2009; Horstkotte et al., 2001; Panteix et al., 2010). *M. microti* tiene una delección en la región cromosómica RD1 está relacionada con la virulencia, por este motivo se relaciona con una patogenicidad reducida (Brodin et al., 2002; Orgeur et al., 2021) y las lesiones que puedan producir en el ganado son leves o microscópicas (Michelet et al., 2016, 2017; Taylor et al., 2006).

## **1.5. Patogénesis y Respuesta Inmune**

Se ha descrito que los aerosoles generados por la tos de los individuos infectados por TB pueden contener bacilos capaces de infectar a otros individuos, siendo esta la vía de infección más común entre personas y entre la mayoría de las especies animales susceptibles (Pollock and Neill, 2002) ya que debido a su pequeño tamaño pueden llegar a bronquiolos y alveolos (Fennelly and Jones-López, 2015). Las gotículas que son de mayor tamaño tienden a caer cerca de la fuente de origen teniendo menos oportunidades de viajar por el aire más tiempo (Tang et al., 2020). Si bien la cantidad de bacterias que puede infectar a un individuo susceptible no es única ni precisa, debemos tener en cuenta que no todos los infectados pueden generar una cantidad suficiente de gotículas con micobacterias y llegar a infectar el alveolo (Arcos et al., 2011).

Otra vía importante de transmisión es la vía oral. En bovinos se ha descrito la infección de terneros por ingesta de la leche contaminada con bacilos desde las madres infectadas (Neill et al., 1994). También el consumo de otros alimentos contaminados es relevante para contraer la infección, pero en animales de pastoreo la vía oral toma relevancia ya que la micobacteria puede mantenerse en los pastizales por periodos de tiempo prolongado y en temporada de intercambio de pastos más la convivencia con otros animales silvestres eso aumenta el riesgo de que el rebaño se infecte (Goodchild and Clifton-Hadley, 2001).

La vía de entrada del patógeno puede condicionar la aparición de lesiones y la distribución de estas. En el caso de la vía oral la ingesta de bacilos puede causar lesiones localizadas en la cavidad abdominal (Serrano et al., 2018). Otro ejemplo, en bovinos que compartían comederos con ciervos infectados mostraron lesiones en cavidad torácica (Lyon et al., 2004).

El sistema inmune de los animales también es un factor determinante a la hora de desarrollar una patología grave o leve. En sistemas inmunes poco maduros o desarrollados, la infección suele inducir una patología más severa (Martín-Hernando et al., 2007). También son importantes otros factores como la dosis infectiva, en modelos animales experimentales de TB se han demostrado que a mayor dosis infectiva se desarrolla mayor patología (Fennelly and Jones-López, 2015). Koch había demostrado



el efecto dosis respuesta en sus investigaciones respecto a la tuberculosis al igual que Glover (Glover, 1944).

La virulencia de la cepa también es determinante en el desarrollo de la patogenia, tanto los factores proteicos y no proteicos permiten que el patógeno infecte, que persista dentro del huésped y evada la respuesta inmunológica del huésped (Rahlwes et al., 2023). Sabemos que los miembros del CMTB pueden infectar a cabras, pero hay especies que tienen más capacidad infectiva que otros, *M. bovis* produce más lesiones graves que *M. caprae* (Bezoz, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015).

Una vez que las micobacterias ingresan al organismo, la infección se produce cuando estas llegan a los espacios alveolares infectando a los macrófagos alveolares, en respuesta, el sistema inmunológico del huésped se activa al reconocer la estructura de la pared celular de los miembros de CMTB y esto desencadena la activación de las vías de señalización inflamatoria mediante las células dendríticas. En este proceso ocurren interacciones celulares que involucran las respuestas inmunológicas innatas y adquiridas (Arentz and Hawn, 2007) cuya función será la de intentar contener o eliminar la infección.

Si no es posible la eliminación de las bacterias causantes de la infección inicial, se induce la formación del granuloma. Los macrófagos infectados (alveolares e intersticiales), así como las células dendríticas y los macrófagos no infectados (macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas, macrófagos espumosos) contribuyen al proceso de formación del granuloma junto con los monocitos, neutrófilos y linfocitos T, y se va produciendo el daño tisular (Ehlers and Schaible, 2012; Rahlwes et al., 2023). Dependiendo de la respuesta inmunológica del huésped entonces se produce una organización del granuloma, esto quiere decir que los macrófagos infectados por el bacilo están rodeados por un anillo de linfocitos y una capsula fibrosa (Ehlers and Schaible, 2012; Rahlwes et al., 2023). Un granuloma estable y bien formado limita la progresión de la enfermedad, se forma un granuloma maduro y dentro de este se encuentran áreas o zonas necróticas con una capsula fibrosa que puede ser completa o parcial (Wangoo et al., 2005). Las bacterias pueden sobrevivir décadas o por periodos de tiempo muy prolongados dentro del huésped en estado latente dentro del granuloma ya que estos proporcionan un nicho en el que puede sobrevivir (Sandor et al., 2003). Estos granulomas suelen ser de apariencia amarillenta y se puede llegar a calcificar (Neill et al., 2001). Debemos entender que el granuloma es una lesión compleja y dinámica (Warsinske et al., 2017) y en la que ocurre una pérdida continua de células, también hay reemplazo de estas mediante reclutamiento celular y reestructuración del tejido y vasos sanguíneos. Luego en el centro necrótico de una lesión pulmonar granulomatosa se puede erosionar hacia las vías aéreas vaciándose al exterior y permitiendo la excreción de micobacterias, mientras que algunos restos necróticos permanecen dentro de la cavidad recién formada (Urbanowski et al., 2020) en estadios avanzados de la enfermedad en cabras estas pueden llegar a mostrar cavitación pulmonar (Daniel et al., 2009). Las lesiones granulomatosas cavitadas pueden liberar las micobacterias en las vías respiratorias, luego esto se propaga con la tos (Urbanowski et al., 2020).

Desde la perspectiva del huésped, cuando la micobacteria ingresa al organismo, esta puede mantenerse con una infección subclínica durante un tiempo variable, luego produce lesiones en los órganos de entrada y también en los nódulos linfáticos regionales que los drenan, esto se conoce como complejo primario (Domingo et al., 2014) y si solo afecta a linfonodos regionales se denomina complejo primario incompleto. En humanos por lo general la lesión primaria puede no avanzar y

permanecer en una fase latente, pero esta fase latente se desconoce que ocurra en bovinos (Domingo et al., 2014). Los animales que tienen una respuesta celular bastante fuerte pueden impedir el crecimiento de las lesiones y su propagación a otros órganos, pero aun así se da una cronificación de la TB en LN y puntos de entrada, posteriormente ocurre la generalización y esta puede ser en la tapa inicial (generalización temprana) o una generalización tardía (resultante de la diseminación por vía hematológica o linfática y llegar así a diferentes órganos) (Domingo et al., 2014).

A medida que la enfermedad avanza, se pueden observar signos clínicos habituales tanto en bovinos, ganado caprino y otros animales; estos son la debilidad generalizada, fiebre alta, pérdida de apetito, pérdida de peso, tos seca, luego la dificultad respiratoria y también se observa linfonodos aumentados de tamaño (OMSA, 2024).

En bovinos se describe que la lesión primaria suele estar ubicada en la región dorsal de los lóbulos pulmonares y esta lesión progresa hacia una lesión encapsulada y mineralizada, pero esto puede cambiar en animales que están inmunocomprometidos. En la actualidad, en bovinos encontrar signos clínicos y luego lesiones en necropsias o en matadero es poco frecuente ya que estos animales están sujetos a programas de erradicación y no suelen llegar a desarrollarse cuadros generalizados (Domingo et al., 2014). En cabras se logran ver con mayor frecuencia las lesiones avanzadas o TB más crónica, esto podría ser debido a que los caprinos no suelen estar sujetos a programa de erradicación propios y, en consecuencia, es más habitual hallar animales en fases más avanzadas de la infección cuando se detecta un brote en esta especie.

Los estudios de la respuesta inmune en animales (bovinos y caprinos) han proporcionado una base sólida para utilizar estas especies como modelos animales en la investigación y desarrollo de vacunas destinadas a los seres humanos (Buddle et al., 2016; Villarreal-Ramos et al., 2018) y también han sido cruciales para abordar desafíos diagnósticos, como la distinción entre los estadios de latencia y enfermedad, lo cual es de gran importancia para el tratamiento en humanos y que tienen similitud con los estadios de la enfermedad en humanos y la respuesta inmune (Pai et al., 2016; Waters et al., 2011).

La evolución de una infección depende de varios factores, algunos de los cuales son internos al organismo infectado (el hospedador) y otros están relacionados con el agente infeccioso (el patógeno del CMTB). En el caso de los factores internos del hospedador, varios elementos pueden influir en la respuesta inmunológica del organismo. Algunos ejemplos son la edad del humano infectado (Basu Roy et al., 2019) en donde se describe que los menores de 5 años y en el ganado joven también (Byrne et al., 2022), el nivel de estrés al que están sometidos los animales (Pollock and Neill, 2002a) y la presencia de otras infecciones, enfermedades, parásitos que puedan debilitar su sistema inmunológico.

### **1.5.1. Inmunidad Innata**

La respuesta innata es la primera línea de defensa del sistema inmunológico, compuesta por células especializadas y otros mecanismos de protección, como barreras físicas, químicas y biológicas. En cuanto a las células, las que desempeñan un papel fundamental son los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células T gamma delta ( $\gamma\delta$ ) y las células NK (*natural killer*). En la infección por micobacterias, el sistema inmunitario reconoce a los bacilos a través de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), desencadenando cascadas de señalización intracelular y la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-

$\alpha$ ), interferones tipo 1 (IFN), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 e IL-12 junto con quimiocinas y proteínas antimicrobianas, posterior a esto las células del sistema inmune innato son reclutados al sitio de infección, se activará la respuesta inmune adaptativa para contener dicha infección (Carrisoza-Urbina et al., 2018). No obstante, las micobacterias pueden evadir el sistema inmunitario al replicarse dentro de los macrófagos y esto conduce al desarrollo de la patología de TB (Plüddemann et al., 2011).

Durante el proceso de infección, las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos que las intentan destruir mediante la formación de fagolisosomas. Por lo tanto, la activación de los macrófagos es determinante en la eliminación de las micobacterias y la contención de la infección (Frieden et al., 2003). A su vez, los macrófagos son células presentadoras de antígenos (CPA) al igual que las células dendríticas (CD) (O'garra et al., 2013).

Las CPA en conjunto tienen una suma relevancia, estas células son las encargadas de capturar, procesar y transportar la micobacteria a los linfonodos (LN). Allí, se los presentan a los linfocitos T, lo que constituye un paso fundamental para iniciar una respuesta inmunológica específica y coordinada contra la infección por *M. tuberculosis* (Banchereau and Steinman, 1998). En bovinos la activación de los macrófagos mediante la fagocitosis de *M. bovis* induce niveles elevados de óxido nítrico con el objetivo de destruir la micobacteria en el macrófago (Esquivel-Solís et al., 2013). Pero tanto para *M. tuberculosis* y *M. bovis* se describe que han desarrollado estrategias para resistir el estrés oxidativo y así evitar la fusión fagolisosomal y esto les permitiría persistir en el fagosoma dentro de los macrófagos, creando así un nicho de supervivencia (Forrellad et al., 2019; O'garra et al., 2013).

La interacción de las CD con *M. bovis* conduce a la producción de IL-10, que tiene un efecto inhibitorio de la migración y maduración de las CD, esto ocasiona un retraso en la respuesta inmunitaria frente a la micobacteria (Hope et al., 2004). Por el contrario, también se induce la secreción de IL-12, que es fundamental para activar las células asesinas naturales (NK). Estas células NK, a su vez, liberan IFN- $\gamma$  (Parlane and Buddle, 2015) que actúa activando los macrófagos. La IL-12 también es necesaria para propiciar la migración de las CD al LN de drenaje e inducir la activación de las células T vírgenes (Khader et al., 2006).

Las células NK tienen una notable habilidad para destruir células infectadas o anormales o dañadas. Se ha demostrado que las células NK en bovinos pueden reducir la replicación de *M. bovis* en los macrófagos mediante el contacto directo con las células infectadas y la estimulación con IL-12 (Denis et al., 2007). Además de su función citotóxica, actúan como mediadores entre la respuesta inmunológica innata y la respuesta inmunológica adaptativa (Moretta et al., 2008), y también en la protección contra la infección por *M. tuberculosis* en ratones que carecen de linfocitos T, destacando su importancia en individuos con un sistema inmunológico comprometido o en pacientes con VIH/SIDA (Feng et al., 2006).

Por otro lado, se ha descrito en humanos que los neutrófilos desempeñan un papel complejo durante la infección tuberculosa, ya que son eficientes en combatir la bacteria causante de la TB, pero también pueden contribuir a una respuesta inmunitaria exacerbada que resulta en daño a los tejidos durante la infección (Dallenga and Schaible, 2016; Liu et al., 2017). En infecciones con *M. bovis*, este es capaz de sobrevivir a los neutrófilos bovinos (Wang et al., 2013).

El concepto de inmunidad entrenada sostiene que la inmunidad innata tiene también cierta memoria para responder más eficientemente frente a patógenos (Netea et al., 2011). Los monocitos, los macrófagos y las células NK se encuentran entre las principales células que se relacionan estrechamente con la inmunidad entrenada (Mulder et al., 2019). Esta inmunidad entrenada se origina debido a cambios en los patrones epigenéticos y metabólicos de estas células, y entonces las prepara para una respuesta más intensa si se enfrentan a un segundo estímulo. Aunque su duración es más breve que la memoria inmunológica adquirida y no se enfoca en un agente infeccioso específico, esta respuesta puede ser efectiva contra ese agente o incluso contra otros que no estén relacionados (van der Meer et al., 2015).

### 1.5.2. Inmunidad adaptativa

En esta respuesta participan la respuesta mediada por células y también la respuesta humoral. La respuesta inmune en el caso de la tuberculosis es predominantemente la mediada por células, principalmente de los linfocitos T CD4 que producen citoquinas del tipo Th1, el IFN- $\gamma$ , en respuesta a los antígenos derivados de las micobacterias. También, los linfocitos T CD8 desempeñan un papel importante al tener actividad citotóxica contra los macrófagos infectados, contribuyendo a la eliminación de la infección (Cooper and Khader, 2008; Flynn and Chan, 2001).

Los estudios experimentales en ratones sugieren que, en comparación con otras infecciones bacterianas, la formación de inmunidad adquirida en el caso de la tuberculosis se produce más lentamente. Esto se debe en parte a que *Mycobacterium tuberculosis*, en lugar de ser transportado de manera inmediata a los linfonodos, puede retrasar este proceso y multiplicar su población en los pulmones. Esta estrategia le permite a la micobacteria evitar una respuesta inmune eficaz y establecer una infección más crónica (Wolf et al., 2008).

Esto quiere decir que el conjunto de estas células trabaja en coordinación para desarrollar respuestas adaptativas y entrenadas contra la TB. La respuesta inmune adaptativa se basa en la memoria inmunológica y la capacidad de aprender a lidiar con miembros del CMTB con mayor eficacia en exposiciones futuras del huésped. Entonces, la inmunidad entrenada se refiere a una respuesta inmunológica mejorada después de una exposición previa a miembros del CMTB, lo que lleva a una respuesta más efectiva contra la infección.

#### 1.5.2.1. Respuesta mediada por células

Esta respuesta inmunológica mediada por células, los linfocitos T se dividen en dos subtipos principales: los TCD8 y los TCD4. Los TCD4, se han clasificado tradicionalmente en dos tipos, Th1 y Th2, aunque también pueden diferenciarse en linfocitos Th17. Como se ha mencionado anteriormente, la protección efectiva contra la tuberculosis se ha relacionado con los linfocitos TCD4. Estos linfocitos Th1 son conocidos por su capacidad de producir citoquinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Además de estas citoquinas, desempeñan diversas funciones, como reclutar monocitos y granulocitos y activar a los macrófagos. Esta activación de los macrófagos es especialmente importante para combatir la infección por *M. tuberculosis* (Cooper and Khader, 2008; Flynn and Chan, 2001). Los linfocitos TCD8 son reclutadas en el lugar de la infección y estas al ser activas proceden a la desgranulación y liberación de perforinas (Endsley et al., 2004).

En rumiantes las células T  $\gamma\delta$  también son capaces de producir IFN- $\gamma$ , aunque en niveles más bajos que las células T CD4 (Smyth et al., 2001). Hay evidencias que sugieren que

las células T  $\gamma\delta$  desempeñan un papel intermedio entre la respuesta inmunológica innata y la adaptativa y esto se observó tanto en humanos como en ganado bovino (Kennedy et al., 2002; Martino et al., 2011). Se describe que las células T  $\gamma\delta$  podrían desempeñar un direccionamiento de la respuesta inmunológica hacia Th1, ya que la interacción entre las células T WC1+  $\gamma\delta$  y las células dendríticas infectadas con *M. bovis* se observó un aumento significativo en la producción de la citoquina IFN- $\gamma$  y en la expresión de marcadores de activación en las células T WC1+  $\gamma\delta$ . También se detectó un aumento recíproco en la secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas, y esta interacción parecía depender del contacto directo entre las células (Price and Hope, 2009). Sobre este punto en caprinos, se observó que las células T  $\gamma\delta$  estaban en mayor cantidad en las lesiones cavitarias en comparación con las lesiones granulomatosas. Además, estas células estaban asociadas con un mayor número de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las lesiones cavitarias (Sanchez et al., 2011), pero en bovinos también migran al sitio de infección para la formación de granuloma de forma temprana (McGill et al., 2014).

Se ha descrito también la existencia de animales anérgicos, que están infectados, pero no responden a las pruebas de diagnóstico basadas en la respuesta inmune celular y este ha sido descrito en fases avanzadas de la TB por agotamiento del sistema inmune (Pollock and Neill, 2002) y esto podría dificultar al control de la TB en los programas de erradicación ya que son animales que darán resultados falsos negativos y con alto riesgo de excretar micobacterias.

#### **1.5.2.2. Respuesta Humoral**

Con relación a la tuberculosis, la respuesta inmunológica humoral se ha observado principalmente en las etapas avanzadas de la enfermedad. Además, se ha observado una relación entre los niveles de anticuerpos en la sangre y la evolución de la enfermedad. En bovinos y caprinos a medida que la enfermedad progresa, los niveles de anticuerpos en la sangre tienden a aumentar, lo que sugiere que los anticuerpos pueden desempeñar un papel importante en la respuesta del sistema inmunológico a medida que la enfermedad se desarrolla (Lyashchenko et al., 2004; Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012).

### **1.6. Inmunodiagnóstico**

Las pruebas inmunológicas utilizadas para el diagnóstico de la tuberculosis en cabras suelen ser las mismas que las utilizadas en los bovinos dentro del plan de erradicación de la TB.

El inmunodiagnóstico de la TB se puede abordar en dos vertientes: una basada en la respuesta celular y el otra en la respuesta humoral.

El diagnóstico de la tuberculosis en animales se basa fundamentalmente en la respuesta inmune celular inducida por la infección. Para la erradicación de la TB es fundamental la detección temprana de animales infectados. Pero en animales anérgicos, por ejemplo, solo la respuesta humoral será detectable.

#### **1.6.1. Pruebas de Intradermorreacción (IDR)**

Son las pruebas utilizadas para la erradicación de la tuberculosis bovina. Las pruebas de intradermorreacción pueden ser simple y comparada, estas pruebas se apoyan en una respuesta inmunológica de tipo IV (hipersensibilidad retardada) (Kasempimolporn et al., 2021), la cual se origina a partir de una reacción de hipersensibilidad. En este proceso, los linfocitos Th1, previamente sensibilizados tras el encuentro con el antígeno,

desempeñan un papel esencial. Estos linfocitos Th1 secretan citoquinas, lo que nos lleva a la atracción y activación de diversas células efectoras. En consecuencia, se desencadena una respuesta inflamatoria local en la que destacan los macrófagos. El punto culminante de esta respuesta se alcanza a las 48-72 horas, precisamente en el momento se debe de realizar la lectura de la prueba (OMSA 2024).

A nivel estatal las técnicas de diagnóstico oficial se describen en el Real Decreto 1047/2003. La tuberculización se realiza inyectando PPD-B (*M. bovis purified protein derivative* 2500 IU/ml) y PPD-A (*M. avium* 2500 IU/ml) en la piel del animal, de la región cervical superior. En caprinos al igual que en el ganado bovino, la técnica implica afeitar un área de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> en la zona cervical, medir el grosor de la piel en la zona rasurada utilizando un cutímetro, posterior a esto se debe inyectar las tuberculinas. La inoculación puede llevarse a cabo mediante una jeringa con el calibre adecuado para garantizar una inyección intradérmica o utilizando sistemas de inyección multidosis, ya sea con o sin aguja. El dispositivo más utilizado es la jeringa Dermojet (Akra, Francia).

En la primera parte del procedimiento, se administran tuberculinas. Esta inyección se administra en un volumen de 0,1 ml o hasta un máximo de 0,2 ml, asegurando que contenga al menos 20000 unidades internacionales (UI) de potencia. En el caso de una prueba comparativa, se administra además una inyección de PPD-A de referencia. Esta inyección se aplica en el cuello, en el lado opuesto al sitio de la inyección de PPD-B, o en el mismo lado, pero manteniendo una distancia de al menos 10 cm. Esto se hace para prevenir la aparición de reacciones superpuestas o cruzadas entre las dos sustancias.

La prueba cutánea comparada se recomienda ya que los miembros del CMTB comparten epítomos con micobacterias no tuberculosas como el MAP (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*), y si se sospecha de infecciones de otras micobacterias entonces se procede a la prueba comparada.

Después de las 72 horas se mide de nuevo el grosor del pliegue cutáneo. Los resultados se interpretan de acuerdo con el Manual de procedimiento para la realización de las pruebas de intradermorreacción y gamma-interferón (MAPA, 2019).

La interpretación de resultados se describe de la siguiente manera:

### **Resultados de la Prueba Simple**

**Resultado Negativo:** Se considera negativo cuando la diferencia en el grosor de la piel del animal hay una diferencia entre la lectura inicial y la lectura después de 72 horas, esta diferencia es de hasta un máximo de 2 mm de aumento del grosor de la piel y con ausencias de signos clínicos.

**Resultado Dudoso:** En ocasiones, la diferencia en el grosor de la piel se encuentra por encima de 2 mm e inferior de 4 mm. En este caso, se considera un resultado dudoso o inconcluso. Puede indicar una posible reacción, pero no es suficientemente concluyente para confirmar la infección.

**Resultado Positivo:** Un resultado positivo se obtiene cuando la diferencia en el grosor de la piel es significativamente mayor que el valor de la lectura basal, que va de 4 mm o más, añadiendo la presencia de signos clínicos de la enfermedad.

### **Resultados de la Prueba Comparada**

**Resultado Negativo:** En la prueba comparada, se evalúa la diferencia en la reacción entre la PPD-B y la PPD-A. Un resultado negativo se obtiene cuando ambas reacciones son negativas o cuando la diferencia en el aumento del grosor de la piel es mayor en respuesta a la tuberculina aviar que a la tuberculina bovina y con ausencia de signos clínicos.

**Resultado Dudoso:** Un resultado dudoso en la prueba comparada ocurre cuando ambas reacciones son débiles, lo que dificulta determinar cuál de las dos tuberculinas provocó la reacción. Se describe que la reacción a la PPD-B positiva o dudosa y superior en 1 a 4 mm la reacción de la PPD-A y con ausencia de signos clínicos.

**Resultado Positivo:** Un resultado positivo en la prueba comparada se obtiene cuando la reacción es más fuerte en respuesta a la tuberculina bovina que a la tuberculina aviar. Esto sugiere una reacción específica a la tuberculina bovina en más de 4 mm a la reacción de la tuberculina aviar y la presencia de signos clínicos.

Los signos clínicos a los cuales nos referimos para ambos son hinchazón, edema, exudación o necrosis.

La prueba de la tuberculina intradérmica es una herramienta valiosa en la detección y control de la tuberculosis bovina en ganaderías. Ha demostrado tener una sensibilidad aceptable a nivel de rebaño, lo que significa que es eficaz para identificar la enfermedad cuando está presente en un grupo de animales. Esta sensibilidad está correlacionada con la prevalencia de la enfermedad en el rebaño, lo que la convierte en una herramienta útil para la vigilancia y el control de la tuberculosis bovina.

Gracias a esta técnica, varios países han logrado declararse libres de la enfermedad o mantenerla a niveles mínimos de prevalencia en sus rebaños. Algunos ejemplos de países que han utilizado con éxito esta prueba para controlar la tuberculosis bovina incluyen Estados Unidos en 1941, Dinamarca en 1980, Australia en 1992, Holanda, Finlandia y Suecia en 1995, Alemania en 1997, Austria en 1999 y Francia en 2001, entre otros (Palmer and Waters, 2011; Reviriego Gordejo and Vermeersch, 2006; Sergeant et al., 2017).

La combinación de esta prueba con otras estrategias de control y el cumplimiento de regulaciones adecuadas son clave para lograr y mantener un estatus de "libre de tuberculosis bovina" en un país o región (Napp et al., 2019).

Existen investigaciones en rebaños de cabras en donde la sensibilidad y especificidad de las pruebas cutáneas simples y comparadas muestran resultados variables. Sobre la especificidad se tienen valores que van del 97,6 – 99,2 % y del 99,6% al 100% (Bezoz, Álvarez, Mínguez, et al., 2012) y otros valores de especificidad se obtuvo al utilizar una interpretación más estricta de la prueba cutánea que los valores estuvieron entre 93 y 96% (Buendía et al., 2013). La sensibilidad de la prueba también tiene variabilidades ya que en la IDR comparada e IDR simple tuvieron valores entre 53,2 - 88,8% y 29,2 – 83,7% respectivamente teniendo en cuenta las interpretaciones estándar y severa (Bezoz et al., 2012).

### 1.6.2. Prueba de liberación de interferón gamma (IGRA)

La prueba de liberación de IFN- $\gamma$  (IGRA *interferón-gamma release assay*) consiste en la detección *in vitro* de IFN- $\gamma$  después de la estimulación *ex vivo* de sangre entera con determinados antígenos. Si un individuo está infectado, las células presentadoras de antígeno (monocitos o células dendríticas) actuarán presentando los antígenos inoculados a las células T seleccionadas clonalmente frente estos antígenos que

circulan en sangre periférica y estas en respuesta proliferarán y liberarán IFN- $\gamma$  en las 16-24 h posteriores a la estimulación. Esta técnica fue desarrollada para bovinos (Rothe et al., 1990; Wood and Jones, 2001). También esta técnica es capaz de detectar animales infectados en una etapa más temprana de la infección.

Esta técnica consta de dos partes:

Primeramente, la toma de muestras de sangre completa en tubos con heparina, que deben ser enviados de forma inmediata a temperatura ambiente al laboratorio (las muestras deben procesarse en menos de 8 horas desde su toma) para la estimulación en placas de cultivo con antígenos de las micobacterias (PPD-B y PPD-A), con PBS para control. Posteriormente, las sangres con los estímulos se incuban durante 16-24 horas o toda la noche a una temperatura de 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

El paso dos de este procedimiento se inicia tras el periodo de incubación de estas muestras. Se separa y recoge el plasma sanguíneo y se detecta y cuantifica el IFN- $\gamma$  liberado en el plasma mediante un ensayo inmunoenzimática ELISA.

La técnica es frecuentemente utilizada en estudios experimentales en caprinos. El IFN- $\gamma$  estimulada con PPD-B se puede detectar entre dos y cuatro semanas tras la infección experimental con CMTB (Bezós et al., 2010; Pérez de Val et al., 2011).

Actualmente esta prueba es complementaria para las pruebas de IDR, está incluida en la Directiva Europea 64/432. Esta prueba utilizada en paralelo con las pruebas IDR permite detectar más animales infectados, reduciendo así el tiempo de progresión de la infección y favoreciendo la eliminación de la micobacteria de los rebaños.

### **1.6.3. Pruebas basadas en la respuesta humoral**

Cuando los animales se infectan con el CMTB, pueden generar anticuerpos específicos. En bovinos la respuesta del sistema inmunológico relacionada con la producción de anticuerpos, detectada mediante pruebas serológicas, generalmente se asocia con etapas avanzadas de la infección, a diferencia de la respuesta temprana que se detecta mediante pruebas que evalúan la respuesta celular (Welsh et al., 2005). En cabras, se ha observado que la seroconversión a la proteína MPB83 después de una infección experimental con *M. caprae* se produjo de manera débil en algunos animales en las primeras semanas. Sin embargo, se vuelve más evidente en la mayoría de los casos a partir de las ocho semanas de infección, aunque esta respuesta no es uniforme en todos los individuos y además se observó un aumento en los títulos frente MPB83 en todos los animales dos semanas después de la intradermorreacción (Pérez de Val et al., 2011). No obstante, es importante señalar que, en otros estudios realizados en cabras, se ha observado un aumento temprano en la respuesta a la proteína MPB83 a las cuatro o cinco semanas después de la infección experimentalmente (Arrieta-Villegas et al., 2018; Pérez de Val et al., 2013). Es cierto que esta variabilidad en la cinética de la respuesta puede estar influenciada por las condiciones de las infecciones experimentales.

Los estudios publicados en ganado caprino también han descrito una amplia gama de valores de sensibilidad del ELISA de detección de anticuerpos en suero, que varían desde 54,9% hasta 95,6%, y de especificidad, que oscilan entre el 88% y el 100% (Bezós, Álvarez, Romero, et al., 2012).

La respuesta humoral y su detección por medio de técnicas serológicas de detección de anticuerpos han sido asociadas con una fase avanzada o tardía de la infección por TB, los antes mencionados animales anérgicos, contrastando de esta manera con la



respuesta temprana detectada por pruebas de base celular, pero pueden ser importantes excretores de micobacterias y constituir una fuente de infección para los animales sanos (Pollock et al., 2005; Welsh et al., 2005).

### 1.7. Evaluación de la lesión tuberculosa

La evaluación de la lesión tuberculosa se refiere al proceso de examinar y analizar las lesiones causadas por la infección tuberculosa. Esta evaluación es fundamental para entender la gravedad que causa la TB, su extensión y el impacto causado dentro del animal.

Las pruebas de diagnóstico *antemortem* junto con la evaluación de la lesión tuberculosa son esenciales para determinar también la eficacia de las vacunas ya que en estudios realizados en caprinos se comparan los resultados entre animales vacunados y no vacunados, y de esta manera determinar si la vacuna ha logrado reducir o modular las lesiones asociadas a la tuberculosis (Arrieta-Villegas et al., 2018; Bezos et al., 2017).

En este contexto, la combinación de técnicas de diagnóstico como la Anatomía patológica y la Tomografía axial computarizada (TAC) proporcionan una visión más detallada de la presencia y extensión de lesiones compatibles con tuberculosis (LCTB), es decir, presencia de granulomas, sobre todo en pulmones y linfonodos (LN) (Pérez de Val et al., 2013; Vidal et al., 2017).

#### 1.7.1. Diagnóstico Anatomopatológico

La vigilancia de la tuberculosis animal mediante el diagnóstico anatomopatológico es el elemento clave de vigilancia pasiva de la tuberculosis en mataderos y esta se enfoca en identificar LCTB en canales y vísceras de animales destinados al consumo humano. Siendo en regiones libres de tuberculosis una vía importante de detección de nuevos brotes.

Además, en mataderos desempeña un papel clave para confirmar sospechas: animales sacrificados tras obtener resultados positivos a pruebas *antemortem*. Con esto se identifican LCTB macroscópicas, se toman las muestras correspondientes de las lesiones (o también de nódulos linfáticos en caso de no presentar lesiones visibles) de los animales para su posterior observación microscópica.

Identificar y localizar las lesiones macroscópicas es clave para poder confirmar la enfermedad puesto que las micobacterias se encuentran en dichas lesiones y esa será la muestra con mayores garantías de detección (vía PCR y/o cultivo microbiológico) del agente causal.

Tras un examen macroscópico las muestras de tejido son evaluadas mediante histopatología con la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) para determinar la presencia de lesiones microscópicas compatibles con tuberculosis y la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) específica para identificar bacilos ácido-alcohol-resistentes (BAAR) o mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para las micobacterias. El estudio microscópico permite descartar otras etiologías que pueden causar lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis (granulomas fúngicos, piogranulomas bacterianos, parasitarios, etc).

Los estadios de los granulomas se pueden clasificar en cuatro tipos: I (inicial), II (sólido), III (necrosis mínima) y IV (necrosis y mineralización) (Wangoo et al., 2005). Esta clasificación nos ayuda a interpretar el desarrollo y cronicidad de las lesiones y reconocer las desviaciones de la progresión normal del granuloma como las inducidas

por vacunación (encapsulados y contenidos) (Domingo et al., 2014; Pérez de Val et al., 2013).

### 1.7.2. Tomografía axial computarizada (TAC)

En contexto de estudios sobre la tuberculosis animal, la TAC es utilizada para cuantificar de forma objetiva el volumen de las lesiones en pulmón, cómo se distribuyen y desarrollan estas lesiones dentro del pulmón (Balseiro et al., 2017), así como para determinar características sobre la evolución de estas lesiones, como puede ser el grado de mineralización (Arrieta-Villegas et al., 2018). En caprinos los primeros estudios en utilizar la TAC evaluaron, a parte del volumen de lesiones, la dispersión de esta en función del número de lóbulos afectados por la patología de la TB en cada animal (Pérez de Val et al., 2011, 2013). Con el uso de TAC se obtiene información del desarrollo de la patología de la TB a nivel pulmonar en caprinos y ovinos (Domingo et al., 2018), dinámica de la infección en conejos (Via et al., 2012), pulmones de cerdos, ratones y humanos (Kockelkorn et al., 2014). Por lo tanto, mediante el uso de TAC en estudios se obtiene un mayor conocimiento sobre el tipo de lesiones que pueda ocasionar la infección por CMTB (lesiones calcificadas, cavitarias y la distribución de estas). En humanos se desarrollan además modelos de aprendizaje automático mediante algoritmos para capturar características de las lesiones de TB pulmonar (Tan et al., 2024).

### 1.8. Cultivo microbiológico y Biología molecular

El cultivo microbiológico es la prueba de referencia para confirmar si un animal está o no infectado de TB. Los miembros del CMTB son de lento crecimiento, por lo cual el cultivo es de larga duración (llegando hasta 3 meses), si bien mencionamos que el cultivo positivo confirma el patógeno causante de la TB, la ausencia de crecimiento no descarta la infección del animal muestreado ya que este resultado negativo puede depender de varios factores (estadio de la infección del animal, el tipo de lesión que se muestrea del tejido o la correcta toma de esta). El cultivo se puede realizar en medios sólidos y en líquidos. Los medios de cultivo sólidos se dividen a su vez en: medios basados en agar como el Middlebrook 7H10 o 7H11 o basados en huevo entero como el Löwenstein-Jensen con piruvato de sodio o Coletsos. En medio líquido el más empleado es el Middlebrook 7H9. Basado en este medio se ha desarrollado el MGIT™ (*Mycobacteria Growth Indicator Tubes*) de BD diagnostics para el uso con el sistema BACTEC™ de la misma compañía. Este sistema de cultivo líquido se basa en detectar las variaciones en la concentración de CO<sub>2</sub> como producto de crecimiento de la micobacteria a través de un sensor fluorimétrico de gases. La identificación de los aislados de los cultivos (sólidos o líquidos) se suelen realizar a través de métodos de PCR.

Un parámetro relevante para evaluar la eficacia de una vacuna *postmortem* es evaluar la carga bacteriana, que se puede cuantificar a partir del cultivo cuantitativo de micobacterias (Pérez de Val et al., 2011), aunque en diversos estudios sobre la eficacia de vacunas contra la TB, también se ha utilizado la PCR cuantitativa (qPCR) como herramienta para observar la carga bacteriana en las lesiones en animales vacunados o no vacunados, o para comparar una vacuna con otra (Arrieta-Villegas et al., 2018; Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020; Balseiro et al., 2017).

## 1.9. Estrategias de control de la tuberculosis

El control de la TB en cabras sigue siendo un desafío pendiente para la salud pública y animal a nivel mundial. En España los rebaños caprinos relacionados epidemiológicamente, que conviven o comparten pastos con el ganado bovino se incluyen dentro del Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina. Pero cabe mencionar que, en comunidades autónomas como Andalucía, Aragón, Asturias, Baleares, Castilla la Mancha, Castilla y León, Catalunya, Extremadura, Murcia y Valencia cuentan con programas específicos para el control de la TB en el ganado caprino. En cuanto a los diagnósticos utilizados para el control son:

*Antemortem:* IDR (Intradermorreacción, simple y comparada), IGRA, serología.

*Postmortem:* Diagnóstico anatomopatológico con la vigilancia en los mataderos, también vigilancia en fauna silvestre, detección del CMTB mediante técnicas moleculares (PCR), mediante técnicas bacteriológicas de cultivo tanto líquido como sólido.

### 1.9.1. Prueba y sacrificio

Considerando la premisa fundamental de sacrificar cualquier animal con resultado positivo al diagnóstico, en el marco del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina (PNETB) (MAPA, 2024) se establece que los animales deben ser sometidos periódicamente a las pruebas de diagnóstico de IDR (simple o comparada) y en determinadas circunstancias el IGRA, para otorgar y mantener el estatus libre de la enfermedad a los rebaños.

Se establece una nomenclatura común para las calificaciones del estatus sanitario de las explotaciones de ganado caprino incluidos en el PNETB:

**TC1:** son los establecimientos que se desconoce su estatus sanitario en los últimos 12 meses.

**TC2:** se refiere a los establecimientos de los que se conocen los antecedentes clínicos o diagnósticos de los últimos 12 meses y el cual se realizan pruebas para obtención de la calificación T3. En este se incluye T2+ (última prueba en el rebaño con resultado positivo) y T2- (última prueba con resultado negativo).

**TC3:** establecimientos oficialmente libres de tuberculosis, con resultados negativos a dos pruebas separadas entre sí de 6-12 meses. Sin signos clínicos de TB. Aquí se incluyen los establecimientos **TC3s** (con calificación suspendida por distintos motivos, en tanto se resuelve la suspensión del estatuto con nuevas pruebas o pasa a **TCr**). **TCr** (establecimientos que en los 12 meses anteriores ostentaba la calificación TC3, pero se retira dicha calificación). Tanto así **TCr** incluyen **TCr+** (última prueba del rebaño con resultado positivo) y **TCr-** (última prueba del año con resultado negativo).

### 1.9.2. Vacunación

La vacunación con BCG contra la TB en ganado bovino en España no está permitida actualmente por la legislación de la Unión Europea (Directiva 78/52/CE) ya que no confiere una plena protección a los animales vacunados y pueden causar interferencias en las pruebas IDR tanto simple como comparada (Directiva 64/432/EC).

A nivel general contra la tuberculosis, la vacuna más utilizada ha sido la vacuna viva atenuada *M. bovis Bacille Calmette-Guérin* (BCG), que es la única vacuna autorizada para humanos y, recientemente para tejones en el Reino Unido (Chambers et al., 2014).

En el caso de los animales se han realizado múltiples estudios de seguridad y eficacia de la BCG. En ganado bovino se han llevado a cabo estudios de campo en bovino en diferentes países, como en Chile (Ábalos et al., 2022a; Contreras et al., 2023), Nueva Zelanda (Nugent et al., 2018), Etiopia (Ameni et al., 2018; Bayissa et al., 2021), en México (Lopez-Valencia et al. 2010) y Reino Unido (Holder et al., 2023; Hope et al., 2023).

En las cabras, los primeros ensayos de eficacia de vacunas antituberculosas fueron utilizando la vacuna RUTI basada en *M. tuberculosis* inactivado (Domingo et al., 2009), y posteriormente con la BCG (Pérez de Val et al., 2013; Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012). Los animales vacunados con BCG potenciada con AdAg85A mostraron una reducción de la patología en los pulmones y LNs pulmonares en comparación con los vacunados solamente con la BCG (Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012) y la BCG reforzado con AdTBF mostraron también una reducción del volumen de la lesión pulmonar y una reducción de la carga bacteriana (Pérez de Val et al., 2013). En condiciones de campo se ha demostrado la seguridad de la vacuna BCG en cabras (Pérez de Val et al., 2016a). También se han realizado estudios con otras vacunas vivas atenuadas, como con la SO2 (cepa *M. tuberculosis* modificada genéticamente basada en la inactivación del regulador transcripcional *phoP*) y MTBVAC, que se basa en dos deleciones independientes en los genes *phoP* y *fadD26* de *M. tuberculosis* (Bezós et al., 2017; Roy, Tomé, et al., 2019). En caprinos, la vacunación puede usarse también como herramienta para disminuir la prevalencia de la tuberculosis en los rebaños y se ha observado además que la revacunación con BCG mejora la protección de los animales desafiados con *M. caprae* (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Arrieta-Villegas, Martín, et al., 2020). En Otros ensayos fueron realizados con la vacuna inactivada por calor HIMB (*heat-inactivated M. bovis*) demostrando protección contra la infección por TB (Arrieta-Villegas et al., 2018; Arrieta-Villegas, Infantes-Lorenzo, et al., 2020; Roy et al., 2018; Vidal et al., 2017). Otra vacuna inactivada por calor que ofrece cierta protección a los animales desafiados con a *M. caprae* es la vacuna contra la paratuberculosis Silirum® (Pérez de Val, Nofrarías, et al., 2012) y recientemente una vacuna viva recombinante VPM1002 y sus derivados (Figl et al., 2023).

### 1.9.3. Diferenciación entre animales vacunados e infectados (DIVA)

El diseño de los reactivos DIVA para diagnóstico utilizando BCG se basa en la selección de antígenos codificados en la región RD1, que está ausente en el genoma de BCG. ESAT-6 y CFP-10 son antígenos codificados por genes de la región RD1 y se han utilizado para la estimulación de sangre completa en el IGRA en ganado en condiciones de campo (Bezós, Casal, et al., 2014; Vordermeier et al., 2001). Estos antígenos también se han utilizado para pruebas de intradermorreacción en el ganado (Jones et al., 2022; Srinivasan et al., 2019).

La principal desventaja para la implementación de programas de vacunación en animales es su interferencia con las pruebas de diagnóstico actuales de la TB basada en tuberculinas. En el caso de las cabras, estudios previos donde se utilizaron las vacunas BCG, HIMB y MTBVAC han mostrado interferencias diagnósticas con las pruebas cutáneas simple y comparada y el IFN- $\gamma$  estándar utilizando tuberculinas (Pérez de Val et al., 2016a; Roy, Tomé, et al., 2019). Debido a esto, se han realizado diversos estudios en bovinos para desarrollar antígenos específicos DIVA para diferenciar los animales infectados de los vacunados y así superar dicha interferencia (Chandran et al., 2019; Srinivasan et al., 2019). En los estudios en caprinos, el cóctel de proteínas ESAT-6 y CFP-10 en ensayos de IFN- $\gamma$  han mostrado también ser prometedores (Pérez de Val, Nofrarías, et al., 2012). Diversos candidatos a reactivos DIVA en las pruebas IDR

también se han evaluado en cabras vacunadas con BCG y, si bien en algunos estudios no se observaron interferencias (Bezoz, Casal, Romero, et al., 2015), algún candidato ha visto comprometida su especificidad, particularmente tras la revacunación con una segunda dosis de BCG (Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020).

### **1.10. Modelos experimentales de tuberculosis**

Los modelos experimentales de la tuberculosis son sistemas que se utilizan para estudiar diversos aspectos de la enfermedad, estos modelos pueden ser *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. El modelo *in vitro* en TB se puede utilizar para ensayos de inhibición del crecimiento de las micobacterias evaluando así la inmunidad protectora y eficacia de vacunas contra la enfermedad (Tanner et al., 2016), o para ensayos farmacológicos contra TB (Wallis et al., 2001), para estudios de las respuestas de los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* (Estrella et al., 2011; Theus et al., 2004). En el modelo *in silico*, basado en modelos matemáticos, permite realizar estudios sobre la dinámica de la infección pulmonar desde estado latente a un estado activo y la formación del granuloma (Català, Bechini, et al., 2020; Català, Prats, et al., 2020). Los estudios en la tuberculosis con modelos *in vivo* son fundamentales para entender la enfermedad, los modelos animales representan una valiosa herramienta para el estudio y desarrollo de nuevas estrategias para el control de la TB.

#### **1.10.1. Modelos Animales**

Estos modelos tienen como base la existencia de cierta similitud de signos clínicos de la TB en humanos, su patología y también en la respuesta inmune con los animales. En este apartado se describen los modelos animales desarrollados hasta ahora:

##### **1.10.1.1. Ratón**

El modelo ratón (*Mus musculus*) es una elección muy frecuente debido a su bajo costo, viabilidad de su uso en el laboratorio, genéticamente manejable, disponibilidad de cepas endogámicas, lo que facilita los estudios inmunológicos en esta especie frente a la enfermedad (Gong et al., 2020; Hunter et al., 2023; Williams and Orme, 2016). En estos animales se han aplicado diferentes vías de infección como el aerosol, la vía intranasal, intraperitoneal, intravenosa y la intratraqueal. Aunque los ratones sean susceptibles a la infección una de las desventajas en este modelo es que varias cepas de estos ratones no son capaces de formar granulomas y controlar la infección (Chadwick et al., 1998). Pero mediante el manejo de cepas endogámicas de ratones se ha podido realizar la evaluación de la formación de un granuloma necrótico (Driver et al., 2012). Recientemente también se estudiaron la formación granulomas en el modelo ratón humanizado, en donde en estos animales se ha hecho un trasplante de células madre hematopoyéticas derivada del hígado fetal humano (Arrey et al., 2019).

##### **1.10.1.2. Rata**

El modelo de rata (*Rattus spp.*) al igual que el ratón es también susceptible a la TB, es un modelo de bajo costo y fácil manejo de los animales (Gong et al., 2020). Se han realizado desafíos o infecciones experimentales por las vías intratraqueal, intravenosa, aerosol, intraperitoneal y subcutáneo (Elwood et al., 2007; Gray et al., 1961; Lefford et al., 1973; Sugawara et al., 2004). Se describe que las ratas no son resistentes a la infección por *M. tuberculosis*, desarrollando lesiones características de la TB pulmonar asimilándose a la de los humanos (Gaonkar et al., 2010). En el modelo de las ratas los granulomas formados en pulmón existen una acumulación de macrófagos espumosos rodeados por una gran cantidad de linfocitos, células epitelioides y células gigantes

multinucleadas (Singhal et al., 2011). Pero en este modelo, la necrosis central no es caseosa, como se describe en humanos (Sugawara et al., 2006).

#### 1.10.1.3. Conejillo de indias

Los conejillos de indias han sido fundamentales en la investigación de la tuberculosis durante más de un siglo. Son altamente susceptibles a *M. tuberculosis* y pueden infectarse mediante la inoculación de dosis bajas por las vías; aerosol (la más comúnmente utilizada), las vías subcutáneas o intrapleurales (Allen et al., 2004; Ordway et al., 2007; Sugawara et al., 2009). Después de la infección, desarrollan síntomas similares a los de la tuberculosis en humanos, también granulomas necróticos rodeados de linfocitos, macrófagos y cápsulas fibróticas. Sin embargo, la cavitación (formación de cavidades) es rara en estos animales, lo que puede limitar su utilidad como modelo para estudiar terapias o vacunas contra la tuberculosis (Chan et al., 2020; Clark et al., 2015; Hunter et al., 2023; Martínez et al., 2019). En esta especie también se evaluaron el desempeño de pruebas cutáneas con tuberculinas y otros antígenos en animales desafiados por micobacterias tuberculosis y no tuberculosis (Fernández-Veiga et al., 2023; Weldingh and Andersen, 2008).

#### 1.10.1.4. Conejo

La especie neozelandés blanco es la más utilizada en este modelo (Arrazuria et al., 2017), el modelo conejo es empleado para el desarrollo de investigaciones en aspectos farmacológicos (Rifat et al., 2018), para evaluar vacunas o patología inducida por micobacterias como por ejemplo la infección con *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* HN878 (Chen et al., 2017; Dannenberg, 2009; Sun et al., 2012; Tsenova et al., 2007), cepas de *M. tuberculosis* como Erdman, CD1551 o la misma H37Rv tienen capacidad de producir lesiones pulmonares (Manabe et al., 2003). También se ha descrito que en conejos infectados experimentalmente con *M. bovis* la enfermedad es progresiva y tiene una diseminación extrapulmonar (Nedeltchev et al., 2009). También se ha informado sobre infección natural de conejos con *M. caprae*, se observó granulomas coalescentes con necrosis extensa, mineralización deficiente en los pulmones, formación de cavidades, se observaron en pulmones mayor cantidad de BAAR y también lesiones extrapulmonares como en el riñón (Sevilla et al., 2020). Finalmente se han descrito algunos casos de conejos con una patología compatible con TB por infección con *M. avium*, una micobacteria no tuberculosa (Arrazuria et al., 2017).

#### 1.10.1.5. Pez cebra

En el modelo pez cebra (*Danio rerio*) se cuentan con dos submodelos que son el pez cebra en forma de embrión y el adulto (Singh et al., 2018; Van Leeuwen et al., 2014). Se ha reportado que el pez cebra puede infectarse naturalmente con *M. marinum* (Bouz and Al Hasawi, 2018), especie no incluida en el CMTB, pero filogenéticamente cercana a este (Tonjum et al., 1998). Después de la infección de los peces con *M. marinum* en estos animales también se forman granulomas (Volkman et al., 2010), y la formación de estos son similares a la de los humanos (Davis et al., 2002; Swaim et al., 2006). Este modelo ayudó a estudiar la inmunidad innata y el estadio temprano de los granulomas (Meijer, 2016), se ha utilizado para estudiar la infección latente (Parikka et al., 2012) y estudios sobre eficacia de la vacuna HIMB en estos animales (López et al., 2018).

#### 1.10.1.6. Primates no humanos

Este modelo animal ha sido de gran importancia para el desarrollo de vacunas y aprobación de estas, además los síntomas que genera la enfermedad son similares a la

de los humanos (Scanga and Flynn, 2014). Los animales habitualmente utilizados en el modelo son: Macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) en el cual se han realizado diversos estudios sobre la evolución de la enfermedad post vacunación con BCG a través de la vía intravenosa (Barclay et al., 1970; Harris et al., 2018); en Macacos *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) en estudios sobre el volumen de la lesión en pulmón mediante resonancia magnética (Sharpe et al., 2009) y vacunación (Larson et al., 2023) y en el Titi de penacho blanco (*Callithrix jacchus*) estudios farmacológicos para el tratamiento contra la enfermedad (Via et al., 2015).

#### 1.10.1.7. Modelo Bovino

La patología de TB en estos animales se desarrolla en el pulmón, el tracto respiratorio y también en los linfonodos y las lesiones típicas son granulomas, pero a pesar de que esto es comparable con la de los humanos (Neill et al., 2001; Pollock et al., 2006), uno de los inconvenientes es que en los bovinos no se presentan cavitaciones, representa un modelo con un coste elevado y la dificultad de albergar animales grandes bajo condiciones de alta contención (Van Rhijn et al., 2008). En estudios experimentales en bovinos se realizaron inoculaciones del patógeno por diferentes vías: mediante aerosoles (Palmer et al., 2002), intravenoso, subcutáneo (Waddington and Ellwood, 1972), intradérmico (Whelan et al., 2012), intranasal (Canto Alarcon et al., 2013), intratraqueal (Buddle et al., 2002), endobronquial (Villarreal-Ramos et al., 2018), oral (Jones et al., 2016). Los ensayos en bovinos son muy útiles para estudios de respuesta temprana frente a la infección y la respuesta podría variar dependiendo de la vía de inoculación (aérea por nebulización, intratraqueal e intranasal) del agente patógeno (Waters et al., 2006). El modelo bovino ha sido eficaz para evaluar la eficacia de la vacuna BCG en el contexto de transmisibilidad en rebaño (Ameni et al., 2018). Pero modelo bovino representa una ventaja a la hora de realizar investigaciones sobre TB dentro de la misma especie.

#### 1.10.1.8. Modelo Caprino

En el ganado caprino, el agente causal de la TB es principalmente *M. caprae* dentro de la Península Ibérica (Aranaz et al., 2003) o *M. bovis* en otras regiones geográficas diferentes a la Península Ibérica (EFSA, 2023) dependiendo del contexto epidemiológico, pero las cabras son susceptibles a otros miembros del CMTB (Cooke et al., 2023; Napp et al., 2013; Rodríguez, Bezos, Romero, de Juan, Álvarez, Castellanos, Moya, Lozano, Tariq Javed, et al., 2011). El modelo caprino es uno de los más sugeridos para el estudio de la TB activa humana ya que las lesiones caseosas, granulomatosas y también las lesiones cavitarias se asemejan a las de los humanos (Pérez de Val et al., 2011). Estos animales pueden manifestar una patogénesis natural a bajas dosis de infección comparándose también de esta manera como el ganado bovino siendo de utilidad para estudios en rumiantes (Ramirez et al., 2003).

En este modelo se han realizado infecciones experimentales por diferentes vías, la más frecuente es por la vía endobronquial (Arrieta-Villegas et al., 2018; Pérez de Val et al., 2011, 2013; Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012), por aerolización intratraqueal (Gonzalez-Juarrero et al., 2013), inyección transtorácica (Bezós et al., 2010), intrabronquial (Wedlich et al., 2022). También se cuenta con estudios realizados con infecciones por contacto directo con cabras infectadas de forma controlada (Roy, Díez-Guerrier, et al., 2019; Roy et al., 2018). Al ser un animal susceptible a la infección, se han llevado a cabo desafíos con diferentes miembros del CMTB (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*) y estas han mostrado diferencias en los cuadros clínicos y la severidad de la patología de los animales (Bezós, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015).





## **2- HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPOTESIS**

El uso y optimización del modelo caprino de infección experimental con micobacterias causantes de TB permitirá evaluar y mejorar las herramientas de prevención y control de la TB.

## **OBJETIVOS**

Esta tesis tiene como objetivo general la optimización del modelo experimental de TB caprina con una aproximación multidisciplinar para la evaluación y el desarrollo de nuevas estrategias vacunales y diagnósticas.

Para cumplir con este objetivo general se plantearon 3 objetivos específicos:

1. Evaluar comparativamente la eficacia protectora de una autovacuna basada en *M. caprae* inactivada por calor (HIMC) en animales desafiados experimentalmente con la misma cepa de *M. caprae*, frente a una vacuna heteróloga basada en *M. bovis* inactivada por calor (HIMB) (Estudio I).
2. Comparar las principales características patológicas y la progresión de la infección tuberculosa en animales desafiados experimentalmente con *M. caprae* por las vías de inoculación endobronquial y la nebulización intranasal (Estudio II).
3. Evaluar los efectos sobre el inmunodiagnóstico y caracterización de los parámetros de infección de TB en cabras expuestas experimentalmente a *M. microti* por diferentes vías y a diferentes dosis (Estudio III).



### **3. ESTUDIO I:**

## **A proof-of-concept study to investigate the efficacy of heat-inactivated autovaccines in *Mycobacterium caprae* experimentally challenged goats**

Melgarejo, C., Planas, C., Cobos, A., Arrieta-Villegas, C., Sevilla, I. A., Bezos, J., Moll, X., Espada, Y., Garrido, J. M., Domingo, M., Vidal, E., & Pérez de Val, B. (2022). A proof-of-concept study to investigate the efficacy of heat-inactivated autovaccines in *Mycobacterium caprae* experimentally challenged goats. *Scientific reports*, 12(1), 22132. <https://doi-org.are.uab.cat/10.1038/s41598-022-26683-0>



### 3.1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria that affects humans and a wide range of domestic animals and wildlife. Animal TB is a zoonotic disease that still represents an important public health issue, particularly in middle and low-income regions where it is estimated to cause up to 10% of human TB cases in some countries (Gompo et al., 2020). Hence, the control and eradication of TB requires a One Health approach.

Domestic goats are particularly susceptible to this disease (Pérez de Val et al., 2011), which is mainly caused by *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium bovis* (Daniel et al., 2009). The goat population in Spain was approximately 2.7 million in 2020 FAOSTAT, accessed on 12/07/2022), being the second largest census of the European Union after Greece. Goat herds are not yet subjected to a National Eradication Program, except for those epidemiologically related with cattle (MAPA, 2021). Caprine TB causes relevant economic losses on the goat industry in endemic areas (Cvetnic et al., 2007; Daniel et al., 2009; Seva et al., 2002) and infected goats pose a risk of infection to other animal species such as cattle or wildlife, and humans (Rodríguez et al., 2011).

Alternative approaches to control livestock TB, such as test-and-segregate or vaccination are being prospected when strict test-and-cull strategies are unfeasible for logistic, economic, or cultural reasons (Ábalos et al., 2022a; Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Marais et al., 2019; Srinivasan et al., 2018). In some European regions, vaccination can be an ancillary tool for the control of TB in non-bovine domestic and wild animals in areas with a high burden of TB, particularly in those where multi-host maintenance communities have been identified (Santos et al., 2020) hampering the success of bovine TB eradication campaigns.

The safety, immunogenicity, and efficacy of *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), the only vaccine against TB licensed so far for humans, and badgers in the UK, has been evaluated in goats in experimental and natural infection settings (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Bezos et al., 2017; Roy, Tomé, et al., 2019; Vidal et al., 2017). However, BCG stability in environmental conditions could be limited and an eventual transmission to other livestock or wildlife species cannot be ruled out (Buddle et al., 2018; Palmer et al., 2009). Therefore, inactivated mycobacterial vaccines have been also assessed in experimentally (Arrieta-Villegas et al., 2018) and naturally (Domingo et al., 2009; Roy et al., 2018) infected goats.

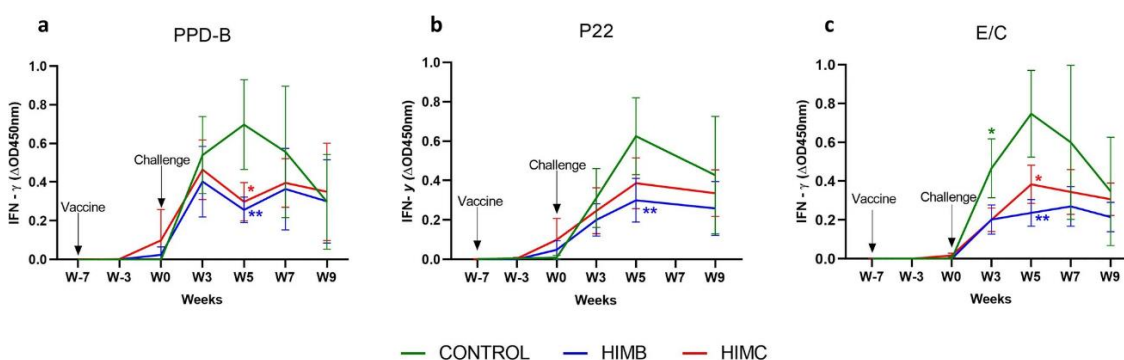
This study was conceived as an autovaccine proof-of-concept to assess the efficacy of a heat-inactivated *M. caprae* (HIMC) vaccine in goats experimentally challenged with the

same strain of *M. caprae* used to prepare the vaccine, and to compare it to goats vaccinated with a previously characterized heterologous vaccine based on heat-inactivated *M. bovis* (HIMB)(Arrieta-Villegas et al., 2018).

## 3.2. Results

### 3.2.1. Cell-mediated immune responses after vaccination and challenge

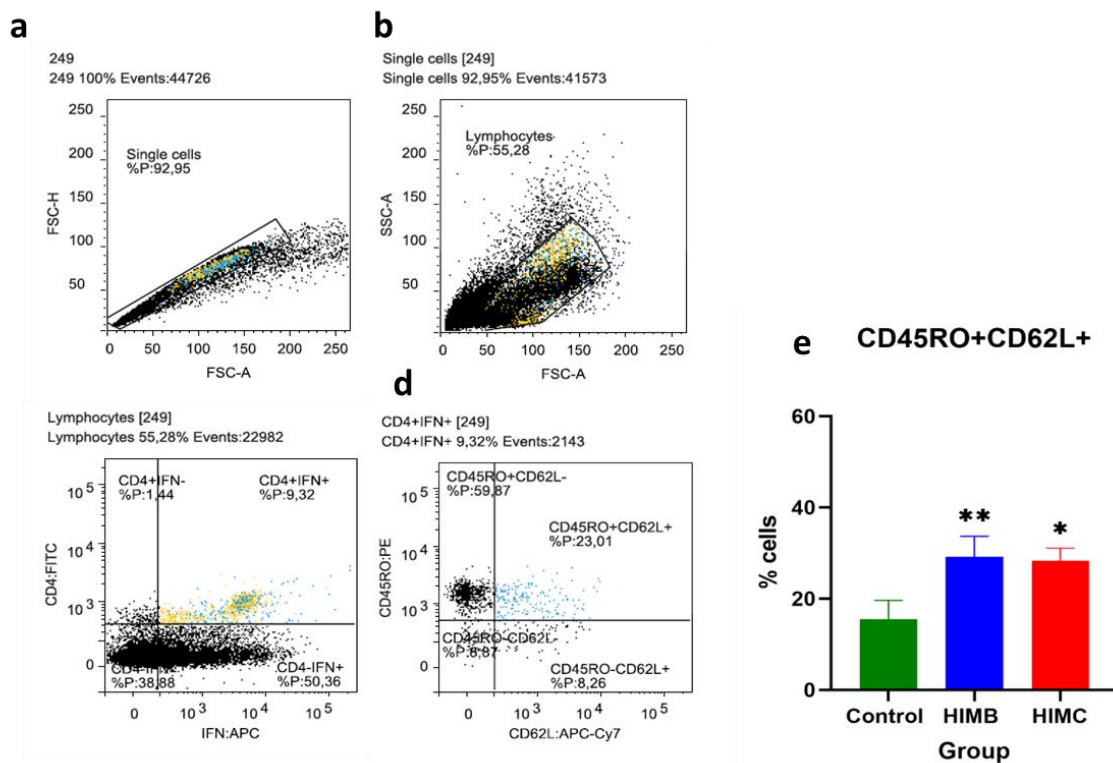
The mean antigen-specific whole blood IFN- $\gamma$  responses before and after challenge for each treatment group are depicted in Fig. 3.1. A mild increase of IFN- $\gamma$  responses to PPD-B and P22 were detected in the HIMC vaccinated group at seven weeks after vaccination (Week 0, Fig. 3.1. a,b) although without significant difference when compared to other groups. After challenge, the mean levels of IFN- $\gamma$  began to increase in the three experimental groups. At week 5, PPD-B specific IFN- $\gamma$  responses were significantly higher in unvaccinated animals compared to HIMC and HIMB groups ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively Fig. 3.1a). At the same time point, both vaccinated groups also showed lower P22 specific IFN- $\gamma$  responses compared to the unvaccinated group although they were only statistically significant in the HIMB vaccinated group ( $P < 0.01$ , Fig. 3.1b). None of the vaccinated animals showed detectable IFN- $\gamma$  responses to E/C after vaccination (Fig. 3.1c). After challenge, the vaccinated groups also showed lower E/C-specific IFN- $\gamma$  responses than the control group, being statistically significant at weeks 3 ( $P < 0.05$ ) and 5 ( $P > 0.05$  and  $P < 0.01$  in HIMC and HIMB groups, respectively).



**Figure 3.1.** Whole blood IFN- $\gamma$  responses after vaccination and challenge: The graph shows the IFN- $\gamma$  levels measured by ELISA. Results are expressed as the increase in optical density ( $\Delta OD_{450 nm} \pm 95\% CI$ ). (a) Response against bovine tuberculin (PPD-B). (b) Response to the P22 complex. (c) Response against E/C antigen cocktail. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Kruskal Wallis test with post hoc Dunn's test. Groups: Control ( $n = 7$ , green), HIMB ( $n = 7$ , blue), HIMC ( $n = 7$ , red). Two animals of the control group were humanely sacrificed at week 7.



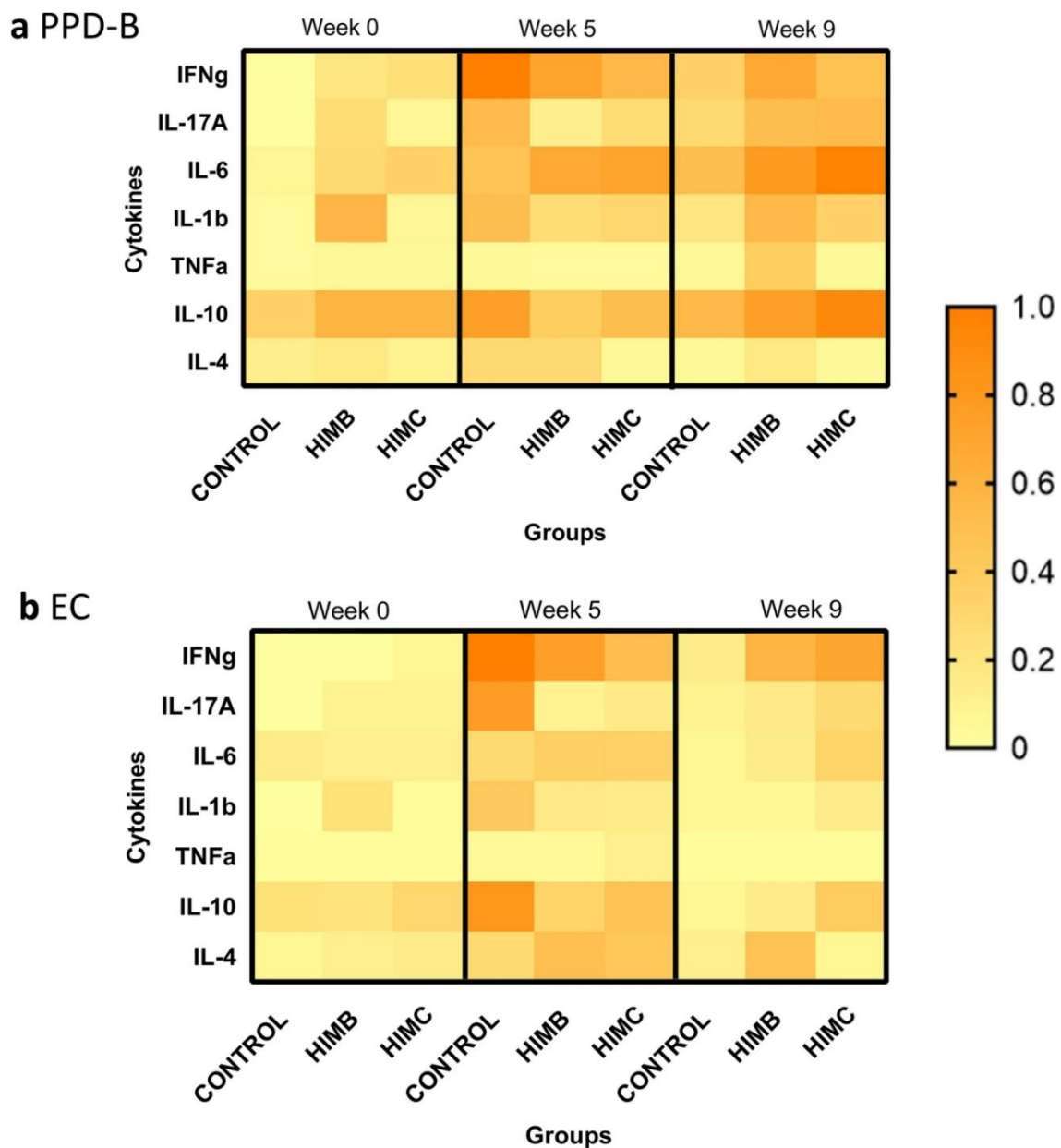
Analysis of IFN- $\gamma$ -producing cell subsets was performed by flow cytometry at seven weeks post-vaccination (Week 0) using PBMC isolated from the seven HIMB vaccinated, 5 HIMC vaccinated and 5 unvaccinated animals (4 animals did not show sufficient viable PBMC for the assay). Gating strategy is shown in Fig. 3.2 a-d. Both vaccinated groups showed statistically significant higher frequencies of IFN- $\gamma$ -producing CD4 lymphocytes with a central memory phenotype (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) compared to unvaccinated animals (HIMB:  $P < 0.01$ , HIMC:  $P < 0.05$ , Fig. 2e).



**Figure 3.2.** Flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  producing lymphocytes before *M. caprae* challenge. The analysis was conducted with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from all goats at week 0 (7 weeks post-vaccination and before *M. caprae* challenge) after stimulation with PPD-B overnight. (a–d) Representative plots of gating strategies. (a) Singlet cells identified by forward scatter (FSC). (b) Lymphocytes determined by side scatter (SSC). (c) Representative frequencies of CD4 cells and intracellular IFN- $\gamma$  staining (IFNG<sup>+</sup>). (d) Representative frequencies of the CD45RO/CD62L subsets gated from CD4 + IFN- $\gamma$  + cells. (e) Frequencies (%)  $\pm$  95% CI of CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> within the CD4 + IFN- $\gamma$ -producing cells. Blue dots are the CD4<sup>+</sup> IFNG<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> cells and the yellow dots represent the rest of CD4<sup>+</sup> IFNG<sup>+</sup> cells. Groups: Control (N = 5, green), HIMB (N = 7, blue), HIMC (N = 5, red). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Kruskal Wallis test with post hoc Dunn's test.

Finally, specific production of multiple cytokines after stimulation of whole blood with PPD-B and E/C was analysed at week 0 (before challenge) and at weeks 5 and 9 post-challenge. Results of cytokine production profiles relative to maximum value of each cytokine are presented in Fig. 3.3. Before challenge (week 0, 7 weeks post-vaccination), both vaccinated groups showed a slightly higher PPD-B-specific proinflammatory (IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-6) responses compared to the control group (Fig. 3.3a). Productions of IL-1 $\beta$  in both PPD-B and E/C stimulated blood samples were higher in the HIMB group ( $P < 0.001$ ).

At five weeks after challenge, unvaccinated animals experienced an increase of both proinflammatory cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ ) and IL-10 production. However, overall cytokine responses decreased in the control group at week 9, when HIMC vaccinated goats showed higher E/C-specific levels of IL-6 compared to other groups ( $P < 0.05$ , Fig. 3.3b), and HIMB group showed significantly higher levels of IL-1b to PPD-B ( $P < 0.05$ , Fig. 3.3a). At this time point, vaccinated groups also showed a mild increase of both E/C-specific IFN- $\gamma$  and anti-inflammatory responses (IL-10 and IL-4 in HIMC and HIMB groups, respectively), although not statistically significant (Fig. 3.3b). No statistically significant differences in TNF $\alpha$  production were observed among groups throughout the experiment.

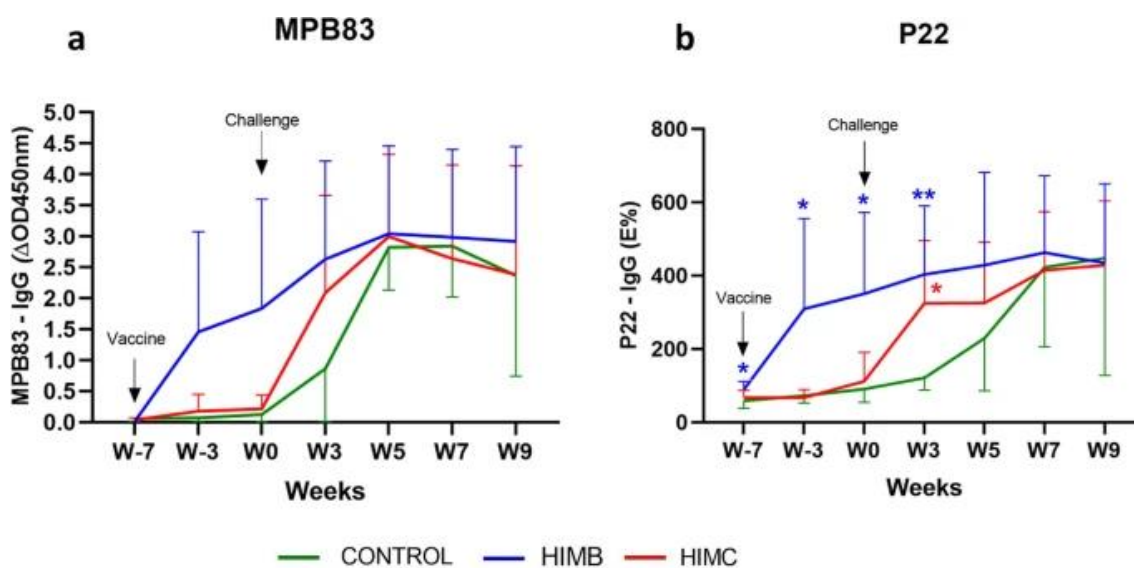


**Figure 3.3.** Cytokine profiles before and after *M. caprae* challenge. Cytokine productions detected in plasma after stimulating whole blood with mycobacterial antigens in each experimental group at week 0 (before challenge), and weeks 5 and 9 after challenge. (a) *M. bovis* tuberculin (PPD-B). (b) ESAT-6/CFP-10 antigen cocktail (E/C). The heat-map represents the mean cytokine production relative to the maximum production (100%) of each cytokine.

### 3.2.2. Humoral responses after vaccination and challenge

IgG levels to the antigen MPB83 (Fig. 3.4a) and the P22 antigenic complex (Fig. 3.4b) were measured by two ELISAs throughout the study showing similar kinetics at 3 and 7 weeks postvaccination (p.v). HIMB-vaccinated group showed an increase of IgG levels to both antigens compared to HIMC and control groups (Fig. 3.4), although this increase

was only statistically significant in the P22 ELISA ( $P < 0.05$ , Fig. 3.4b). Only two HIMC vaccinated animals showed mild IgG responses after vaccination. By contrast, the IgG responses to both antigens increased at 3 weeks post-challenge in both vaccinated groups compared to the control group, although it was only statistically significant in the P22 ELISA ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , for HIMB and HIMC groups, respectively), that showed a slightly delayed seroconversion. From week 5 onwards, no significant differences between groups were observed (Fig. 3.4).



**Figure 3.4.** Antibody responses after vaccination and challenge. The figure shows the levels of IgG against MPB83 and P22 antigen measured by ELISA throughout the study. MPB83 results are expressed as the increase of optical density ( $\Delta OD_{450nm} \pm 95\%$  CI). P22 ELISA results are expressed as E%:  $[\text{mean } OD_{450nm} \text{ of antigen-coated well} / (2 \times \text{mean negative control } OD_{450nm})] \times 100$ . Groups: Control (N = 7, green, N = 5 at week 9), HIMB (N = 7, blue), HIMC (n = 7, red). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

### 3.2.3. Clinical signs and body condition after challenge

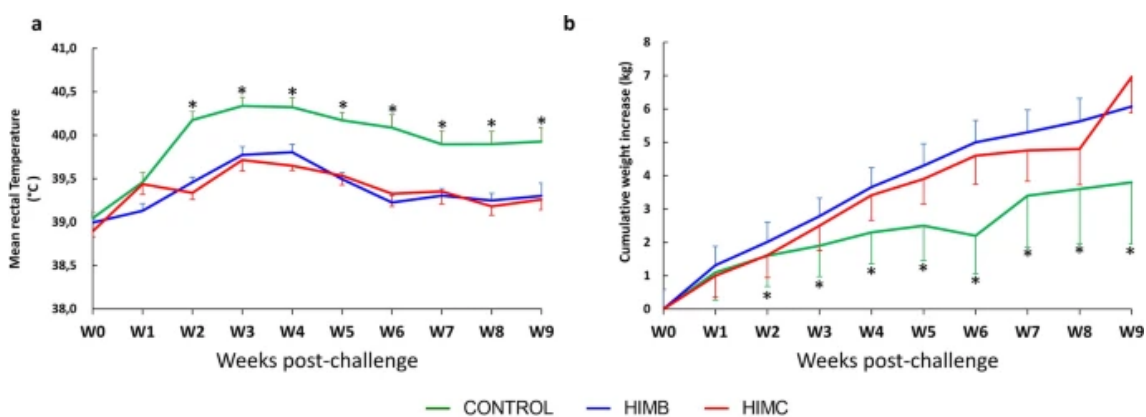
Animals were observed for clinical signs of TB after *M. caprae* challenge. Results are summarized in Table 3.1. Mild clinical signs appeared in most non-vaccinated animals at week 3 and evolved to severe clinical signs in all animals at week 7 (two of them were humanely euthanized because end point criteria were reached). Only a few vaccinated animals showed mild clinical signs at week 3 (one of the HIMC and two of the HIMB groups). At the end of the experiment almost all animals developed TB clinical signs. The most observed were cough, dyspnoea, eye discharge, enlarged lymph nodes, runny nose, and anorexia.

**Table 3.1.** Number of animals with clinical signs after *M. caprae* challenge in each treatment group (N=7).

Group	Week 0	Week 3	Week 5	Week 7	Week 9
<b>CONTROL</b>	0/7	6/7	6/7	7/7	5/5*
<b>HIMB</b>	0/7	2/7	5/7	5/7	6/7
<b>HIMC</b>	0/7	1/7	5/7	7/7	7/7

\*At week 7, two animals from the control group were humanely euthanized.

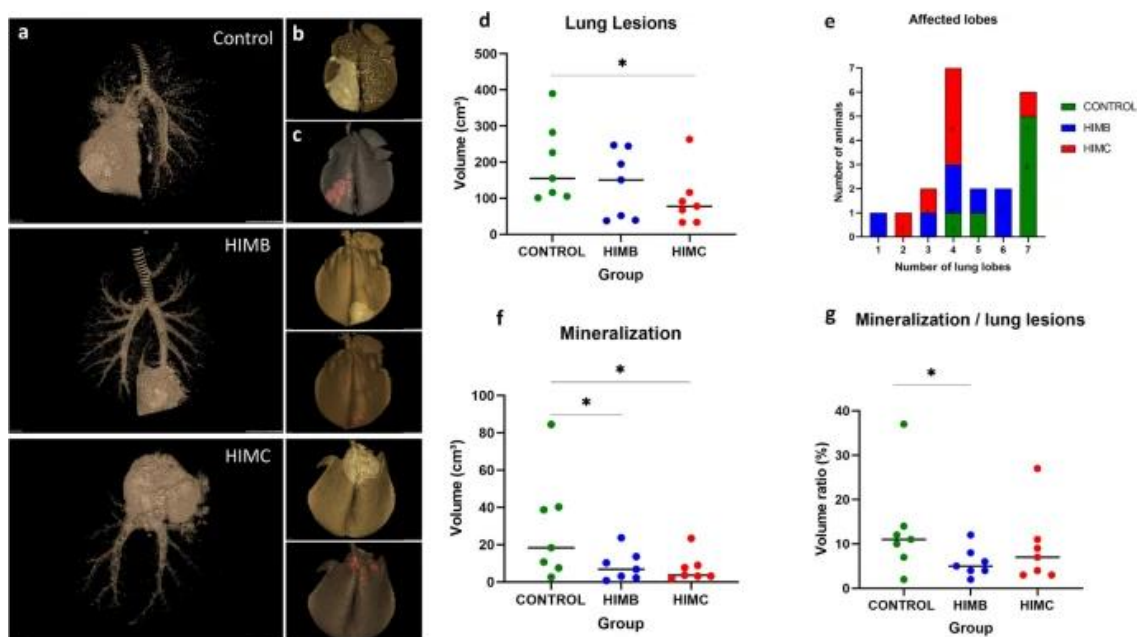
Rectal temperature and body weight were measured weekly after challenge (Fig. 3.5). The mean rectal temperature of the vaccinated groups was significantly lower than the control group from week 2 onwards ( $P < 0.05$ , Fig. 3.5a). No significant differences were observed between vaccinated groups. The mean body weight gain was significantly higher in vaccinated groups compared to the control group from week 3 onwards ( $P < 0.05$ , Fig. 3.5b). At the end of the experiment, the mean cumulative weight increase of the control group was 2.3 kg (– 0.9 to 5.4, 95% CI), significantly lower ( $P < 0.05$ ) than the vaccinated groups (HIMB: 6.1 kg, 95% CI 5–7.7; HIMC: 7.0 kg, 95% CI 1.6–12.4). Again, no statistically significant differences were observed between HIMB and HIMC groups throughout the experiment.



**Figure 3.5.** Rectal temperature and body weight. **(a)** Weekly mean rectal temperature of each group expressed in Celsius degrees ( $^{\circ}\text{C} \pm 95\%$  CI). **(b)** Weekly mean cumulative body weight increases of each group expressed in  $\Delta\text{Kg}$  (Kg at each week post-challenge minus Kg at week 0)  $\pm 95\%$  CI. Groups: Unvaccinated control (green, N = 7 and N = 5 at weeks 8 and 9), vaccinated with HIMB (blue, N = 7) and vaccinated with HIMC (red, N = 7). \* $P < 0.05$  between control and both vaccinated groups, one-way ANOVA with Tukey test for multiple pairwise comparisons.

### 3.2.4. Post-mortem findings

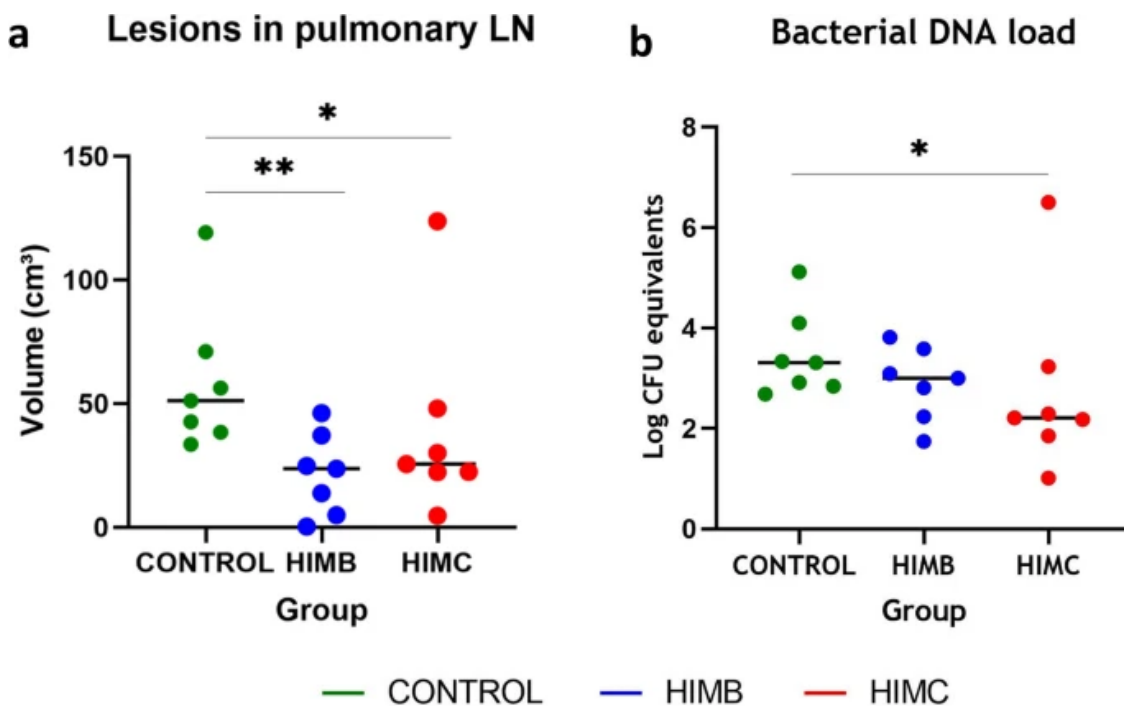
All goats showed TB lung lesions at necropsy. The assessment of lung lesions using CT is shown in Fig. 3.6. HIMC vaccinated group showed lower median values of the lung lesions volumes (78 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 33–263) compared to the control group (155 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 101–390;  $P < 0.05$ ), and HIMB vaccinated group (151 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 38–247; yet not statistically significant, Fig. 3.6d). Vaccinated groups showed lower intrapulmonary TB dissemination assessed by mean number of affected lobes (HIMC: 4.0, 95% CI 2.6–5.4,  $P < 0.01$ ; HIMB: 4.1, 95% CI 2.5–5.8,  $P < 0.05$ ) compared to the control group (6.3, 95% CI 5.1–7.4). Five out of seven unvaccinated animals showed TB lesions in the seven lung lobes whereas 6/7 HIMC and 4/7 HIMB vaccinated animals showed four or less lung lobes affected (Fig. 3.6e). In addition, vaccinated groups showed significantly lower median values of lung mineralization volumes (HIMC: 3.6 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 1.8–23.4; HIMB: 6.8 cm<sup>3</sup>, 95% CI 0.8–23.7) compared to the control group (18.4 cm<sup>3</sup>, 95% CI 2.6–84.5,  $P < 0.05$ , Fig. 3.6f), and lower mineralization volume ratios of lung lesions (HIMB: 5%, 95% CI 2–12,  $P < 0.05$ ; HIMC: 7%, 95% CI 3–27; Control: 11%, 95% CI 2–37; Fig. 3.6g).



**Figure 3.6.** Lung pathology assessed by computed tomography (CT) of intratracheally formalin perfused lungs. Example of the images obtained from the lungs of an unvaccinated control and two animals vaccinated with HIMB and HIMC, respectively. (a) Larger images on the left show the tracheobronchial tree and the TB lesions. (b) The top right miniatures show the TB lesion (whitish) superimposed onto the lung volume (yellowish). (c) The bottom right miniatures show (in red) the mineralized portion of the TB lesion. (d) Volumes of lung TB lesions in each group expressed in cm<sup>3</sup>. (e) To evaluate the lesion dispersion within the lungs in each group, the number of lobes with TB lesions in each animal is plotted against the number of animals. The

control group has a higher number of animals with a higher number of affected lobes than the vaccinated groups. (f) Volume of lesion mineralization expressed in cm<sup>3</sup>. (g) Ratio between the volume of mineralization and the volume of lung lesions expressed in %. Horizontal lines in (d), (f) and (g) represent the median values. Groups: Control (n = 7, green), HIMB (n = 7, blue), HIMC (n = 7, red). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Kruskal–Wallis test followed by one-tailed Dunn’s test for multiple comparisons.

In pulmonary LN, the median of TB lesions volumes was also significantly higher in the unvaccinated group (51.2 cm<sup>3</sup>, 33.6–119.2, 95% CI) compared to HIMB (23.7 cm<sup>3</sup>, 0.3–46.2, 95% CI; P < 0.01) and HIMC (25.6 cm<sup>3</sup>, 4.7–123.8, 95% CI; P < 0.05) groups (Fig. 3.7a). The bacterial DNA load in pulmonary LN, as estimated by qPCR, was significantly lower in HIMC vaccinated animals (P < 0.05) and slightly lower (but not statistically significant) in HIMB vaccinated animals compared to the control group (Fig. 3.7b).



**Figure 3.7.** Post-mortem results in pulmonary lymph nodes (LN). (a) Volume of lesions in LN expressed in cm<sup>3</sup>. (b) *M. caprae* DNA load in LN measured by quantitative PCR and expressed as Log<sub>10</sub> CFU equivalents. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Kruskal–Wallis with post hoc Dunn tests.

With regard to extrapulmonary TB, the control group was the only one with all animals showing extrapulmonary lesions, a proportion significantly higher to that found in



vaccinated groups (4/7 each,  $P < 0.05$ ). A summary of extrapulmonary lesions found in each treatment group and their location is shown in Table 3.2.

**Table 3.2.** Number of animals with extrapulmonary TB lesions and their location in each treatment group (N=7).

Group	Retropharyngeal LN	Sub-mandibular LN	Mesenteric LN	Hepatic LN	Liver	Spleen	Total extra-pulmonary
CONTROL	2/7	1/7	4/7	3/7	1/7	7/7	7/7
HIMB	1/7	0/7	0/7*	1/7	0/7	3/7**	4/7*
HIMC	2/7	0/7	1/7*	1/7	1/7	1/7***	4/7*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Chi-square test.

### 3.2.5. Cross-sectional analysis: biomarkers of vaccine efficacy

To assess immunological markers as predictors of vaccination outcome, the antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4 central memory T (TCM) cell subsets (CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) obtained by flow cytometry in each vaccinated animal (N = 12) were correlated with clinical, pathological and bacteriological results of the same animal (Table 3.3). Results showed significant inverse correlations of TCM % with volume of lung lesions and lesion volume / lung volume ratio, whereas no correlation was observed with LN lesions and bacterial DNA load in LN. Regarding clinical signs, body weight increase after challenge (mean Kg at week 9 minus mean Kg at week 0) showed significant direct correlation with TCM % and mean rectal temperature obtained at the temperature peak time point (week 3) showed significant inverse correlation with TCM %.

**Table 3.3.** Correlation between vaccine-induced immunity and vaccination outcome. Values show Spearman rank coefficient  $\pm$  95% CI. Vol. volume, LN lymph nodes, CFUeq colony forming units equivalents.

	Vol. lung lesions	Vol. lesions/vol. lung	Vol. LN. Lesions	DNA load in LN	Weight uncrease	Peak temperatura
	(cm <sup>3</sup> )	(%)	(cm <sup>3</sup> )	(Log <sub>10</sub> CFUeq)	( $\Delta$ Kg) <sup>b</sup>	(°C) <sup>c</sup>
TCM (%) <sup>a</sup>	- 0.75** (- 0.93 to - 0.29)	- 0.85*** (- 0.96 to - 0.54)	0.22 (- 0.45 to 0.71)	- 0.07 (- 0.63 to 0.54)	0.54* (- 0.07 to 0.86)	- 0.61* (- 0.88 to - 0.04)

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . <sup>a</sup> IFN- $\gamma$ -producing CD4 central memory T-cells at week 0 <sup>b</sup>

Week 9–week 0 <sup>c</sup> Week 3.



### 3.3. Discussion

Inactivated mycobacterial vaccines can be adapted ad hoc to field conditions by generating autovaccines with the same strains circulating in the herd or in a specific outbreak area. This is the first proof-of-concept study to evaluate the efficacy of a heat-inactivated autovaccine against *M. caprae* infection in goats.

Nowadays, there is a certain degree of background regarding the inactivated vaccine candidate based on *M. bovis* (HIMB), that have been reported to protect goats against TB in laboratory and field conditions (Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018), as well as cattle (Juste et al., 2022), wild boar (Díez-Delgado et al., 2017; Garrido et al., 2011), red deer (Thomas et al., 2017), badgers (Balseiro, Prieto, et al., 2020) and wild pigs (Nol et al., 2020). HIMB represents an interesting alternative to live-attenuated BCG vaccine since the deployment logistics are simpler and the strain survival is not required (Beltrán-Beck et al., 2014). In the present study, the gross pathology and bacteriological results, as well as the clinical follow-up after experimental challenge with *M. caprae*, ratified that MTBC-inactivated vaccines conferred protection when compared to unvaccinated animals.

Moreover, the HIMC group, vaccinated with the *M. caprae* strain homologous to the challenge strain (autovaccine proof-of-concept), showed slightly better protection against pulmonary TB compared to the group vaccinated with the heterologous vaccine (HIMB), with lower volume of lung lesions and animals showing lower number of affected lung lobes. In addition, the HIMC vaccinated group presented significantly lower bacterial DNA load in pulmonary LN, even when considering that one of the animals vaccinated with HIMC showed a huge amount of bacterial load (over  $10^6$  CFU equivalents, very much higher than any unvaccinated goat). This animal also showed very high pathological extension compared to the rest of the group (being an outlier for all parameters). Intriguingly, this goat did not show detectable immune responses (neither to ELISA nor IGRA) after vaccination. Even though an unnoticed incorrect administration of the vaccine cannot be ruled out, this animal could have been immunocompromised at the vaccination time point, and thus would have not been properly immunized.

Interestingly, vaccinated groups not only did show a reduced volume of lung lesions and lung mineralization compared to the control group, but also showed lower volume ratio of mineralization within the lung lesions, suggesting that the lung pathology was in earlier/more contained developmental stages compared to unvaccinated animals according to criteria previously described for *M. bovis* infected cattle using histopathology (Wangoo et al., 2005). This approach defined four granuloma

developmental stages according to different parameters such as the degree of mineralization. Using these criteria, cattle vaccinated with BCG or BCG-prime / heterologous boost regimes also showed lower proportion of lung lesions in advanced developmental stages (Dean et al., 2014; Salguero et al., 2017).

Vaccination also reduced the incidence and spread of extrapulmonary TB as previously described in BCG or HIMB vaccinated goats (Arrieta-Villegas et al., 2018). All unvaccinated animals showed TB lesions in the spleen and, in this control group there was also a higher number of animals with lesions in hepatic and mesenteric LN, indicative of a reduced lymphohematogenous dissemination of mycobacteria in both vaccinated groups.

Comparisons of clinical parameters, particularly the body weight increase and rectal temperature kinetics, were very consistent with post-mortem results. The body weight change and the rectal temperature at 3 to 5 weeks post-challenge are useful indicators of vaccination outcome as previously demonstrated in experimental trials conducted in goats and sheep (Arrieta-Villegas et al., 2018; Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020; Balseiro et al., 2017), and should be considered as valuable parameters in experiments to assess the efficacy of vaccines and treatments against TB.

Even though the administration of inactivated vaccines induced detectable ex vivo IFN- $\gamma$  responses to PPD-B and P22 using IGRAs, in a number of animals, no responses were detected when using an E/C protein cocktail after vaccination and before challenge. This result agrees to previously reported in HIMB parenterally vaccinated goats (Arrieta-Villegas et al., 2018) In addition, the intensity of E/C-specific IFN- $\gamma$  responses after challenge were equivalent to that induced by PPD-B and P22, indicating that this cocktail, initially developed for TB diagnosis and compatible with BCG vaccination, could be also suitable as a DIVA reagent for IGRA tests after administration of MTBC inactivated vaccine.

Unvaccinated animals showed higher IFN- $\gamma$  levels measured by the IGRAs after challenge compared to vaccinated ones, reaching a peak response at five weeks post-challenge. This trend was confirmed by increased proinflammatory responses in unvaccinated animals measured by the multi-cytokine assays performed at 5 weeks post challenge. At this time point, unvaccinated group showed higher antigen-specific IFN- $\gamma$ , IL-17A and IL-1 $\beta$  levels compared to vaccinated groups. This multi-cytokine proinflammatory pattern has also been described in buffalos infected with *M. bovis* (K. Smith et al., 2021) that showed increased proinflammatory cytokines and chemokines (IP-10, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17A, MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  and MCP-1) in whole blood stimulated with

the E/C whereas anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) remained in basal levels. On the contrary, in the present experiment unvaccinated goats also showed increased IL-10 responses at 5 weeks post challenge. The anti-inflammatory effect induced by this increase of IL-10 levels in unvaccinated goats could be associated to the subsequent decrease of proinflammatory responses (to both IGRA and multi-cytokine assays at week 9 post vaccination), while vaccinated animals maintained moderate levels throughout the experiment.

In this study, the contained IFN- $\gamma$  responses in vaccinated animals agreed with a more favorable disease outcome. However, whole blood ex vivo IFN- $\gamma$  responses in vaccine trials should be interpreted with caution since previous studies reported that BCG vaccinated goats showed reduced (Pérez de Val et al., 2012), similar (Pérez de Val et al., 2013) or even higher (Arrieta-Villegas et al., 2018), antigen-specific IFN- $\gamma$  responses after *M. caprae* challenge compared to unvaccinated controls.

Therefore, more accurate immunomarkers are required as predictors of vaccine efficacy and correlators of disease progression. The most useful immunological biomarkers to predict the vaccine efficacy are those that can be measured before the infection/exposure of animals to mycobacteria. With this purpose, as well as to estimate the duration of the vaccine-induced immunity, we assessed the proportion of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing TCM subsets, based on the expression of CD45RO and CD62L receptors (Sallusto et al., 1999).

Individual PPD-B-specific IFN- $\gamma$ -producing TCM % correlated with favorable disease outcome parameters, namely, reduced lung lesions, higher body weight gain, and lower peak of rectal temperature, suggesting that this immunological parameter can be a useful biomarker to infer the vaccine-induced protective immunity. Similarly, proliferation of antigen-specific memory T-cells determined by cultured IFN- $\gamma$  ELISPOT were also inversely associated to the pathology degree in vaccinated cattle and goats (Pérez de Val et al., 2013; Vordermeier et al., 2009).

On the other hand, the expansion of cells with a TCM phenotype elicited by vaccination is suggestive of long-term immunity as reported for mice and humans (Lindenstrøm et al., 2013; Sallusto et al., 1999). Nevertheless, the duration of the vaccine-induced immunity cannot be properly estimated in merely a seven-week period after vaccination and longer studies are required to confirm the results. In long-term trials, a wane of BCG-induced ex vivo IFN- $\gamma$  response has been observed in goats from 24 weeks p.v. onwards (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020) and, approximately one year after vaccination, the proportion of PPD-B-specific IFN- $\gamma$ -producing T-memory cells (CD45RO+) was similar

to that of unvaccinated goats, although it increased significantly when measured three weeks after revaccination (Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020).

Finally, serological results confirm the ability of inactivated vaccines, particularly HIMB, to induce MTBC-specific antibody responses (Arrieta-Villegas et al., 2018) and, as such, the specificity of the serology will be compromised as a TB diagnostic tool in vaccinated animals (Arrieta-Villegas, Infantes-Lorenzo, et al., 2020). Surprisingly, the seroconversion was less frequent and less intense (when it occurred) after HIMC vaccination. A lower expression of MPB83 (also a major component of P22 reagent) or a lower exposure of this protein in the *M. caprae* cell surface compared to *M. bovis* might be explanatory factors of this different antibody-response patterns, although the underlying mechanisms were not investigated and further comprehensive and focused studies should be carried out to confirm this hypothesis.

Given that autovaccines may have advantages, particularly from the regulatory point of view, and that heat-inactivated mycobacterial vaccines are easy to produce, the results of this proof-of concept study encourage to conduct further autovaccine field trials in natural infection settings to validate this vaccination strategy that can contribute to control TB in goats in high-prevalent scenarios when test-and-cull is unfeasible.

### **3.4. Methods**

#### **3.4.1. Animals, vaccination schedule and experimental infection.**

Twenty-one female Pyrenean breed goats of approximately 2 months of age, from an officially TB-free herd located at the Catalan Pyrenees (Spain) were divided into 3 experimental groups of 7 animals each: Unvaccinated control group, group vaccinated with heat-inactivated *M. bovis* (HIMB) and group vaccinated with heat-inactivated *M. caprae* (HIMC).

Inactivated vaccines were produced at NEIKER (Basque Country, Spain) and prepared as previously described (Garrido et al., 2011). Briefly, HIMB was prepared from a *M. bovis* field strain (SB0339, [www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org)) isolated from a naturally infected wild boar, while HIMC was produced by the same procedure using a *M. caprae* field strain (SB0157, [www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org)) isolated from a tuberculous sheep in Catalonia (Vidal et al., 2018). Both field strains were sub-cultured in Middlebrook 7H9 broth (BD Diagnostics, USA) enriched with Oleic acid-Albumin-Dextrose-Catalase (OADC) for 3 weeks approximately and subsequently washed, tittered and inactivated as previously described (Arrieta-Villegas et al., 2018) Inactivated mycobacterial suspensions were oil-adjuvanted with Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris, France) as indicated by the manufacturer. Final concentration of vaccines was approximately  $5 \times 10^7$  inactivated

CFU/ml. All animals were subcutaneously vaccinated (on the right scapula) with 1 ml of HIMB or HIMC.

Six weeks after vaccination, all experimental animals were transferred to the Biosafety Level-3 (BSL-3) facility of IRTA-CReSA (Catalonia, Spain) and were housed in two experimental boxes with 3–4–4 and 4–3–3 animals from Control, HIMB and HIMC groups in each box, respectively. Animals were fed with hay, alfalfa, mineral salt and maintained with water ad libitum throughout the experiment.

After a week of acclimatation, the animals were sedated with an intramuscular administration of acepromazine maleate (0.05 mg/kg) and butorphanol (0.2 mg/kg) and subsequently anesthetized with the intravenous administration of propofol (5 mg/kg) and midazolam (0.2 mg/kg). Afterwards, the animals were endontrachially challenged as previously described (Pérez de Val et al., 2011) with 0.5 ml of an approximately  $2 \times 10^3$  CFU/ml suspension of the same *M. caprae* strain used to prepare the HIMC vaccine.

After challenge, the animals were daily monitored for clinical signs. Rectal temperature and body weight were measured every week. Animals were bled at weeks -7 (vaccination time point), -3, 0 (challenge time point), 3, 5, 7 and 9 (end point) for immunological assays.

The experimental design and the experiments were conducted following the recommendations in ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org/>).

#### **3.4.2. Ethics statement.**

All procedures involving experimental animals carried out during the study followed the recommendations in the ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org/>), and were approved by the Animal Welfare Committee of the *Generalitat de Catalunya* (Project No. 10794) in conformity with relevant guidelines and regulations and the European Union legislation for the protection of experimental animals (86/609/EEC, 91/628/EEC, 92/65/EEC and 90/425/EEC).

#### **3.4.3. Antigens and reagents.**

*Mycobacterium bovis* tuberculin (PPD-B, 2500 IU/ml) was obtained from CZ Vaccines (Porriño, Spain). The recombinant MTBC-specific antigens ESAT-6, CFP-10 and MPB83 were obtained from Lionex (Braunschweig, Germany) at a concentration of 500 µg/ml each. ESAT-6 and CFP-10 were mixed 1:1 in an antigenic cocktail (E/C). The antigenic complex P22 was produced by immunopurification of PPD-B (CZ Vaccines) as

previously described (Infantes-Lorenzo et al., 2017a) and supplied by the *Instituto de Investigación Carlos III* (Madrid, Spain), at a concentration of 500 µg/ml.

#### **3.4.4. Ex vivo IFN-γ release assay (IGRA).**

Whole blood samples were collected at time points mentioned above from the jugular vein using heparinized tubes and subsequently stimulated in 96-well cell culture plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) with PPD-B, P22 (except at week 7) and E/C at a final concentration of 20 µg/ml. Phosphate-buffered saline was used as an unstimulated control. Samples were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 18 ± 2 h. Plasma supernatants were collected after centrifugation at 18 g for 10 min and the released IFN-γ was measured by ELISA according to the ID.screen® Ruminant IFN-g kit (ID.vet, Grabels, France) instructions. ELISA plates were read as optical density obtained at 450 nm (OD<sub>450nm</sub>) using a spectrophotometer (Biotek Power Wave XS®, Agilent, dana Clara, USA). Antigen-specific IFN-γ responses were calculated as ΔOD<sub>450nm</sub> of antigen-stimulated well minus OD<sub>450nm</sub> of non-stimulated well (ΔOD<sub>450nm</sub>).

#### **3.4.5. Multi-cytokine quantification assay.**

Cytokines in plasma supernatants from PPD-B and E/C stimulated and unstimulated whole blood samples were quantified at weeks 0, 5 and 9 post-challenge using a bovine customized multiplex assay kit (MILLIPLEX® Millipore, Merck Life Science S.L.U., Madrid, Spain) including a seven-plex panel for IL-1β, TNFα, IL-6, IL-10, IL-4, IFN-γ and IL-17A. 25 µl of each plasma sample and cytokine standards were analysed following the manufacturer's instructions using xMAP® technology (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). ELISA plates were read on MAGPIX instrumental platform with xPONENT acquisition software (Thermofisher Scientific).

#### **3.4.6. Flow cytometry.**

At week 0 (before challenge), peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples and stimulated for 16 h ( $2 \times 10^6$  cells/well) with PPD-B (10 µg/ml) as previously described (Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020). At week 0,  $2 \times 10^5$  cells were stained with monoclonal antibodies (mAb) that recognise bovine IFN-γ (anti-bovine CC302 IgG1-Alexa Fluor® 647) from Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA), CD4 (anti-sheep 44.38 IgG2A-FITC), CD45RO (anti-bovine IL-A116 IgG3-RPE) and CD62L (anti-bovine CC32 IgG1-APC-Cy7) as previously described (Arrieta-Villegas, Martin, et al., 2020). Stained cells were re-suspended in 200 µl PBS with 1% paraformaldehyde and analysed by flow cytometry in FacsARIA II (BD Diagnostics,

Sparks, USA). Data were analyzed using FlowLogic™ from Inivai™ Technologies (Mentone, Victoria, Australia).

#### **3.4.7. Antibody detection assays.**

Plasma samples from all experimental animals were analysed in duplicate to follow-up the antibody responses to MTBC after vaccination and challenge. Two indirect ELISAs were used to detect total IgG against the MPB83 antigen and the P22 antigenic complex, respectively. The two ELISAs were performed as previously described (Infantes-Lorenzo et al., 2019; Pérez de Val et al., 2017). MPB83-IgG levels were calculated as OD450nm of antigen-coated well minus OD450nm of non-coated well ( $\Delta$ OD450nm), whereas P22-IgG levels were calculated as ELISA percentage (E%) = [mean OD450nm of antigen-coated well / (2 × mean negative control OD450nm)] × 100.

#### **3.4.8. Necropsy, pathological examination and computed tomography (CT)**

Experimental animals were euthanized at 9 weeks post-challenge with an overdose of intravenous sodium pentobarbital (two goats from the control group were humanely euthanized at week 7). At necropsy, the diameter of TB compatible lesions in retropharyngeal (right and left), mediastinal (cranial and caudal) and tracheobronchial lymph nodes (LN) were measured, and the volume of lesions was inferred as previously described (Balseiro et al., 2017). Other visible lesions in extrapulmonary tissues were also recorded and fixed in 10%-buffered formalin to be confirmed by histopathology and the Ziehl Neelsen stain to detect acid-fast bacilli. Lungs were also formalin-fixed, including airways perfusion with formalin before immersion, as previously described (Pérez de Val et al., 2011) and then scanned by computed tomography (CT) using a 16-slice multi-detector scanner (Brivo CT-385, General Electric Healthcare, Madrid, Spain). CT analysis was performed as previously described (Balseiro et al., 2017). Briefly, total volumes of lungs and TB lesions were measured using volume rendering images with different density patterns (i.e. solid, mineralized and cavitory lesions), and total volume of mineralization was calculated using 100–300 Hounsfield units.

#### **3.4.9. Bacterial DNA quantification**

After macroscopic pathologic evaluation, the whole mediastinal and tracheobronchial LNs were stored at – 20 °C until they were processed for bacteriology (one month later). Then LNs were thawed and homogenized in 10 ml of sterile distilled water using a homogenizer (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spain). An aliquot of 1 ml of each homogenate was inactivated at 75 °C for 1 h and, in parallel, an aliquot of 100 ml of the *M. caprae* master seed (~ 10<sup>8</sup> CFU/ml), used for the challenge inoculum, was also

inactivated and then ten-fold serially diluted to establish the standard curve. DNA samples were extracted using the ID Gene™ spin universal extraction kit (ID.vet) and amplified with the *Mycobacterium tuberculosis* complex Duplex kit (ID.vet). Amplification was performed in a 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Walham, MA, USA). CFU genomic equivalents were calculated as previously described (Vidal et al., 2022).

#### **3.4.10. Data analysis**

A completely randomized design was carried out for studying the effects of vaccinations as a primary factor. Temperature and body weight were compared by using unidirectional ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

Antigen-specific immune responses (measured by IGRA, IgG-ELISA, Multi-cytokine assay and Flow Cytometry) were compared by using Kruskal–Wallis test with post hoc Dunn's test. Volumes of lesions in LN and lungs (measured by direct visual inspection and CT, respectively), and mycobacterial DNA load (measured by qPCR) were compared by using Kruskal–Wallis test with post hoc one-tailed Dunn's test.

Correlations of flow cytometry results (% of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing T-memory cell subsets) with clinical and post-mortem parameters were assessed by using one-tailed non-parametric Spearman's Rank correlation coefficient. A  $p$ -value less than 0.05 was considered statistically significant.

GraphPad Prism version 8.0.0 (San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis.



## **4. ESTUDIO II:**

# **Experimental infection of goats with *Mycobacterium caprae* through the intranasal nebulization and the endobronchial instillation display different pathological features.**

Melgarejo, C., Cobos, A., Planas, C., Fondevila, J., Martín, M., Cervera, Z., Cantero, G., Moll, X., Espada, Y., Domingo, M., Vidal, E., & Pérez de Val, B. (2023). Comparison of the pathological outcome and disease progression of two *Mycobacterium caprae* experimental challenge models in goats: endobronchial inoculation vs. intranasal nebulization. *Frontiers in microbiology*, 14, 1236834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236834>



#### 4.1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) that affects humans and a wide range of domestic animals and wildlife. TB in domestic goats is mainly caused by *Mycobacterium caprae*, a member of the MTBC (Aranaz et al., 2003). The disease has an economic impact resulting from production losses (Daniel et al., 2009; Seva et al., 2002), and infected goats pose a risk of infection to other animal species (Cano-Terriza et al., 2018; Napp et al., 2013; Vidal et al., 2018) and humans (Rodríguez et al., 2011).

TB in goats is usually transmitted through the aerogenous route, and it is common to find lesions mainly in the respiratory tract (Domingo et al., 2014). Goats develop caseous-necrotizing cavitory lesions similar to those observed in human TB (Pérez de Val et al., 2011; Sanchez et al., 2011), whereas these lesions are rarely developed in cattle (Buddle et al., 2016). Different approaches exist to control livestock TB, and the test and slaughter strategy is the most widely implemented, particularly in cattle. Vaccination against TB could be considered as an alternative approach. However, cattle vaccination against TB is currently forbidden in the EU (Council Directive 78/52/EEC) due to interference with currently used TB diagnostic tools. The goat model of TB has proven to be a suitable one to study new TB vaccines for ruminants and humans and for a better understanding of the pathogenesis of the disease (Pérez de Val et al., 2011, 2013; Ramirez et al., 2003b; Wedlich et al., 2022).

In the different TB studies using the goat model, the infection has typically been carried out through the endobronchial route (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Arrieta-Villegas et al., 2018; Melgarejo et al., 2022; Pérez de Val et al., 2011, 2013; Pérez de Val et al., 2012), intratracheal aerosolization (Gonzalez-Juarrero et al., 2013), and transthoracic injection (Bezós, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015; Bezós et al., 2010), all of them inducing primarily pulmonary TB lesions. In particular, the endobronchial approach allows for an accelerated progression of pulmonary TB, which is positive in terms of reducing the duration of the experiments. However, if the infectious dose is not well-adjusted, exaggeratedly large lung lesions may be produced. These large lesions do not only differ from the common natural presentation of the disease but also might preclude a proper evaluation of the vaccine effect (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020). A completely different experimental approach is the “natural” infection by long-term

direct-contact exposure of experimental goats with infected animals in controlled conditions (Bezoz et al., 2017; Roy et al., 2018; Roy, Tomé, et al., 2019). The advantage of this approach is that it induces all the natural features of the infection, but other aspects such as infection dose or infection time point remain uncontrolled, and it dramatically increases the duration of the experiment. Nowadays, *in vitro/ex vivo* and *in silico* experimental models are being developed to replace or reduce animal models in preclinical studies of vaccine candidates against TB (Català, Prats, et al., 2020; Tanner et al., 2016). However, the optimization of these approaches requires a comparison to well-characterized animal models that can be used as “gold standard”. Altogether, an accurate standardization of a goat model of TB is critical to predicting the efficacy of new vaccine candidates. This study aimed to evaluate and characterize the experimental infection of goats with *M. caprae* by intranasal nebulization in comparison with the endobronchial route. The rationale was to use a more natural access path of mycobacteria to the respiratory tract than the endobronchial route to reproduce more precisely the spectrum of lesions of goat TB found in field cases.

## **4.2. Materials and methods**

### **4.2.1. Animals and experimental infections**

Fourteen 3–4 months old female Pyrenean goats, from an officially tuberculosis-free herd, located in the Catalan Pyrenees (Spain), were chosen for this study. Experimental animals were transferred to the IRTA-CReSA Biosafety Level 3 (BSL-3) facility (Catalonia, Spain), where they were weighted and randomly divided into two experimental groups of seven animals each, challenged by the endobronchial (EB) and intranasal (IN) routes, respectively. According to body weights, corrections to ensure homogenous distribution between the groups were applied, and then, the animals were housed in two experimental boxes with animals 4–3 and 3–4 from the EB and IN groups in each box, respectively. The animals were fed hay, alfalfa, feed, and mineral salt and had access to water *ad libitum* throughout the experiment.

After 1 week of acclimatization, the animals were sedated intramuscularly with acepromazine maleate (0.05 mg/kg) and butorphanol (0.2 mg/kg) and subsequently anesthetized with intravenous administration of propofol (5 mg/kg) and midazolam (0.2 mg/kg). Afterward, the animals were challenged with 0.5 ml of a *M. caprae* field strain (Balseiro et al., 2017) at a suspension of  $2 \times 10^3$  CFU/ml. Animals of the EB group were challenged through the endobronchial route as previously described (Pérez de Val et al., 2011).

The animals of the IN group were challenged by using a syringe-adapted device for atomized spraying (MADgic<sup>®</sup>, Wolfe Tory Medical, Inc., Salt Lake City, USA). This device consists of a flexible cannula measuring 21.6 cm in length and 4.82 mm in width with a nebulizer located at its end that generates droplets of 30–100 µm in diameter, according to the manufacturer's instructions. The cannula was inserted into the nasal cavity ~10–15 cm depending on the size of the animal. Each side of the nasal cavity received 0.5 ml of the same *M. caprae* strain at a suspension of 10<sup>3</sup> CFU/ml without anesthesia.

After the challenge, all animals were daily monitored for clinical signs by a veterinarian to assess whether any of the animals reached the endpoint criteria. The clinical evaluation included 0–3 scoring of each of the following five parameters: body condition, mental state/behavior, weight loss, fever, and the presence of respiratory signs (0: absence of respiratory signs; 1: mild dyspnea and/or occasional cough; 2: moderate dyspnea and continued coughing; and 3: marked dyspnea, continued coughing, and/or severe nasal discharge). Any global score higher than 11 and/or the presence of qualitative criteria such as prostration, lack of movement, or severe respiratory distress resulted in euthanasia. Rectal temperature and body weight were measured each week. Heparinized blood samples were collected at weeks 0 (before challenge), 3, 5, 7, and 9 (endpoint) for immunological assays.

#### **4.2.2. Ethics statement**

All the procedures with experimental animals carried out during the study were approved by the Animal Welfare Committee of the *Generalitat de Catalunya* (Project Ref. #10794) in accordance with the European Union legislation for the protection of experimental animals (86/609/CEE, 91/628/EEC, 92/65/EEC and 90/425/EEC).

#### **4.2.3. Antigens and reagents**

*M. bovis* tuberculin (PPD-B, 2500 IU/ml) was obtained from CZ vaccines (Porriño, Spain). The specific recombinant antigens of MTBC ESAT-6, CFP-10 and MPB83 were obtained from Lionex (Braunschweig, Germany) at a concentration of 500 µg/ml each. ESAT-6 and CFP-10 were mixed 1:1 in an antigenic (E/C) cocktail. The P22 antigenic complex was produced by immunopurification of PPD-B (CZ Vaccines) as described previously (Infantes-Lorenzo et al., 2017b) and was supplied by the *Carlos III Research Institute* (Madrid, Spain), at a concentration of 500 µg/ml.

#### **4.2.4. Whole blood IFN-γ release assay (IGRA)**

Approximately 10 ml of whole blood was collected at the abovementioned time points from the jugular vein using heparinized tubes. Blood samples were maintained at room temperature for <1 h when they were stimulated in 96-well cell culture plates (Eppendorf,

Hamburg, Germany) with PPD-B, P22 (except at week 7), and E/C at a final concentration of 20 µg/ml each. Phosphate-buffered saline was used as an unstimulated control. The samples were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 18 ± 2 h. Plasma supernatants were collected after centrifugation at 18 g for 10 min, and the released IFN-γ was measured by ELISA (ID Screen® Ruminant IFN-γ kit, ID.vet, Grabels, France). Optical densities of the ELISA plates were read at 450 nm (OD<sub>450nm</sub>) using a spectrophotometer (Biotek Power Wave XS®, Agilent, Santa Clara, USA). Antigen-specific IFN-γ responses were calculated as OD<sub>450nm</sub> of the antigen-stimulated well minus OD<sub>450nm</sub> of the unstimulated well ( $\Delta OD_{450nm}$ ).

#### **4.2.5. Antibody detection assays**

Plasma samples from all experimental animals were analyzed in duplicate to follow antibody responses against MTBC after the challenge. Indirect ELISAs were used to detect total IgG against MPB83 antigen and P22 antigenic complex, respectively. The two ELISAs were performed as previously described (Infantes-Lorenzo et al., 2019; Pérez de Val et al., 2017). MPB83-IgG levels were calculated as OD<sub>450nm</sub> of the antigen-coated well minus OD<sub>450nm</sub> of the uncoated well ( $\Delta OD_{450nm}$ ). A sample was considered positive when  $\Delta OD_{450nm} \geq 0.05$ . P22-IgG levels were calculated as a percentage of ELISA (E%) = [mean OD<sub>450nm</sub> of the antigen-coated well / (2 × mean negative control OD<sub>450nm</sub>)] × 100. A sample was considered negative when E% ≤ 100%, non-conclusive when E% was between 110 and 150%, and positive (seroconversion) when E% ≥ 150%

#### **4.2.6. Necropsy, pathological examination, and computed tomography (CT)**

At week 9 post-challenge, all goats were sedated intramuscularly by an injection of acepromazine maleate (0.1 mg/kg) and butorphanol (0.2 mg/kg) and subsequently euthanized with an intravenous overdose of sodium pentobarbital. At necropsy, the size of TB-compatible lesions in the retropharyngeal (right and left), mediastinal (cranial and caudal), and tracheobronchial (LN) lymph nodes was measured, and the volume of lesions was inferred using the volume formula of the most similar 3D-geometrical morphology (including sphere, cylinder, or prism), as previously described (Balseiro et al., 2017). Other visible lesions in extrapulmonary tissues were also recorded and fixed in 10% buffered formalin to be confirmed by histopathology and Ziehl–Neelsen staining to detect acid-resistant bacilli. The lungs were fixed by airway instillation followed by immersion in formalin, as previously described (Pérez de Val et al., 2011), and then scanned by computed tomography (CT) using a 16-slice multidetector scanner (Brivo CT-385, General Electric Healthcare, Madrid, Spain). CT analysis was performed as previously described (Balseiro et al., 2017). In brief, total volumes of the lungs and TB lesions were measured using volume representation images with different density

patterns (i.e., solid, mineralized, and cavitory lesions), and the total volume of mineralization was calculated using 100–300 Hounsfield units.

#### **4.2.7. Quantification of bacterial DNA**

After macroscopic pathological evaluation, mediastinal and tracheobronchial LNs were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until they were processed for bacteriology. The whole LNs were then thawed and homogenized in 10 ml of sterile-distilled water using a homogenizer (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spain). An aliquot of 1 ml of each homogenate was inactivated at  $75^{\circ}\text{C}$  for 1 h for bacterial DNA quantification. In parallel, an aliquot of 100 ml of the master seed of *M. caprae* ( $\sim 10^8$  CFU/ml), used for the challenged inoculum, was inactivated and then diluted in eight 10-fold dilutions to establish the standard curve. DNA samples were extracted using an ID Gene™ spin universal extraction kit (ID.vet) and amplified with the *Mycobacterium tuberculosis* complex duplex kit (ID.vet), following the manufacturer's instructions. The amplification was performed in a 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The genomic equivalents of CFU were calculated as previously described (Vidal et al., 2022).

#### **4.2.8. Data analysis**

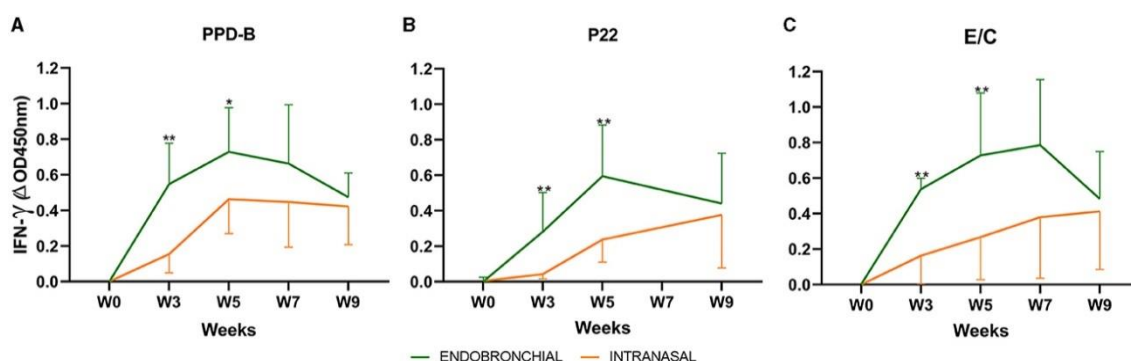
A completely randomized design was performed to compare the effects of *M. caprae* infection (primary factor) by the EB and IN routes. First, all data distributions were analyzed by using Shapiro-Wilk normality test. Temperature and body weight were compared using unidirectional unpaired t-test. Antigen-specific immune responses (measured by IGRA, IgG-ELISA), lesion volumes and mycobacterial DNA load were compared using the non-parametric Mann-Whitney test. GraphPad Prism version 8.0.0 (San Diego, CA, USA) was used for the statistical analyses.

### **4.3. Results**

#### **4.3.1. Endobronchial challenge induced earlier and stronger immune responses.**

Mean antigen-specific IFN- $\gamma$  responses in whole blood before and after the challenge for each treatment group are presented in Figure 4.1. An increase in IFN- $\gamma$ -specific responses to PPD-B, P22, and E/C antigens was detected in both groups after the challenge (week 0, Figure 4.1A-C). Animals of the EB group showed a peak-up response of IFN- $\gamma$  to the three antigens at weeks 3 and 5, which was significantly higher than in animals of the IN group ( $P < 0.01$ ; except  $P < 0.05$  for PPD-B at week 5). IFN- $\gamma$ -specific responses in intranasally challenged animals increased progressively over weeks, while IFN- $\gamma$  levels elicited after the endobronchial challenge decreased at the end of the

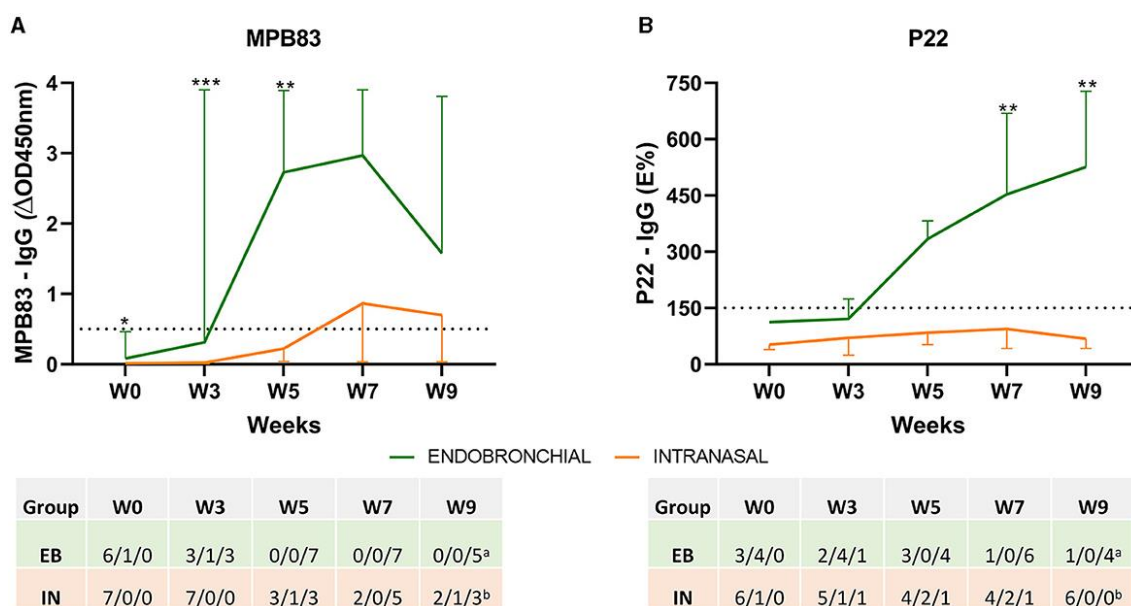
experiment when responses in both groups tended to converge (no significant differences at weeks 7 and 9).



**Figure 4.1.** Whole blood IFN- $\gamma$  responses before and after challenge: the graph shows the IFN- $\gamma$  levels measured by ELISA. The results are expressed as  $\Delta OD_{450nm} \pm 95\%$  CI. **(A)** Response against bovine tuberculin (PPD-B). **(B)** Response to the P22 complex. **(C)** Response against E/C antigen cocktail. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Mann–Whitney test. Groups: Endobronchial ( $n = 7$ , green) and Intranasal ( $n = 7$ , orange). Two animals of the endobronchial group were humanely sacrificed at week 7 and one animal of the group Intranasal.

IgG levels to the MPB83 antigen and the P22 antigenic complex, as well as individual seroconversion, were studied using two ELISAs throughout the study (Figure 4.2). Endobronchial challenge induced an early increase in MPB83 IgG-specific responses (a peak-up response at weeks 5 and 7), and all EB animals seroconverted at week 5 p.c. On the contrary, only a mild response was detected in IN animals, seroconversion was not detected in 2 of them throughout the experiment, and the other five animals seroconverted between weeks 5 and 9 (Figure 4.2A). In comparison with MPB83, IgG responses to P22 were more progressive in the EB group, reaching a peak at the end of the experiment (week 9), but seroconversion was detected in six of seven animals. IgG responses to P22 were practically undetectable in the IN group throughout the experiment, and only one animal showed a clear seroconversion (Figure 4.2B).

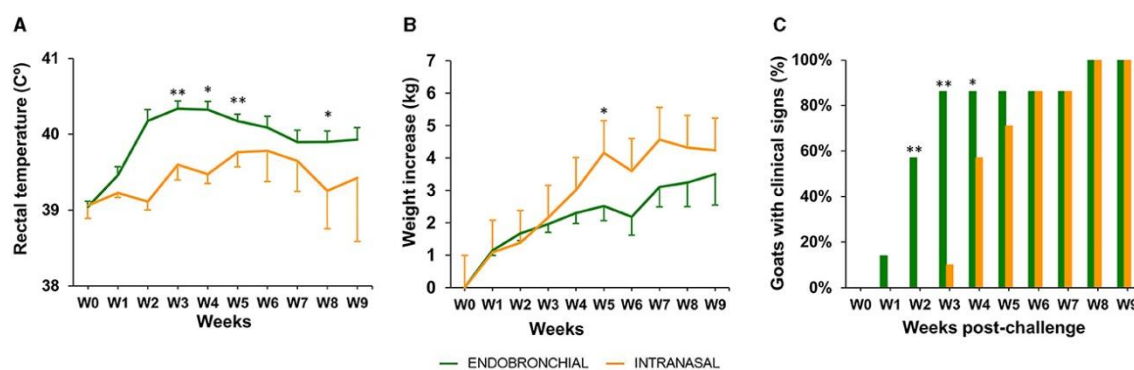




**Figure 4.2.** Antibody responses before and after the challenge. The figure shows the mean levels of IgG against MPB83 and P22 antigens measured by ELISA throughout the study. **(A)** MPB83-ELISA results are expressed as  $\Delta OD_{450nm} \pm 95\%$  CI. A sample was considered positive when  $\Delta OD_{450nm} \geq 0.05$ . **(B)** P22-ELISA results are expressed as E%.  $E\% = [\text{mean OD}_{450nm} \text{ of the antigen-coated well} / (2 \times \text{mean negative control OD}_{450nm})] \times 100$ . A sample is considered negative when it is  $\leq 100\%$ , inconclusive between 110 and 150% and seroconverted when the percentage is  $\geq 150\%$ . The dashed horizontal line shows the cutoff point for positivity. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Mann–Whitney test. The table indicates the numbers of animals and their seroconversion status: negative/inconclusive/positive. Groups: endobronchial (EB,  $N = 7$ , <sup>a</sup> $N = 5$  at W9) and intranasal (IN,  $N = 7$ , <sup>b</sup> $N = 6$  at W9).

#### 4.3.2. Disease-related clinical signs appeared later in intranasally challenged goats.

Rectal temperature, body weight, and clinical signs of TB were weekly recorded throughout the experiment (Figure 4.3).



**Figure 4.3.** Rectal temperature, body weight, and clinical signs post-challenge. **(A)** The weekly mean rectal temperature of each group expressed in °C  $\pm$  95% CI. **(B)** Weekly mean cumulative body weight increases of each group expressed in  $\Delta$ Kg (Kg at each week post-challenge minus Kg at week 0)  $\pm$  95% CI. **(C)** The percentage of animals with the presence of TB-related clinical signs in each group. The clinical signs observed were cough, dyspnea, eye discharge, enlarged lymph nodes, nasal discharge, and anorexia (the groups were compared using the chi-square test). Groups: endobronchial (green,  $N = 7$ ;  $N = 5$  at weeks 8 and 9) intranasal (orange,  $N = 7$ ;  $N = 6$  at weeks 8 and 9). Body temperature and weight were compared using the one-way unpaired  $t$ -test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

In the EB group, a peak of mean rectal temperature was observed between weeks 2 and 4 p.c., being statistically significantly higher compared with the IN group ( $P < 0.01$ , weeks 2 and 4;  $P < 0.05$ , week 3; Figure 4.3A). A mild peak was also observed in the IN group between weeks 5 and 7, although still remained slightly lower than the EB group, and decreased at week 8 to be significantly lower than the EB group again ( $P < 0.05$ ).

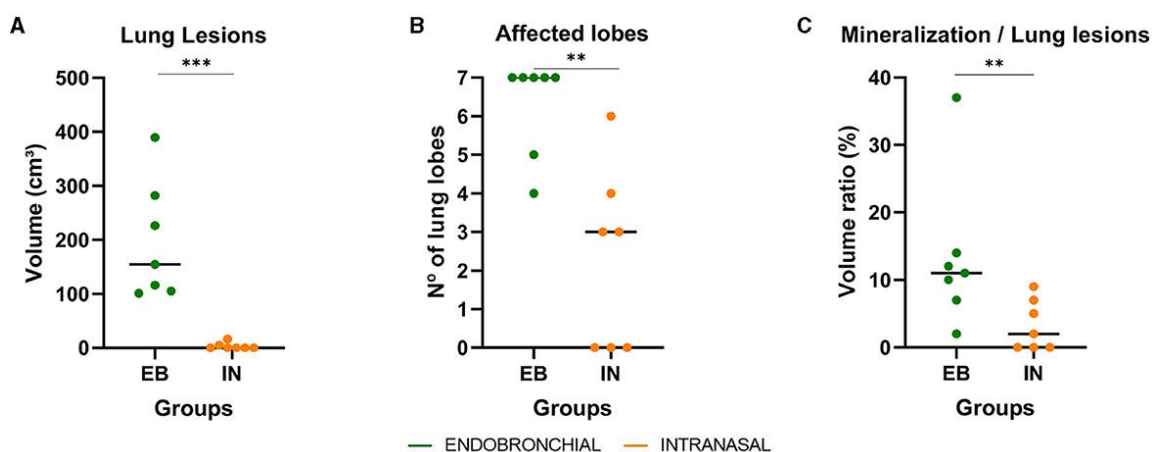
The mean body weight gain was greater in the IN group compared with the EB group since week 4, being statistically significant at week 5 ( $P < 0.05$ , Figure 4.3B), although a stagnation in body weight increase was observed from week 5 onward. In contrast, animals belonging to the EB group showed a mild increase in mean body weight from week 6 to the end of the experiment, where the difference in mean cumulative weight gain ( $\Delta$ Kg, Kg at weeks 9–0) between the IN and EB groups was minimal ( $4.2 \pm 3.3$  95% CI and  $3.5 \pm 2.9$  95%CI, respectively).

The presence or absence of clinical signs, other than weight loss or fever, compatible with TB was recorded in all challenged animals until the end point of the experiment (Figure 4.3C). The observed signs included cough, dyspnea, eye discharge, enlarged lymph nodes, runny nose, and anorexia. An animal of the EB group showed clinical signs at week 1, 4 at week 2, and 6 from week 3 to the endpoint, whereas a 2-week delay in the onset of clinical signs was observed in the IN group: 1, 4, and 6 animals at weeks 3, 4, and from 5 to the endpoint, respectively (Figure 4.3C). The proportion of animals with clinical signs was significantly higher in the EB group at weeks 2 ( $P < 0.01$ ), 3 ( $P < 0.01$ ),

and 4 ( $P < 0.05$ ) compared with the IN group. All experimental animals showed clinical signs at weeks 8 and 9.

#### 4.3.3. Endobronchially challenged animals showed more severe lung lesions.

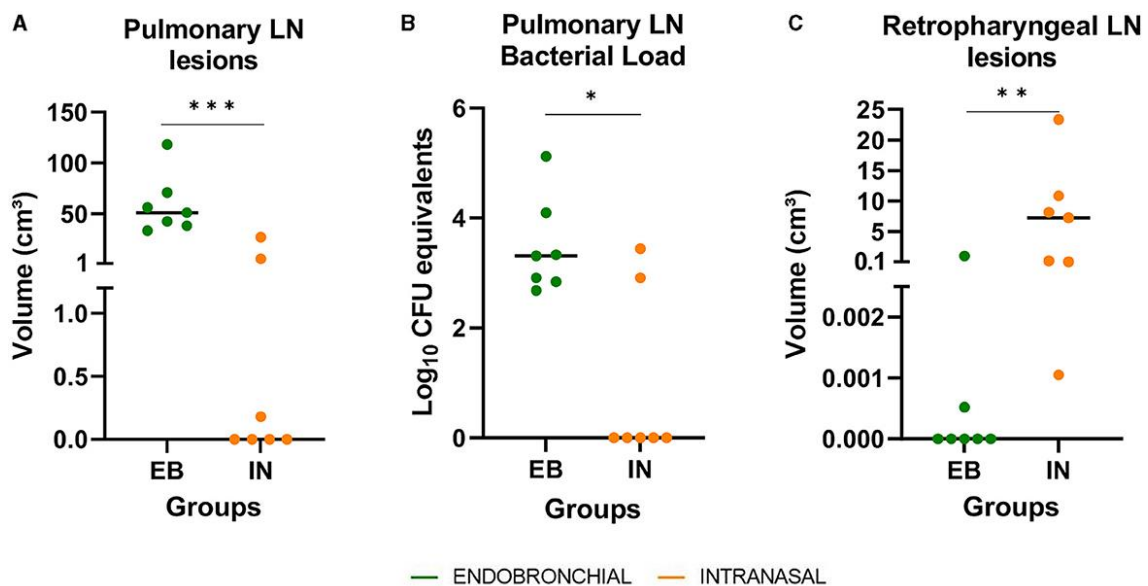
All goats showed TB lesions at necropsy. Lung lesions were quantitatively assessed by CT. All animals challenged by the EB route (7/7) had lung lesions, while only 4/7 animals of the IN group presented lung lesions, and the severity and dissemination of these lesions were very much lower compared with those found in the EB group. Figure 4.4 shows the extension of lung TB granulomas expressed as the volume of lung lesions, the intrapulmonary spread of TB lesions expressed as the number of affected lung lobes, and the degree of development of lung TB lesions expressed as the volume ratio between mineralization and lesion of each group. The EB group showed a significantly larger median volume of lung lesions compared with the IN group ( $P < 0.001$ , Figure 4.4A). In addition, the EB group showed a higher number of affected lobes compared with the IN group ( $P < 0.01$ , Figure 4.4B). Five out of seven EB animals showed TB lesions in all seven pulmonary lobes, while only one IN animal showed lesions in six pulmonary lobes. The EB group also showed a significantly greater median volume of lung mineralization (18.36 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 2.634–84.53,  $P < 0.001$ ) compared with the IN group (0 cm<sup>3</sup>, 95% CI: 0–0.72), as well as higher median proportion of mineralization of lung lesions ( $P < 0.01$ ; Figure 4.4C) indicative of a faster progression of pulmonary TB infection.



**Figure 4.4.** Lung pathological findings in endobronchially (EB) and intranasally (IN) *M. caprae*-challenged goats. **(A)** Volumes of lung TB lesions expressed in cm<sup>3</sup> measured by computed tomography (CT) scan. **(B)** Number of lung lobes with TB lesions. **(C)** The ratio between the volume of mineralization and the volume of lung lesions expressed in %. Groups: endobronchial ( $n = 7$ , green) and intranasal ( $n = 7$ , orange). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Mann–Whitney test.

#### 4.3.4. Intranasal challenge caused more severe lesions in the head but less generalized TB forms.

All intranasally challenged animals showed lesions in retropharyngeal (RF) LNs, while these lesions were only detected in 2/7 animals of the EB group, and the median volume of lesions in the RF LNs was significantly higher in the IN group compared with the EB group ( $P < 0.01$ , Figure 4.5C). In contrast, only 3/7 animals that received the IN challenge developed TB lesions in pulmonary LNs, whereas these lesions were macroscopically found in all EB-challenged ones. The median volume of TB lesions in pulmonary LN was significantly higher in the EB group compared with the IN group ( $P < 0.001$ , Figure 4.5A), and the bacterial DNA load in pulmonary LNs, estimated as CFU equivalents by qPCR, was also significantly higher in the EB group ( $P < 0.05$ , Figure 4.5B).



**Figure 4.5.** Post-mortem results in respiratory lymph nodes (LN). **(A)** The volume of lesions in pulmonary LN (tracheobronchial and mediastinal) expressed in cm<sup>3</sup>. **(B)** *M. caprae* DNA load in pulmonary LN, measured by quantitative PCR and expressed as Log<sub>10</sub> CFU equivalents. **(C)** The volume of lesions in retropharyngeal LN expressed in cm<sup>3</sup>. Groups: endobronchial (EB, green)-challenged and intranasal (IN, orange)-challenged. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Mann–Whitney test.

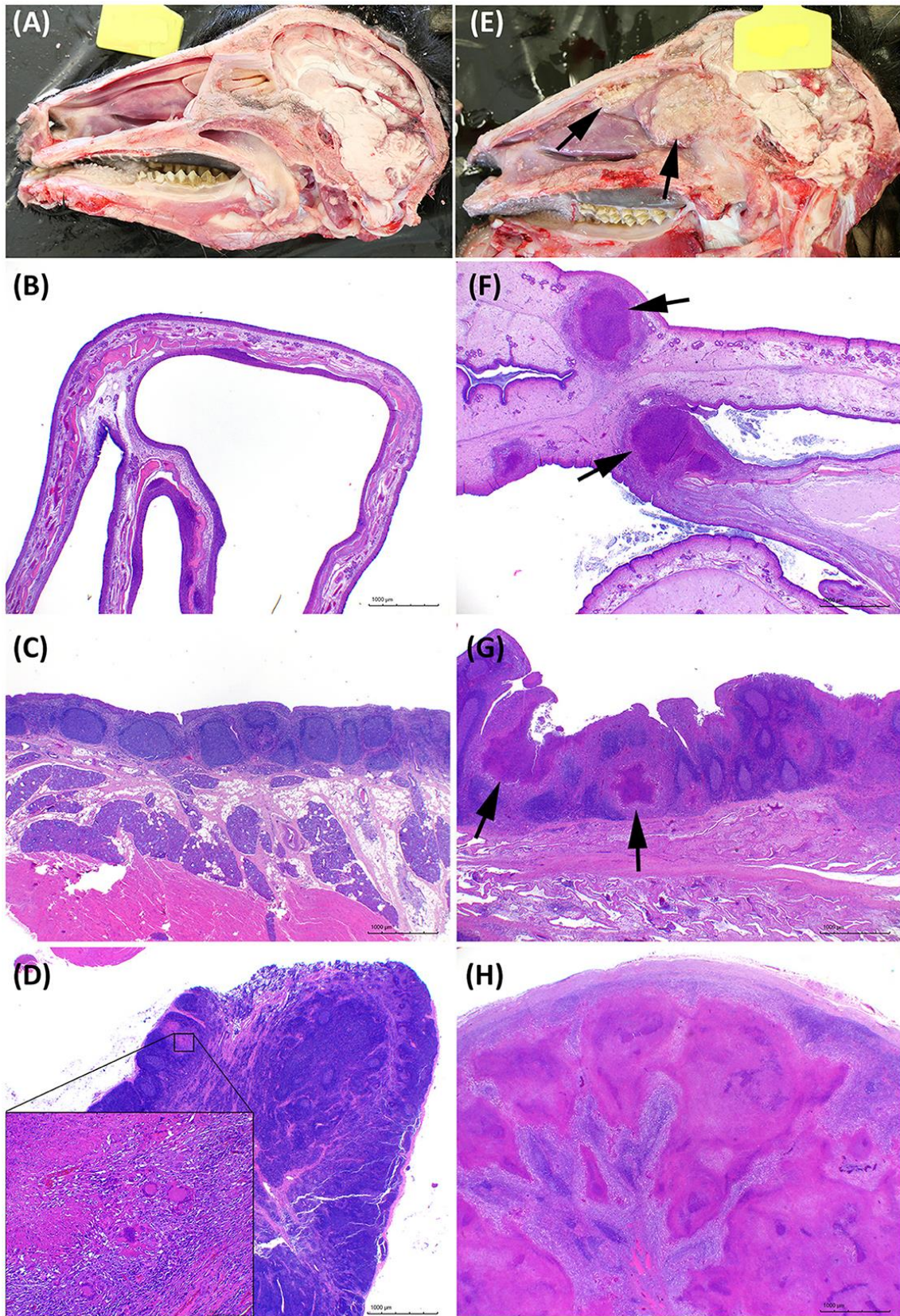
All extrapulmonary lesions macroscopically compatible with TB were confirmed as such by histopathological examination. In general, the IN group presented major affectation of the head, whereas more severe TB-compatible lesions in the thoracic and abdominal cavities were found in the EB group. Four out of seven animals of the IN group had an intense granulomatous inflammatory infiltrate in the nasal cavity (see Figures 4.6E, F),

and the three animals had lesions in the retropharyngeal and/or submandibular lymph nodes.

Figures 4.6 and 4.7 show examples of TB lesions developed in representative IN- and EB-challenged animals in the head and lungs, respectively. The longitudinal section of the head of intranasally challenged goats evidenced bilateral extensive multifocal to coalescent granulomatous lesions in the nasal cavity of 4/7 goats; the endoturbinates and the middle nasal concha (on the caudal aspect of the nasal cavity) were always the most affected, while the dorsal and ventral nasal concha and the nasal septum were more variably involved (Figure 4.6E). Microscopically, granulomas of variable extension were observed in the nasal turbinates (Figure 4.6F) and nasopharyngeal mucosa (Figure 4.6G), while the EB-challenged animals did not present visible lesions in this localization (Figure 4.6A, B). Lesions in the head lymph nodes were more severe in the IN group (Figure 4.6H) while minimal or absent in the EB group (Figure 4.6D). Microscopically, the lesional patterns observed were equivalent in both groups, differing only in their extension and location. On the other hand, the rendered images of the lungs obtained by CT disclosed more extensive lung lesions and a higher total volume of lung mineralization in the EB-challenged animals (Figure 4.7).

Figure 4.8 presents the distribution of TB lesions in all the animals of each group. The animals of the EB group have minimal involvement in the head structure whereas all animals of the IN group had lesions in the head (all of them in the retropharyngeal LNs). On the other hand, all animals of the EB group had lesions in the thorax but also in the abdominal cavity (especially in the spleen), indicative of early hematogenous generalization.

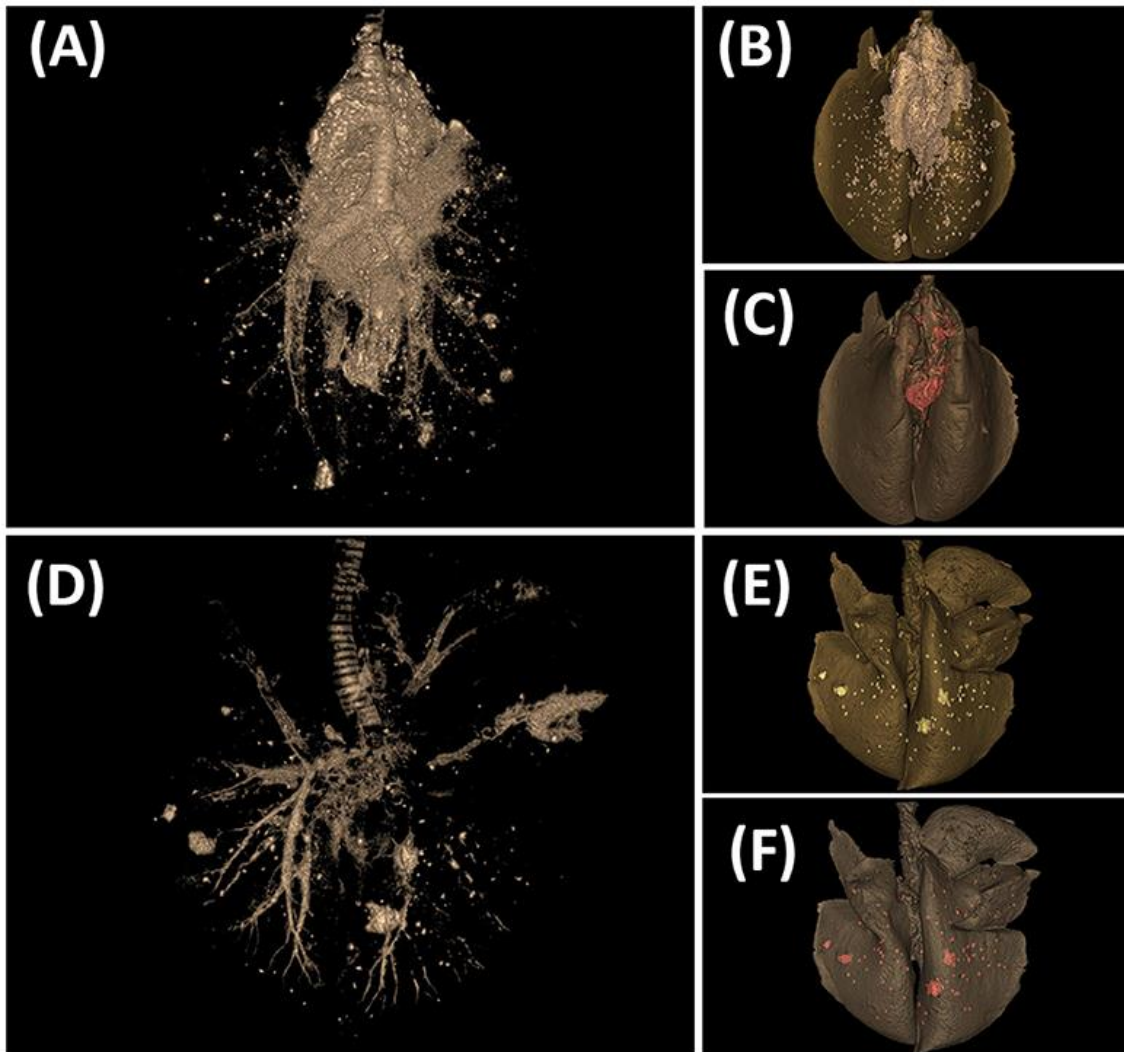




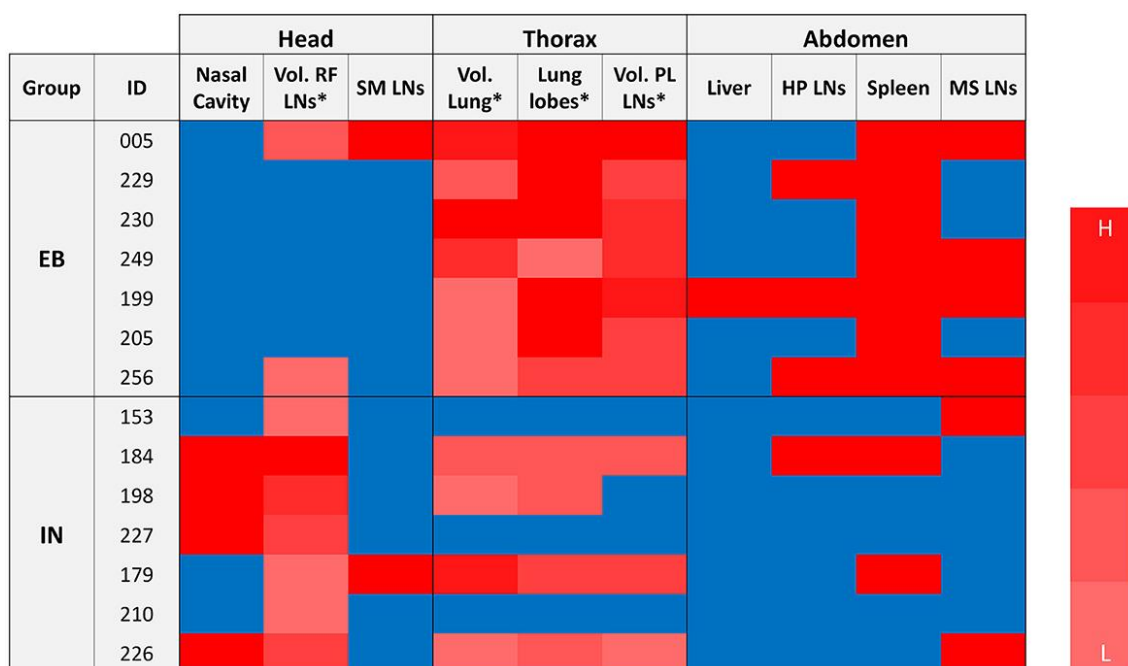
**Figure 4.6.** Pathological features in the head. **(A–D)** Representative images of goats challenged by the endobronchial route (EB). **(E–H)** Representative images of goats challenged by the intranasal route (IN). **(A, E)** Longitudinal section of the head. Granulomatous lesions are marked with arrows in the IN-challenged goat. **(B, F)** Transversal histological section of a normal nasal



turbinate compared with an enlarged edematous nasal turbinate with multifocal granulomatous lesions (arrows). Hematoxylin and Eosin stain (H&E), bars 1,000  $\mu$ m. **(C, G)** Nasopharyngeal mucosa with mucosal-associated lymphoid tissue. Noticeable multiple granulomas (arrows) in the IN animal in G. H&E, bars 1,000  $\mu$ m. **(D, H)** Tuberculous lesions in the retropharyngeal lymph nodes of the EB-challenged group were absent or minimal as the one shown in the insert in **(B)**, or extensive and obliterating the whole lymph node in the IN group as shown in H. H&E, bars 1,000  $\mu$ m.



**Figure 4.7.** Tuberculosis lesions evidenced by computed tomography (CT) scan in the lungs. **(A–C)** Goat challenged by the endobronchial route. **(D–F)** Goat challenged by the intranasal route. **(A, D)** CT scan image showing the tracheobronchial tree and TB lesions. **(B, E)** CT-rendered image of TB lesions (whitish) on the total volume of the lung (dark gray). **(C, F)** CT-rendered image of mineralization (red) on the total volume of the lung (dark gray).



**Figure 4.8.** Distribution of TB lesions. Blue and red cells indicate the absence and presence of lesions, respectively. (\*) In the case of RF LN, pulmonary LN, and lungs, a gradation of red levels represents the quintile distribution of volumes of lesions or number of affected lobes (scale: L - Low: 1- to H -High: 5-). Groups: endobronchial (EB)-challenged ( $N = 7$ ) and intranasal (IN)-challenged ( $N = 7$ ). LN, lymph node; SM, submandibular; RF, retropharyngeal; PL, pulmonary; HP, hepatic; MS, mesenteric.

#### 4.4. Discussion

Since vaccination of cattle against TB is currently forbidden in the EU due to its interference with the current diagnostic tools used in eradication programs, the goat represents an excellent model to investigate the effect of vaccines against TB, and one that can be tested in field conditions (Arrieta-Villegas et al., 2018; Bezos et al., 2017; Melgarejo et al., 2022; Pérez de Val et al., 2013; Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012; Roy et al., 2018). Additionally, goats are also a suitable animal model for human TB because they resemble more closely than small laboratory animals key anatomical features such as the complex bronchial tree (McLaughlin et al., 1961), the lung parenchyma, organized in a net of interlobular septa that tend to encapsulate the lesions (Gil et al., 2010), the respiratory tract and lung vascularization (Magno et al., 1990) and the respiratory lymphoid tissues (Liebler-Tenorio and Pabst, 2006).

The present study aimed to evaluate the IN nebulization of *M. caprae* as a field-like infection entrance pathway. The rationale was to better reproduce the features of the natural progression of TB infection but in a controlled manner, in order to improve the



monitoring of clinical, immunological, bacteriological, and pathological parameters that could be used as predictors of vaccine efficacy in further studies. The new approach was compared with the well-established experimental infection through endobronchial inoculation (Pérez de Val et al., 2011). The severity and the progression of the disease were not only compared by the different distribution of lesions in the EB and IN groups but also, they were holistically evaluated considering all the parameters mentioned above, according to previous investigations on TB pathogenicity in goats (Domingo et al., 2014; Pérez de Val et al., 2013).

The results showed that IN infection slowed the progression of the disease in comparison with the EB route in terms of cell-mediated immune response kinetics (antigen-specific IFN- $\gamma$  responses) and the onset of clinical signs (body weight gain, rectal temperature, and respiratory signs). The delay of proinflammatory responses (determined by IFN- $\gamma$  levels) in the IN group may be explained by a slower development of granulomatous lesions that normally show a direct correlation with antigen-specific IFN- $\gamma$  responses (Pérez de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012; Vordermeier et al., 2002). The kinetics and intensity of proinflammatory responses in the IN group are consistent with the more progressive, less intense, and delayed rectal temperature peaks (weeks 5–7 p.c. in the IN group instead of weeks 2–4 p.c. in the EB group). The delayed seroconversion rates (MPB83) or absence of detectable humoral responses (P22) in most animals of the IN group are also indicative of a slower progression of the disease. The lower intensity of MPB83-specific IgG responses in the IN group can also be associated with a lower severity of TB lesions and bacterial burden, as previously described in cattle and goats (Lyashchenko et al., 2004; Pérez de Val et al., 2011).

However, at the end of the study, all IN-challenged animals showed TB-compatible clinical signs indicating that the infection was well-established. This was also supported by the fact that the cumulative body weight gains of the IN and EB groups tended to converge at the end of the experiment. Previous studies, carried out by our research group, demonstrated that body weight increase in goat kids, experimentally challenged with *M. caprae*, inversely correlates with pathological TB outcome (Melgarejo et al., 2022)

From the pathological point of view, the EB infection induces faster disease progression with the early development of large-extensive pulmonary lesions similar to those found in certain chronic advanced cases of caprine TB in the field (Domingo et al., 2014). In contrast, after 9 weeks, goats infected through the IN route showed moderate pulmonary lesions similar to those usually obtained in natural infections, characterized by small to

medium, multifocal lung nodular granulomatous lesions with a varying degree of encapsulation, variable presence of satellite granulomas, and occasionally, bigger coalescing lesions with central cavitation. These lung lesions are often associated with lesions in the thoracic lymph nodes (Domingo et al., 2014). The main drawback of the IN route is the intense granulomatous lesions found in the nasal cavity and head LN in some animals, which were artificially induced by the nebulization platform used to inoculate the mycobacteria. These lesions are not usually observed in field cases (Sanchez et al., 2011). This might be explained by the fact that during the challenge, a considerable proportion of the droplets containing mycobacteria bulk delivered into the nasal cavity was not inhaled and remained in the upper airways, thus generating local granulomatous lesions. In contrast, airborne aerosols transporting mycobacteria in field conditions are likely to access the lung parenchyma directly and in discrete installments, thus bypassing the upper airways (Daniel et al., 2009).

In an experimental infection conducted in calves inoculated intranasally with *M. bovis*, most animals (11/12) developed TB granulomatous lesions in LNs associated with the upper respiratory tract, and only four of them had lesions in the lungs or tracheobronchial LN (McCorry et al., 2005). In the present study, we investigated not only the head LNs but also performed a longitudinal section of the skull to investigate the nasal cavity. We found macroscopic intranasal granulomas in 4/7 animals that partially obstructed the upper airways and, in one case, provoked severe dyspnea that led to the humane euthanasia of one animal at week 8 before the completion of the experiment. Putative variations of the location of the cannula in the dorsal or middle nasal meatus vs. the ventral nasal meatus could explain the location of lesions in the caudal aspect of the nasal cavity in 4/7 animals, while in the 3/7 animals with no lesions, the cannula was likely introduced in the ventral meatus. In one of these animals, the lesions in the lung were the most severe in the group (animal 179, suggestive of an effective delivery of the inoculum to the lung), while the other two only developed lesions in the retropharyngeal lymph nodes. In addition, two animals of the IN group had lesions in the mesenteric LN, and this could be explained by the partial ingestion of the inoculum (in the case of animal 153, no lesion was observed in the nose), by swallowing the mycobacteria from the granulomatous lesions developing in the nasal cavity and/or associated lymph nodes (in the case of animal 226) or, less likely, due to lymphohematogenous dissemination to the abdominal cavity. The involvement of mesenteric LN was a frequent finding in natural settings in a field study carried out in a goat herd, where the most likely transmission pathway was the shared feeders between infected and susceptible animals (Vidal et al., 2017). Spread of TB lesions beyond the upper airways and thoracic cavity also occurred

in all EB-challenged animals (i.e., all of them showed lesions in the spleen), most likely due to a lymphohematogenous spreading from the primary complex generated in the lungs and pulmonary LN, similar to that reported in previous studies (Arrieta-Villegas et al., 2018; Melgarejo et al., 2022). This phenomenon could also have occurred in two IN-challenged animals that showed lesions in the spleen (suggestive of hematogenous dissemination), one of which had the most extensive lung TB lesions in the IN-challenged group, without nasal cavity affectation.

To properly develop a suitable infection model to measure the efficacy of TB treatments, it would be necessary to refine the nebulization procedure to ensure that most of the inoculum enters into the trachea, avoiding the biased involvement of the nasal cavity. This could be accomplished by introducing the cannula directly into the ventral nasal meatus. Another explanation for the skewed distribution of lesions in the IN-challenged goats could be the fact that the animals might not have inhaled normally when inoculated and even tried to reject or swallow the inoculum. Thus, sedation of the goats before the experimental challenge could also facilitate a more direct delivery to the lungs.

To date, different approaches to MTBC experimental infections have been modeled in goats: transthoracic (Bezós, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015; Bezós et al., 2010), endobronchial (Pérez de Val et al., 2011; Wedlich et al., 2022), aerosolization (Gonzalez-Juarrero et al., 2013), and the infection by contact approach, i.e., the exposure of susceptible goats to infected ones by close contact (Bezós et al., 2017; Roy, Tomé, et al., 2019). The latter has the advantage to mimic natural infection in the herd but has the disadvantage of not controlling critical points such as the infection time point, infection dose, and infection route, which hinder the monitorization of the infection progress and, most critically, comparison between treatment groups. Similarly, the use of aerosolizers enables the inhalation of mycobacteria (Gonzalez-Juarrero et al., 2013) but does not allow to deposit the inoculum in a defined site of the respiratory tract at the start-point of the experiment, to compare the pathological evolution from the infection site among the treatment groups. The atomizing device used in the present study sprays droplets > 30 µm in diameter that resemble those excreted by sneezing or coughing. With the IN nebulization one can control the infection time point and infection dose conditions but still not ensure the infection site within the respiratory tract, resulting in moderate pulmonary TB lesions in only 4/7 animals, probably because a significant fraction of the inoculum was retained in the nasal cavity, whereas all goats infected by EB inoculation showed pulmonary TB lesions as previously described in all experimental infections of goats with *M. caprae* or *M. bovis* by this route (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020; Arrieta-Villegas et al., 2018; Melgarejo et al., 2022; Pérez de Val et al., 2011, 2013; Pérez

de Val, Villarreal-Ramos, et al., 2012; Wedlich et al., 2022). However, the EB model, as does the transthoracic one, can induce advanced caseous-necrotizing lesions even in vaccinated individuals, limiting the capacity to predict the protective effect of vaccinated candidates (Arrieta-Villegas, Allepuz, et al., 2020). In contrast, the IN infection induced low-to-moderate pulmonary lesions with a low degree of mineralization, suggesting a more initial developmental stage that may facilitate the evaluation of the containment of TB lesions spreading in immunized animals. Optimization of the model is required to reach a compromise among (A) conditions control (dose, inoculation point), (B) duration of the experiment, and (C) reproducibility of TB field phenotype in order to precisely evaluate the efficacy of the tested vaccines.

## 5. ESTUDIO III:

### **Experimental infection of goats with *Mycobacterium microti* induces subclinical pulmonary tuberculosis and mild responses to tuberculin skin tests**

Melgarejo, C., Cobos, A., Domingo, M., Cantero, G., Moll, X., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Michelet, L., Boschiroli, M. L., Vidal, E., & Pérez de Val, B. (2024). Experimental infection of goats with *Mycobacterium microti* induces subclinical pulmonary tuberculosis and mild responses to tuberculin skin tests. *Veterinary microbiology*, 290, 110009.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110009>



## 5.1. Introduction

*Mycobacterium microti*, an organism included within the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), was initially described as the causative agent of tuberculosis (TB) in wild voles (Wells and Oxon, 1937) but afterwards cases of infection by *M. microti* have also been described in domestic (Michelet et al., 2020; Peterhans et al., 2020) and wildlife species (Boniotti et al., 2014; Michelet et al., 2021; Pérez de Val et al., 2019). Besides, a few cases of *M. microti* infection have also been described in humans, usually associated to immunocompromised (Panteix et al., 2010).

Nowadays, *M. bovis*, *M. caprae* and *M. tuberculosis* are defined by the World Organisation for Animal Health (WOAH) as the main causative agents of mammalian TB. Infections by *M. microti* in livestock are sporadic and cause mild or only microscopic lesions (Michelet et al., 2016, 2017, 2020). Compared to other MTBC species, *M. microti* has a deletion in the RD1 chromosomal region (RD1<sup>MIC</sup>) that includes genes encoding virulence-related antigens. This has been suggested as the reason for its apparently lower pathogenicity in large mammals (Brodin et al., 2002; Orgeur et al., 2021), although the pathogenicity of *M. microti* in ruminants remains unstudied. Moreover, cattle reactors to the tuberculin skin test have been found in areas where *M. microti* circulates in wildlife (Michelet et al., 2020; Pérez de Val et al., 2019) suggesting a possible interference on TB diagnosis of cattle exposed to *M. microti* that may constrain bovine TB eradication campaigns.

The aim of this study was to evaluate the effects on the diagnosis of TB in goats experimentally exposed to *M. microti* and to characterize its pathogenicity.

## 5.2. Materials and methods

### 5.2.1. Experimental schedule

Two sequential experiments were carried out.

#### Experiment 1

Fourteen Pyrenean breed 4–5 months old female goats, from an officially TB-free herd located in Catalonia (Spain) were transferred to the IRTA-CReSA Biosafety Level 3 (BSL-3) facility (Bellaterra, Barcelona, Spain) and housed in an experimental box.

Animals were divided into 2 experimental groups of 7 animals each and, after an acclimatation period of one week, were challenged with a *M. microti* field strain prepared as previously described (Vidal et al., 2022). The first group was orally (PO) challenged with 1 ml of 10<sup>4</sup> CFU/ml *M. microti* suspension and the second group also received 1 ml of 10<sup>4</sup> CFU/ml *M. microti* by the intranasal (IN) route, distributed 0.5 ml into each nostril, using a syringe-adapted device for atomized spraying with a flexible cannula (MADgic®, Wolfe Tory Medical, Inc., Salt lake City, USA) as previously described (Melgarejo et al., 2023).

#### Experiment 2

Fifteen Murciano-Granadina breed, 4–5 months old female goats, from another officially TB-free herd located in Catalonia, were divided into three experimental groups of five

animals each: ten animals were sedated by intramuscular injection of acepromazine maleate (0.05 mg/kg) and butorphanol (0.2 mg/kg) and subsequently anesthetized with propofol (5 mg/kg) and midazolam (0.2 mg/kg), both intravenously administered. Afterwards, these animals were endobronchially (EB) challenged as previously described (Pérez de Val et al., 2011) with 0.5 ml of the same *M. microti* field strain described above at low dose ( $2 \times 10^2$  CFU/ml, EB-LD) and high dose ( $2 \times 10^5$  CFU/ml, EB-HD). The remaining five animals were inoculated with 1 ml of  $10^4$  CFU/ml suspension of *M. microti* at the right axilla by the subcutaneous (SC) route.

In both experiments, the animals were monitored daily for clinical signs after challenge. Rectal temperature and body weight were measured every week. Heparinized blood samples were collected as following: All animals were bled (10 ml) at week 0 (before *M. microti* exposure), and the PO and IN groups were also bled at weeks 3, 5, 7 and 9 (end point), while the EB-HD, EB-LD and SC groups were bled at weeks 3, 6 and 8 (end point). Animals from experiment 1 and 2 were humanely euthanized at 9 and 8 weeks after challenge, respectively, with an intravenous overdose of sodium pentobarbital. A diagram of the experimental design is available in supplementary file 1.

### 5.2.2. Ethics statement

This experimental study was approved by the Institutional Animal Welfare Committee.

of the Institute of Agrifood Research and Technology (CEEA-IRTA) and by the Ethical.

Commission of Animal Experimentation of the Autonomous Government of Catalonia (Project Ref. #10795) and conducted by certified staff, in accordance with the European Union legislation for the protection of experimental animals (86/609/CEE, 91/628/EEC, 92/65/EEC and 90/425/EEC).

### 5.2.3. Antigens and reagents

*M. bovis* purified protein derivative (PPD-B, 2500 IU/ml) and *M. avium* PPD (PPD-A, 2500 IU/ml) tuberculins were obtained from CZ vaccines (Porriño, Spain). The MTBC-specific recombinant antigens ESAT-6, CFP-10 and MPB83 were obtained from Lionex (Braunschweig, Germany) at a concentration of 500 µg/ml each. ESAT-6 and CFP-10 were mixed 1:1 in an antigenic cocktail (E/C). The P22 antigenic complex was produced by immunopurification of PPD-B (CZ Vaccines) as described previously (Infantes-Lorenzo et al., 2017a) and was supplied by the *Carlos III Research Institute* (Madrid, Spain), at a concentration of 500 µg/ml.

### 5.2.4. IFN-γ release assay (IGRA)

Whole blood samples were collected at the above-mentioned time points from the jugular vein using heparinized tubes and subsequently stimulated in 96-well cell culture plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) with PPD-B, PPD-A at final concentration of 20 µg/ml each, P22 at 10 µg/ml and E/C at 10 µg/ml each. Phosphate-buffered saline was used as an unstimulated control. The samples were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 18 ± 2 h. Plasma supernatants were collected after centrifugation at 18 g for 10 min and the released IFN-γ was measured by ELISA according to the instructions of the ID.screen® Ruminant IFN-γ kit (Innovative Diagnostics, Grabels, France). Optical densities (OD) were read at 450 nm using a spectrophotometer (Biotek Power Wave XS®, Agilent, Dana Clara, USA). Antigen-specific IFN-γ responses were calculated as OD of the antigen-stimulated well minus OD of the unstimulated well (ΔOD).



Interpretation of the tuberculin based IGRA results was performed according to the manufacture recommended cut-off point and the positivity criteria are described as follows: PPD-B OD – PBS OD  $\geq 0.05$ , P22 OD - PBS OD  $\geq 0.05$  and E/C OD – PBS OD  $\geq 0.05$ , respectively.

#### **5.2.5. Antibody detection assays**

Plasma samples from all experimental animals were analyzed in duplicate to detect IgG antibody responses to MPB83 antigen by indirect ELISA, as previously described (Melgarejo et al., 2023). MPB83-IgG levels were expressed as the mean of OD of the antigen-coated wells minus OD of the uncoated well ( $\Delta OD$ ). A sample was classified as positive when  $\Delta OD \geq 0.5$ .

#### **5.2.6. Skin tests**

At week 7 post challenge in experiment 1 and week 6 in experiment 2, all animals were inoculated with 0.1 ml of each reagent at the inoculation points using a Dermojet® syringe (Akra Deermojet, Pau, France). PPD-B was inoculated on the upper-right side of the neck whereas E/C was inoculated on the lower-right side. P22 was inoculated on the upper-left side of the neck and PPD-A on the lower-left side. The increase in skinfold thickness was measured just before inoculation and 72 h post inoculation. The results were obtained from the thickness difference ( $\Delta mm$ ) at 0 and 72 h after the inoculation of the antigens and interpreted as described in the manual of the Spanish bovine TB eradication program (MAPA, 2023). For the Single Intradermal Tuberculin (SIT) test an animal was positive when  $\Delta mm$  (PPD-B)  $\geq 4$  and/or presence of clinical signs at the inoculation site, negative when  $\Delta mm$  (PPD-B)  $< 2$  mm and doubtful when  $4 > \Delta mm$  (PPD-B)  $\geq 2$  mm. Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin (SICCT) test was positive when SIT was positive and  $\Delta mm$  (PPD-B) -  $\Delta mm$  (PPD-A)  $> 4$ , negative when  $\Delta mm$  (PPD-B) -  $\Delta mm$  (PPD-A)  $< 1$ , and doubtful when  $4 \geq \Delta mm$  (PPD-B) -  $\Delta mm$  (PPD-A)  $\geq 1$ . The skin tests with P22 and E/C were interpreted using the same criteria than SIT.

#### **5.2.7. Pathological examination**

Necropsies were performed immediately after euthanasia, the retropharyngeal (right and left), mediastinal (cranial and caudal) and tracheobronchial lymph nodes (LN) were sampled from all animals. Lung lesions as well as other TB-like visible lesions in extrapulmonary sites were recorded and fixed in 10% buffered formalin to be confirmed as TB lesions by histopathology through hematoxylin and eosin staining and Ziehl - Neelsen staining for acid-fast bacilli (AFB) detection.

#### **5.2.8. MTBC DNA detection**

LN and lung samples were processed individually for culture and PCR. DNA samples were extracted from tissue homogenates using the ID Gene™ spin universal extraction kit (Innovative Diagnostics) and amplified with the *Mycobacterium tuberculosis* complex duplex kit (Innovative Diagnostics) following the manufacturer's instructions. The amplification was performed in a 7500 FAST real-time PCR system (Applied Biosystems, Walham, MA, USA). The amplification results were interpreted according to the manufacturer's instructions.

#### **5.2.9. Mycobacterial culture**

Tracheobronchial, mediastinal (caudal and cranial), and retropharyngeal (left and right) lymph nodes were sampled separately from all animals and two lung tissue

samples (animals 12 and 5 of the EB-HD and EB-LD groups, respectively). The tissues were sectioned separately with sterile scissors and forceps, then homogenized in 17 ml of sterile distilled water using a homogenizer (Masticator, IUL Instruments, Barcelona, Spain). An aliquot of 1.5 ml of tissue homogenates was collected and inactivated for 1 h at 75 °C for subsequent evaluation of the bacterial load by qPCR. Ten millilitres of the remaining tissue homogenates were decontaminated with 10 ml of 5% oxalic acid for 30 min and then neutralized by adding 5 ml of NaOH 1 M. Samples were centrifuged for 30 min at 2471g, the supernatants were discarded and the pellets were suspended in 1 ml of sterile PBS. The suspensions were cultured as follows: 500 µl were inoculated into BBL® tubes (BD diagnostics, Sparks, MD, USA) tubes and incubated in the BACTEC MGIT 320 system (BD diagnostics); a swab was immersed in the remaining suspension for culture in Löwenstein-Jensen with pyruvate and Coletsos solid media tubes (BD Diagnostics) and another swab was cultured in Middlebrook 7H11 plates (produced by IRTA-CReSA). A culture was considered negative when no growth was observed on Middlebrook 7H11 plates at 28 days, or BACTEC MGIT and solid media tubes at 90 days (Vidal et al., 2022). Growth in positive cultures was confirmed as MTBC by multiplex PCR (Wilton and Cousins, 1992).

### **5.3. Results**

One intercurrent death unrelated to the experimental procedure occurred in an animal of the EB-HD group at week 1 of the experiment. The animal was excluded from the study.

#### **5.3.1. Immunodiagnostic results**

For skin testing, PPD-B, PPD-A, E/C and P22 were inoculated intradermally in all the animals of the 5 experimental groups, these results are presented in Table 5.1. All skin tests were negative in the animals of the PO and IN groups. Two animals, one of the EB-HD and another of the SC group, had a positive result to the SIT. These two positive animals showed doubtful results at SICCT. Doubtful results to the SIT were also found in one animal of the EB-HD group and another of the EB-LD group. The latter also had a doubtful result to the SICCT. With regard to the P22 skin test, a doubtful reaction was recorded in one animal of the EB-HD group. There were no positive nor doubtful skin test reactions to the E/C.

ELISA IgG response to the MPB83 MTBC-specific antigen was only detected in one experimental animal of the EB-HD group (supplementary file 1).

The whole blood IFN- $\gamma$  release assay (IGRA) with PPD-B, PPD-Av, P22 and E/C was negative in all animals throughout the experiments (supplementary file 1).

**Table 5.1.** Results of antemortem and post-mortem diagnostic tests in all groups.

Animals ID	Group	Skin tests				Post-mortem			
		SIT ( $\Delta$ mm PPD-B)	SICCT [PPD-B - PPD-A (mm)]	E/C ( $\Delta$ mm)	P22 ( $\Delta$ mm)	Histopathology/ AFB (tissue)	Ziehl-Neelsen	Culture (tissue)	qPCR (tissue)
3	EB-HD	- (1.41)	- (-2.26)	- (0.31)	- (0.01)	NVL		+ (MD)	-
9	EB-HD	<b>+ (4.28)</b>	<b>d (3.44)</b>	- (0.2)	- (0.06)	NVL		+ (MD)	<b>+ (MD, TBR)</b>
11	EB-HD	<b>d (3.16)</b>	- (1.92)	- (0.47)	<b>d (3.03)</b>	NVL		+ (MD)	<b>+ (MD)</b>
12	EB-HD	- (0.39)	- (-0.34)	- (-0.05)	- (0.22)	<b>TBCL/ + (lung)</b>	<b>ZN (+)</b>	+ (MD)	<b>+ (MD)</b>
5	EB-LD	- (0.21)	- (0.22)	- (0.05)	- (0.25)	NVL		-	-
7	EB-LD	- (0.74)	- (0.68)	- (-0.01)	- (0.05)	NVL		-	-
8	EB-LD	<b>d (3.61)</b>	<b>d (2.03)</b>	- (0.1)	- (0.04)	<b>TBCL/ - (MS)</b>	<b>ZN (-)</b>	-	-
13	EB-LD	- (0.03)	- (0.01)	- (0.1)	- (0.01)	NVL		-	-
14	EB-LD	- (0.71)	- (0.37)	- (0.1)	- (-0.02)	NVL		-	-
1	SC	- (1.62)	- (0.51)	- (0.52)	- (0.04)	NVL		-	-
2	SC	- (0.94)	- (-0.28)	- (0.05)	- (0.34)	NVL		-	-
6	SC	- (1.52)	- (1.43)	- (0.26)	- (0.09)	NVL		-	-
10	SC	- (0.58)	- (0.44)	- (0.28)	- (0.42)	NVL		-	-
15	SC	<b>+ (4.38)</b>	<b>d (2.99)</b>	- (0.33)	- (1.4)	<b>TBCL/ - (lung, MS)</b>	<b>ZN (-)</b>	<b>+ (MD, TBR)</b>	-
240	PO	- (0.42)	- (-0.25)	- (0.37)	- (0.52)	NVL		-	-
164	PO	- (1.33)	- (0.25)	- (0.84)	- (0.43)	NVL		-	-
197	PO	- (0.61)	- (-0.44)	- (1.14)	- (1.05)	NVL		-	-
172	PO	- (1.19)	- (0.4)	- (1.14)	- (0.38)	NVL		-	-
243	PO	- (0.76)	- (-1.03)	- (0.49)	- (1.11)	NVL		-	-
228	PO	- (0.59)	- (-0.05)	- (0.14)	- (0.43)	NVL		-	-
208	PO	- (1.35)	- (0.38)	- (0.26)	- (-0.09)	NVL		-	-
271	IN	- (1.14)	- (-0.7)	- (0.39)	- (0.3)	NVL		-	-
154	IN	- (1.57)	- (-0.6)	- (0.85)	- (1.13)	NVL		-	-
238	IN	- (0.31)	- (-0.36)	- (0.02)	- (1.26)	NVL		-	-
152	IN	- (0.47)	- (-0.9)	- (0.38)	- (1.26)	NVL		-	-

168	IN	- (1.08)	- (0.77)	- (0.85)	- (0.62)	NVL		-	-
206	IN	- (0.78)	- (-0.39)	- (0.38)	- (0.56)	NVL		-	-
274	IN	- (1.11)	- (0.44)	- (0.67)	- (0.76)	NVL		-	-

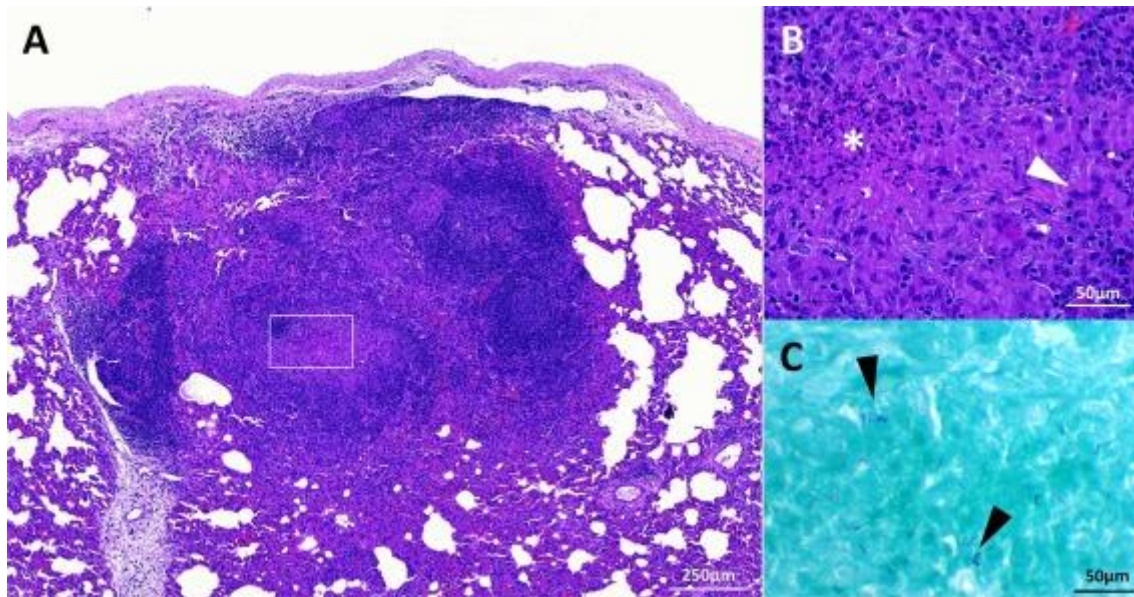
d: doubtful; NL: no lesions; TBCL: TB compatible lesion; MD: mediastinal lymph node; TBR: tracheobronchial lymph node; MS: mesenteric lymph node; SIT: Single Intradermal Tuberculin; SICCT: Single Intradermal Comparative Cervical Tuberculin; PPD-B: *M. bovis* purified protein derivative; PPD-A: *M. avium* purified protein derivate; E/C: ESAT-6 and CFP-10; AFB: acid fast bacilli (evidenced by Ziehl Neelsen staining); (+): test positive; (-): test negative.

### 5.3.2. Clinical and postmortem findings

A homogenous body weight gain was recorded among the experimental groups. No fever was detected in any experimental animal. Clinical signs such as cough, dyspnea, eye discharge, enlarged lymph nodes, nasal discharge, and anorexia were absent (supplementary file 1).

Postmortem results are summarized in Table 5.1. At necropsy, one animal from the EB-HD group presented a small (~2 mm) macroscopic TB compatible lesion (TBCL) in the lung. No gross TBCL were observed in any animal of the EB-LD, SC, PO and IN groups. The lung TBCL was confirmed as such by histopathology: a non-encapsulated, discreet focus of granulomatous infiltrate admixed with abundant lymphoplasmacytic infiltrate forming follicles (likely hyperplastic bronchiolar associated lymphoid tissue) with the presence of multinucleated Langhans cells and a minimal area of necrosis was observed (Figure 5.1.A-B). Additionally, 1 animal of the SC group showed similar microscopic TBCL in the mesenteric lymph nodes and lung, and another animal from the EB-LD had lesions solely in the mesenteric lymph node. However, acid-fast bacilli were only detected in the lung TBCL of the animal of the EB-HD group, which were often arranged in likely intracellular clusters and free within necrotic debris (Figure 5.1C).

MTBC was isolated from the mediastinal LNs of all animals of the EB-HD group (4/4). Three out of the four animals of this group were also positive to qPCR performed directly on homogenates from pulmonary LNs. MTBC was only isolated from the mediastinal and tracheobronchial LNs of one out of five animals of the SC group, even though this animal showed a negative result to direct qPCR of these samples. The animals belonging to EB-LD, PO and IN groups were negative both to culture and direct qPCR (Table 5.1).



**Figure 5.1.** Histopathological results in the lung of high dose *M. microti* endobronchially challenged goat number 12. (A) Subpleural, non-encapsulated, pulmonary granulomatous lesion surrounded by marked lymphoplasmacytic infiltrate with follicle formation and likely hyperplasia of bronchiolar associated lymphoid tissue. The lesion, within the white rectangular area, is magnified in (B) (Haematoxylin and Eosin staining, bar 250  $\mu$ m). (B) Asterisk points to a minimal area of necrosis and degenerated neutrophils in the centre of the granuloma. A few Langhans-type multinucleated giant cells are present in the surrounding inflammatory infiltrate (white arrowhead) (Haematoxylin and Eosin staining, bar 50  $\mu$ m). (C) Abundant acid-fast bacilli are observed within the lesion, often arranged in likely intracellular clusters (black arrowheads) and free within the necrotic debris (Ziehl Neelsen staining, bar 50  $\mu$ m).

#### 5.4. Discussion

Domestic goats are highly susceptible to MTBC mycobacteria such as *M. bovis* or *M. caprae* and the experimental infection of goats with these pathogens has been proposed as a reliable animal model to assess livestock TB control strategies (Melgarejo et al., 2023; Pérez de Val et al., 2011). Sporadic cases of *M. microti* infection have been detected in livestock, causing diagnostic interferences with the immunodiagnosis of TB due to *M. bovis* or *M. caprae* (Michelet et al., 2020). Since *M. microti* may hamper the success of TB eradication campaigns in areas with high circulation of this bacterium in the wildlife-livestock interface (Pérez de Val et al., 2019; Tagliapietra et al., 2021), the present study aimed to use the experimental goat model to assess the pathogenicity of *M. microti* under laboratory conditions and determine whether the exposure to *M. microti* would induce positive results to the immunodiagnostic tests used in TB eradication campaigns.

#### ***M. microti* experimental challenge in goats can elicit a subclinical infection**

The results of this study demonstrate that *M. microti* infection can be experimentally achieved in goats, especially by endobronchial and subcutaneous routes, although the disease course was subclinical and the pathological findings were very mild when compared to experimental infections of goats with *M. caprae* or *M. bovis* (Bezoz, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015; Pérez de Val et al., 2011).

Clinical parameters, especially body weight gain and rectal temperature, were not affected after challenge with *M. microti* in contrast to the loss of body weight gain and fever observed in other experimental infections with *M. caprae* in the goat model (Arrieta-Villegas et al., 2018; Melgarejo et al., 2023). Only one animal of the EB-HD group showed minimal TBCL, which is consistent with findings in field cases of cattle and goats infected by *M. microti* in France (Michelet et al., 2016, 2017).

Significant differences were observed among infection routes, being the EB-HD the most efficient to induce pulmonary TB infection. Even though either the oral or intranasal intake of *M. microti* are the most likely routes of infection in a field context, a slower development of the disease may delay the appearance of gross TB lesions. These can explain the absence of TB lesions in a short period experiment such as the present one. Similarly, goats experimentally infected with *M. caprae* by the intranasal route (Melgarejo et al., 2023) induced lower degree of pulmonary lesions and bacterial replication compared to endobronchially infected goats with *M. caprae* (Melgarejo et al., 2023; Pérez de Val et al., 2011). Likewise, in cattle orally infected with *M. bovis* the development of lesions seemed to be slower and almost restricted to abdominal tissues compared to endotracheally infected cattle (Serrano et al., 2018).

Subclinical pulmonary infection was induced in all the EB-HD challenged animals. All were bacillary in pulmonary LN without visible or minimal TBCL. This finding plausibly be explained by the loss of the ability of the mycobacteria to escape from the phagosome and replicate in the cytosol causing cytotoxicity and the death of host cells due to the deletion in the RD1 genomic region including a large portion of the Esx-1 secretion system genes related to this translocation mechanism (Simeone et al., 2012). This is the main cause suggested for the lesser virulence and lower pathogenicity of *M. microti* compared to other MTBC members (Orgeur et al., 2021). The induction of bacillary but none to mild pathological lesions is consistent with negative to low immune responses.

#### ***M. microti* infection can interfere with current tuberculin skin test protocols of *M. bovis* / *M. caprae* eradication programs**

In the context of a TB outbreak investigation in a French goat herd, epidemiologically related with *M. bovis* infected cattle, three goats showed positive results to a skin test and one of them was subsequently confirmed to be infected with *M. microti* (Michelet et al., 2016). Similar findings in cattle show that these results could interfere with bovine TB eradication campaigns (Michelet et al., 2020). In our experiment, 4 out of 28 goats experimentally exposed to *M. microti* had positive or doubtful skin tests results. All of them showed TB lesions and/or positive cultures *postmortem*. This low number of low-intensity intradermal reactions and the absence of positivity to IGRAs may be related with an early infection stage but also to a lower capacity of *M. microti* to induce tuberculin-based cell-mediated immune responses. The latter was confirmed in a recent study where guinea pigs challenged with *M. microti* induced lower delayed hypersensitivity reactions to PPD-B and P22 compared to other MTBC members (Fernández-Veiga et al., 2023). As expected, all animals were negative to E/C-based skin tests and IGRAs because genes encoding ESAT-6 and CFP10 proteins are not present in *M. microti* genome (Orgeur et al., 2021). Similarly, negative results to E/C-based skin tests or IGRAs were obtained in PPD-B and/or P22 positive animals after vaccination of goats

with BCG, which also lacks genes encoding ESAT-6 protein family (Arrieta-Villegas, Infantes-Lorenzo, et al., 2020; Pérez de Val et al., 2016b).

In conclusion, our results evidence that goats experimentally exposed to *M. microti* can yield positive results to the skin tests currently performed in livestock TB eradication campaigns and they can also become infected and develop minor pulmonary TB lesions.

Also, these results underscore how challenging it is to demonstrate a recent *M. microti* infection through regular sampling procedures, since only one of the infected animals had a single minuscule visible lesion (~2 mm) that would certainly go unnoticed in an abattoir setting. The absence of positive or doubtful reactions when using defined antigens absent or not expressed in *M. microti* strongly encourages the use of these antigens in antemortem tests in epidemiological contexts where the circulation of *M. microti* is suspected.

## **6- DISCUSIÓN GENERAL**





## Discusión general

La TB una enfermedad infecciosa crónica zoonótica que afecta al ganado, causando un impacto económico negativo para el sector ganadero y representando un riesgo para la salud pública (Mellado et al., 2015; Olea-Popelka et al., 2017; R. L. Smith et al., 2014; Tschopp et al., 2021). En gran medida el control de esta enfermedad en los animales domésticos se basa en la prueba de diagnóstico y posteriormente sacrificio de los animales positivos, pero muchas veces esto se torna inviable por razones logísticas, económicas y también culturales (Ábalos et al., 2022b; Balseiro, Thomas, et al., 2020; Srinivasan et al., 2018).

Los caprinos, son una especie altamente susceptible a la enfermedad (Pérez de Val et al., 2011), sobre todo la causada por la infección con *M. caprae* y *M. bovis*, pero también pueden contraer la infección por *M. microti* como se ha observado en cabras lecheras de Francia (Michelet et al., 2016). Aunque la infección por *M. microti* es menos común, la circulación de esta micobacteria en los rebaños puede complicar los programas de control y erradicación de la TB, basados en la estrategia de prueba y sacrificio, y centrados principalmente en *M. bovis* y *M. caprae*.

Una de las herramientas a considerar para el control de esta enfermedad es la vacunación contra la TB, la cual se plantea como alternativa o complemento a la estrategia prueba/sacrificio para el ganado. En este contexto el desarrollo e investigación de vacunas tiene como principal objetivo mejorar la eficacia de las vacunas candidatas, garantizar su seguridad, estabilidad y aplicabilidad en el ganado (Balseiro, Thomas, et al., 2020).

El objetivo general de la tesis se centraba en evaluar y mejorar las herramientas de prevención y control de la TB mediante el uso de modelos de infección experimental en cabras con agentes causales de TB. Con este fin se plantearon los tres estudios de la presente tesis.

El **primer estudio** consistía en una prueba de concepto en donde se evaluó la eficacia protectora de la autovacuna **HIMC** en animales desafiados experimentalmente con *M. caprae* frente a una vacuna heteróloga **HIMB**. Se observó que la vacunación homóloga indujo mayor protección ya que los resultados revelaron una mayor reducción de la gravedad de la infección en las cabras infectadas con la cepa *M. caprae* (reducción de la carga bacteriana y del volumen y diseminación de lesiones pulmonares). Además, se constató que esta estrategia no causa interferencia en la prueba diagnóstica IGRA utilizando reactivos DIVA. El **segundo estudio** se centró en la comparación de dos modelos de desafío experimental con *M. caprae* en cabras: la inoculación endobronquial (EB) y la nebulización intranasal (IN), en donde se observó que la IN produjo lesiones pulmonares más leves, mimetizando mejor la infección pulmonar en condiciones naturales, pero ralentizando la progresión de la infección, mostrando signos clínicos y respuestas inmunológicas retardadas respecto al grupo EB. Por último, en el **tercer estudio** se evaluó los efectos sobre el inmunodiagnóstico y desarrollo de la patología en la infección experimental de *M. microti* en cabras por diferentes vías de infección y dosis, aquí se observó una infección subclínica pulmonar en los animales expuestos a alta dosis de *M. microti* por vía endobronquial, además algunos de estos animales presentaron resultados positivos o dudosos en las pruebas de intradermorreacción utilizadas en las campañas de erradicación de la TB.

### **Aplicación de los modelos experimentales: Evaluación de la infección tuberculosa**

Los resultados del **primer estudio** proporcionan una evidencia preliminar de que las autovacunas de *M. caprae* podría ser una herramienta eficaz para proporcionar cierta protección a las cabras contra la infección por este patógeno en los rebaños. Los animales vacunados con la autovacuna HIMC mostraron una mayor protección frente a la infección, mostrando una reducción significativa del volumen de las lesiones pulmonares y de la carga bacteriana en LNs pulmonares en comparación con las cabras vacunadas con la vacuna heteróloga HIMB.

En investigaciones anteriores, la vacunación con *M. bovis* inactivado por calor (HIMB) ha sido utilizada en cabras, pero también en otros animales como ovejas, tejones, ciervos y ganado vacuno (Arrieta-Villegas et al., 2018; Balseiro et al., 2017; Garrido et al., 2011; R. A., Juste et al., 2022; R. A. Juste et al., 2023; Roy et al., 2018). Las vacunas inactivadas inducen respuestas mediada por células y también respuestas humorales. No hay que descartar los efectos positivos indirectos que podrían llegar a tener las vacunas inactivadas por calor como por ejemplo protección contra otros patógenos, como se ha visto que en conejos vacunados con HIMB tuvieron una menor carga parasitaria y menor área de lesión de sarna causada por el parásito *Sarcoptes scabiei* (Casais et al., 2024). Otro efecto positivo no específico se ha observado en un estudio en ganado bovino vacunado con BCG frente a la TB, en el que se observó el aumento de la producción de lechera (Retamal et al., 2021). Nuestros resultados con la autovacuna HIMC muestran que esta confirió una protección ligeramente superior que la vacuna heteróloga HIMB, lo que sugiere que las autovacunas inactivadas podrían ser adecuadas para utilizarse en condiciones de campo, como ya se ha realizado anteriormente con otra vacuna inactivada por calor (Roy et al., 2018). Por todo ello la vacunación homóloga con autovacunas inactivadas se presenta como una potencial mejor herramienta para el control de la tuberculosis caprina ya que estas han demostrado mayor protección, reducción de la severidad de la enfermedad en comparación con HIMB y estabilidad frente a la vacuna viva atenuada BCG ya que las vacunas inactivadas no requieren la supervivencia de la cepa, finalmente la facilidad que representan las autovacunas es que estas se preparan a partir de cepas que ya están presentes dentro del rebaño, entrañando un riesgo de seguridad menor, y esto podría facilitar la aprobación de su aplicación frente a vacunas heterólogas o vacunas atenuadas. En este estudio la vacunación homóloga con HIMC ha demostrado cierta mejora en la protección contra la TB frente a la vacunación heteróloga con HIMB, estos resultados refuerzan la vía de continuar el desarrollo la aplicación de autovacunas en caprinos con estudios a mayor escala y en condiciones de campo.

Sin embargo, la vía de inoculación EB utilizada en este primer experimento para desafiar a los animales induce una progresión muy rápida de la infección y un cuadro lesional muy exacerbado a nivel de cavidad torácica que difiere de los cuadros lesionales observados a nivel de campo, normalmente más leves. Disponer de un modelo experimental que reproduzca más fehacientemente la infección natural puede ser de utilidad antes de escalar el desarrollo de vacunas o tratamientos a condiciones de campo o para realizar estudios de patogenia.

Por ello, en el **segundo estudio** se propone por primera vez valorar la vía IN como una nueva alternativa a la vía de inoculación tradicionalmente utilizada en nuestro grupo que

es la EB. Se observó que la vía IN logra reproducir la TB pulmonar en cabras, estos animales mostraron lesiones pulmonares similares a las encontradas en campo y este punto, junto con una velocidad moderada de la progresión de la infección, son las mayores ventajas de este modelo frente al modelo EB para estudios de patogenia y progresión de la infección pulmonar. También se observó que los animales IN mostraron un pico temperatura rectal media menor y más retardado, así como una moderación del incremento de peso y aparición de signos clínicos de TB también retardados con respecto al grupo EB, aunque al finalizar el estudio estos parámetros tendieron a converger en los dos grupos y finalmente todos los animales infectados con *M. caprae* mostraron signos clínicos de TB. Finalmente, aunque si bien se trató de mimetizar el acceso más natural de la micobacteria a las vías respiratorias, se presentó un inconveniente principal: una exacerbación de las lesiones en el punto de inoculación (cavidad nasal), lo cual en este punto no se asemeja a una infección natural. Algo similar ocurre en modelos IN bovinos, donde se observan inflamaciones granulomatosas crónicas en los LNs de la región de la cabeza (retrofaríngeo, submandibular y parótida) en animales infectados por esta vía, pero sin observar lesiones en la mucosa nasal (Thom et al., 2006). En este segundo estudio, las lesiones granulomatosas en los LNs retrofaríngeos fueron mayoritariamente en el grupo IN. Además, los LNs pulmonares en el grupo IN se vieron menos afectados en comparación con el grupo EB, similar a lo observado en bovinos infectados por vía intranasal (McCorry et al., 2005). Además de bovinos, esta vía de infección experimental (IN) también ha sido utilizada en ratones para estudios de eficacia de vacunas y respuesta inmune. Pero en estos estudios en ratones no se tuvieron en cuenta las lesiones que se pueden desarrollar en el punto de inoculación (Arnold et al., 2015; Uranga et al., 2016).

Por otro lado, la vía IN tienen la limitación intrínseca que no permite controlar la dosis que finalmente llega al tracto respiratorio inferior (una fracción podría ser deglutida y otra permanecer en las vías respiratorias altas) y por lo tanto no existe un punto concreto de inoculación en los pulmones, a diferencia de otros modelos como el transtorácico o el EB. La vía transtorácica permite una inoculación controlada directamente en los pulmones a través del tórax, aunque está claro no mimetiza la infección natural y puede generar una afectación de la pleura durante el procedimiento (Bezoz et al., 2010). La vía EB permite una inoculación controlada, logrando una distribución concreta y uniforme del inóculo (y posteriormente de las lesiones) en localizaciones predefinidas del tracto respiratorio de los pulmones (Pérez de Val et al., 2011; Wedlich et al., 2022). En el modelo EB se observan mayoritariamente lesiones en la cavidad torácica, especialmente lesiones granulomatosas en los pulmones y LNs asociados (Pérez de Val et al., 2011). Se ha podido comprobar que, si la dosis es elevada, estas lesiones pueden ser exacerbadas o se puede producir una rápida propagación intrapulmonar, esto puede representar cierta limitación para comparar la eficacia de diferentes tratamientos o vacunas, como podría ser el caso de algunos de los parámetros evaluados entre las vacunas HIMC y HIMB del primer estudio. Otra vía de infección es por aerosoles, de esta forma se imita la vía de infección natural y se logra lesiones pulmonares similares a lo que se puede observar en infecciones naturales (similar a lo observado en el segundo estudio a nivel torácico con la vía IN). Mediante aerosoles se obtuvieron lesiones en pulmones, consiguiendo así una distribución de las lesiones tanto en lóbulos superiores e inferiores y en LNs pulmonares (Gonzalez-Juarrero et al., 2013).

En las cabras infectadas por la vía IN, no solamente las lesiones en el tórax, pero también abdominales, fueron menores en comparación con la vía EB, esto se podría deber a que por la vía IN la progresión de la infección es más lenta, y por lo tanto también su generalización por vía linfohematógena, como ocurre en condiciones naturales, ya que rara vez se encuentran lesiones en la cavidad abdominal en caprinos en condiciones de campo (Daniel et al., 2009; Domingo et al., 2014). En bovinos desafiados con *M. bovis* por vía oral se ha observado el desarrollo de una mayor cantidad de lesiones en el abdomen frente otros bovinos desafiados por vía endotraqueal (Serrano et al., 2018) y, en ese mismo estudio, los animales desafiados por vía endotraqueal desarrollaron mayor cantidad de lesiones en la cavidad torácica. En otro estudio se observó el mismo patrón en donde los terneros alimentados con leche de vacas infectadas con TB estos animales desarrollaron mayor número de lesiones en la cavidad abdominal (Fitzgerald et al., 2016). En estos estudios observamos una similitud en el sentido de que la vía de infección puede ser un factor determinante para la distribución de las lesiones y el factor tiempo que es necesario para que estas lesiones se desarrollen. Aunque el grado de lesiones muchas veces puede estar determinada por la especie o la cepa de CMTB, como se ha observado que *M. bovis* y *M. caprae* causan lesiones más graves frente a *M. tuberculosis* (Bezoz, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015) e inclusive en jabalíes se asocia la cantidad de granulomas entre cepas diferentes de *M. caprae*.

Finalmente, teniendo en cuenta que la vía IN induce una infección más lenta respecto a la EB, esto puede requerir alargar en el tiempo algunos estudios e incrementar los costos de los experimentos, lo que supondría una desventaja frente al modelo EB. En resumen, la IN es una opción válida, pero presenta limitaciones que deben ser abordadas para mejorar su eficacia y comparabilidad con las infecciones de TB naturales. Por ejemplo, para garantizar que la mayor cantidad del inóculo alcance el tracto respiratorio sería recomendable que la cánula llegue directamente al meato nasal ventral. Refinar la sedación de los animales antes del desafío experimental o aplicar descongestionante en cada fosa nasal antes de la nebulización también puede facilitar la vía respiratoria como se ha visto en cerdos (Nord et al., 2020).

En el **tercer estudio**, tras evaluar los parámetros clínicos definidos en el protocolo en todos los grupos infectados, estos no se vieron alterados en ningún grupo experimental por lo que no se observó ninguna manifestación clínica debida a la infección experimental por *M. microti*. Después del diagnóstico *postmortem* evidenciamos lesiones pulmonares leves solamente en el grupo EB a alta dosis (EB-HD), lo que conlleva a decir que se produjo una infección subclínica pulmonar. Esta falta de manifestaciones clínicas se podría justificar debido a la baja virulencia y patogenicidad de *M. microti* (Orgeur et al., 2021) y a la relativamente corta duración del experimento, posiblemente con un periodo de incubación mayor los hallazgos patológicos habrían sido más evidentes. En otro estudio se observó que la respuesta inmune a infecciones con *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*, en un periodo de 5 semanas fue suficiente para estudiar la gravedad de la enfermedad teniendo en cuenta las lesiones (Bezoz, Casal, Díez-Delgado, et al., 2015) sin embargo en nuestro estudio no pudimos observar patología avanzada en 9 semanas de estudio en cabras infectadas con *M. microti* por diferentes vías de infección. Pero en un estudio anterior de nuestro grupo de investigación en topillos se observó que la infección experimental de estos con *M. microti*

causó lesiones tuberculosas (Vidal et al., 2022). También debemos tener en cuenta que las lesiones que son causadas por *M. microti* observados en ciervos y jabalíes son indistinguibles de las lesiones causadas por *M. bovis* y *M. caprae* (Ghielmetti et al., 2021; Pérez de Val et al., 2019). En Francia, mediante histopatología, se ha logrado observar lesiones microscópicas compatibles con TB con presencia células multinucleadas en una cabra infectado por *M. microti* (Michelet et al., 2016), elemento que también pudimos observar en nuestro estudio en muestra de pulmón, pero en cabras infectadas con dosis altas del (grupo EB-HD).

### **Aplicación de los modelos experimentales: Inmunodiagnóstico**

#### ***I) IGRA***

El IGRA se utiliza como prueba complementaria en los programas control y erradicación de la tuberculosis en rebaños positivos, esta prueba ayuda a identificar a los animales infectados. En los tres estudios se han realizado pruebas de IGRA con los estímulos antigénicos PPD-B, PPD-A, P22 y E/C.

Los resultados del primer estudio indicaron que ni la autovacuna HIMC ni la vacuna heteróloga HIMB interfirieron con el diagnóstico DIVA al no inducir niveles detectables de IFN- $\gamma$  en sangre periférica tras la estimulación con el cóctel E/C. Esto coincide con estudios previos realizados en caprinos vacunados por vía parenteral (Arrieta-Villegas et al., 2018) y en ovinos y bovinos vacunados por vía oral (Balseiro et al., 2017; Jones et al., 2016). No obstante, bovinos vacunados con HIMB por vía intramuscular sí presentaron interferencia al E/C y Rv3615.

Las respuestas de IFN- $\gamma$  frente a PPD-B, P22 y E/C en los animales vacunados incrementaron después del desafío con *M. caprae* (tanto vacunados con HIMC y HIMB), aunque permaneciendo por debajo de las producidas en el grupo control no vacunado. Estos resultados coinciden con las respuestas de IFN- $\gamma$  frente a PPD-B y E/C observadas en experimentos similares en caprinos vacunados con BCG (Pérez de Val et al 2012), pero difieren con lo observado en otro estudio en caprinos desafiados con una dosis 10 veces mayor de *M. caprae*, en donde después del desafío las respuestas de IFN- $\gamma$  frente a PPD-B y E/C fueron tan elevadas en el grupo vacunado con HIMB como en el grupo control, probablemente debido al efecto de la dosis del inóculo (Arrieta-Villegas et al., 2018). La respuesta de IFN- $\gamma$  específica a E/C tras el desafío en el grupo control fue similar a la inducida a PPD-B, esto sugiere que E/C ofreció niveles similares de sensibilidad que el IGRA basado en tuberculinas y sugiriendo que puede ser adecuado como reactivo DIVA para pruebas de IGRA tras la vacunación con micobacterias inactivadas.

Los niveles IGRA fueron mucho más elevados en los animales del grupo EB que en IN, sobre todo en las etapas tempranas, probablemente por la asociación con la progresión de la infección (Pérez de Val et al., 2011; Vordermeier et al., 2002). Por lo tanto, a nivel diagnóstico IGRA puede tener menos sensibilidad para detectar animales infectados por vía IN en etapas tempranas, sobre todo en P22 y E/C que tardan más tiempo que PPD-B en alcanzar el pico.

En el tercer estudio se ha observado resultado negativo en todos los animales expuestos a *M. microti*. Esto puede deberse a los siguientes motivos:

- a. Etapa temprana de la infección: en las primeras etapas *M. microti* aún no induce en caprinos una respuesta inmune sistémica capaz de producir niveles de IFN- $\gamma$  y en sangre periférica detectables tras la estimulación con antígenos específicos, pero también con tuberculinas.
- b. La menor capacidad de *M. microti* para producir respuestas mediadas por células que otros miembros del CMTB como se ha observado en conejillos de indias (Fernández-Veiga et al., 2023). El hecho que los genes que codifican ESAT-6 y CFP10 no están presentes en *M. microti* (Orgeur et al., 2021), que son antígenos inmunodominantes dentro de la PPD-B (Infantes-Lorenzo et al., 2017b), puede explicar la negatividad a la prueba frente a estos antígenos, y también una menor inducción de la respuesta frente a las tuberculinas.

## II) IDR

Los programas de erradicación de la TB en el ganado, focalizados en las infecciones por *M. caprae* o *M. bovis*, se basan fundamentalmente en las pruebas de IDR (simple/comparada). En la presente tesis estas pruebas se han realizado solamente en el tercer estudio, en el han detectado también algunos animales reactivos a la IDR basada en tuberculinas tras la infección con *M. microti*, como también se ha reportado en condiciones de campo en bovinos y caprinos en Francia (Michelet et al., 2016, 2017, 2020). La exposición a *M. microti*, por lo tanto, podría causar interferencias a la hora de diagnosticar infecciones causadas por *M. bovis* o *M. caprae* en el marco de los programas de erradicación (Michelet et al., 2020; Pérez de Val et al., 2019). Por este motivo, para evaluar la posible interferencia de *M. microti* en la IDR basada en tuberculinas (utilizada en los programas de erradicación), se añadió también una IDR utilizando cóctel antigénico ESAT-6/CFP10 (ausentes en el genoma de *M. microti*), obteniendo resultados negativos en todos los animales, incluyendo los reactores a las IDR con tuberculinas, reforzando así la validez del uso de antígenos específicos en las pruebas diagnósticas en determinados escenarios epidemiológicos para poder diferenciar la infección por *M. bovis*/*M. caprae* y *M. microti*.

## III) Serología

La respuesta de anticuerpos frente a CMTB se ha analizado en los tres estudios. En los resultados del primer estudio, la vacuna HIMB indujo una respuesta más temprana y elevada de anticuerpos frente al antígeno MPB83 (específico del CMTB) que la HIMC tras la vacunación y antes del desafío con *M. caprae*. Esta potente respuesta humoral inducida tras la vacunación con HIMB ya se había observado anteriormente en cabras (Arrieta-Villegas et al., 2018). Una menor expresión de la proteína MPB83 en la superficie celular de *M. caprae* en comparación con *M. bovis*, y por lo tanto un menor reconocimiento antigénico de la misma, podría explicar las diferentes respuestas observadas entre ambos grupos vacunados. Tras el desafío, todos los animales (vacunados y no vacunados) seroconvirtieron presentando una fuerte respuesta humoral frente a MPB83.

Igualmente, en el segundo estudio, se observó una respuesta fuerte y temprana frente a MPB83 en los animales del grupo EB (todos habían seroconvertido a las 5 semanas

tras la infección) en comparación al grupo IN (solamente 3 animales habían seroconvertido en la semana 5 y dos animales no seroconvirtieron en todo el estudio). Esto último se podría deber a una evolución retardada de la infección en este segundo grupo, ya que algunos estudios en bovinos y caprinos apuntan a una correlación directa entre la progresión de la infección y los títulos de anticuerpos frente a CMTB (Lyashchenko et al., 2004; Pérez de Val et al., 2011). Este mismo motivo, también explica que, en el tercer estudio, la infección con *M. microti*, solamente indujera una respuesta de IgG frente a MPB83 detectable en un solo animal del grupo EB-HD desde la semana 3 post desafío, aunque esta respuesta fue moderada, siendo esto consistente con el hecho que este animal no presentó signos clínicos ni patología avanzada.

En cuanto a las respuestas de IgG frente al complejo antigénico P22, en el primer estudio se observó la misma cinética que con MPB83, con una respuesta menor del grupo HIMC después de la vacunación comparada a la respuesta de los animales del grupo HIMB. Estos resultados son consistentes teniendo en cuenta que MPB83 es un componente mayoritario del complejo P22 (Infantes-Lorenzo et al., 2017b). Después del desafío, la respuesta del grupo vacunado con HIMC se incrementó, tendiendo a converger todos los animales vacunados y no vacunados al final del estudio. Pese a inducir cinéticas de respuesta de anticuerpos similares, se ha observado en estudios de campo en cabras que existe una complementariedad en los resultados de pruebas ELISA basadas en P22 y MPB83 y su uso combinado puede contribuir para la mejora de la sensibilidad del diagnóstico serológico (Arrieta-Villegas, Infantes-Lorenzo, et al., 2020).

En el segundo estudio las respuestas frente al P22 durante todo el experimento fueron casi indetectables en el grupo IN (mostrando solo un animal con seroconversión). En este caso la respuesta puede deberse a una progresión más lenta de la enfermedad y esto podría comprometer el diagnóstico por serología basado en P22 en etapas tempranas. Finalmente, en el tercer estudio no se detectaron respuestas frente a P22 en ninguno de los animales.

Los resultados de la presente tesis han contribuido a la mejora del conocimiento de herramientas para el control de la TB en cabras. Se ha demostrado que el concepto de autovacuna, basado en micobacterias inactivadas con un adyuvante, puede mejorar determinados parámetros de protección frente a la infección con la misma cepa de *M. caprae* en comparación con una vacuna universal heteróloga. Además, la comparación entre diferentes métodos de inoculación experimental de cabras con *M. caprae* ha proporcionado valiosa información sobre la progresión de la infección y la respuesta inmunitaria, sugiriendo que la vía IN podría ser una opción adecuada para reproducir la infección natural, aunque el modelo de infección todavía necesita ser refinado. Por último, se ha evidenciado que la exposición de cabras a *M. microti* puede inducir reacciones a las pruebas de IDR utilizadas para el control de la TB en el ganado y que esas pueden evitarse mediante el uso de reactivos de diagnóstico DIVA basados en antígenos específicos.





## **7- CONCLUSIONES GENERALES**



1. Tanto la autovacuna basada en *M. caprae* inactivado (HIMC) como la vacuna heteróloga basada en *M. bovis* inactivado (HIMB) confirieron protección frente a la infección experimental de cabras con *M. caprae*, reduciendo la extensión de lesiones pulmonares y extrapulmonares, así como mejorando los parámetros clínicos (ganancia de peso y ausencia de fiebre) en comparación con grupo control no vacunado.
2. La autovacuna HIMC indujo una mejor protección que la conferida por la vacuna heteróloga HIMB frente a la infección experimental con *M. caprae*, reduciendo significativamente el volumen de lesiones en pulmón y la carga bacteriana en los nódulos linfáticos pulmonares en comparación con los animales no vacunados. Los resultados destacan el potencial de las autovacunas como estrategia de control de la tuberculosis caprina. Sin embargo, se necesitan ensayos a mayor escala para evaluar su eficacia en condiciones de campo.
3. Ambas vacunas, HIMC y HIMB, indujeron una expansión significativa de la población de células T CD4 de memoria central productoras de IFN- $\gamma$  específicas para PPD-B tras la vacunación en comparación con los animales no vacunados, sugiriendo que este parámetro puede ser un buen predictor de la eficacia vacunal.
4. La nebulización intranasal (IN) de *M. caprae* indujo una progresión más lenta de la infección en comparación con la vía endobronquial (EB), retrasando la aparición de signos clínicos (disminución del aumento de peso corporal, pico de temperatura y aparición de otros signos de tuberculosis) y la respuesta inmunitaria específica (niveles de IFN- $\gamma$  y seroconversión).
5. El grupo IN presentó una menor gravedad y diseminación de las lesiones pulmonares, menor carga bacteriana y menor volumen de lesiones en los nódulos linfáticos pulmonares, mimetizando la afectación más frecuentemente observada en casos de infección natural, pero algunos animales presentaron una afectación exacerbada de la cavidad nasofaríngea y un mayor volumen de lesiones en los nódulos linfáticos retrofaríngeos, indicado que es preciso refinar el modelo para su futura aplicabilidad.
6. La infección con *M. microti* indujo tuberculosis pulmonar subclínica en todos los animales del grupo infectado con alta dosis por vía endobronquial, ya que ningún animal presentó signos clínicos, las lesiones tuberculosas fueron mínimas, pero se recuperaron micobacterias viables en los nódulos linfáticos pulmonares.

7. Las pruebas intradérmicas con tuberculinas utilizadas habitualmente en programas de erradicación de la tuberculosis presentaron resultados positivos o dudosos en algunos animales infectados con *M. microti*, que resultaron todos negativos a la prueba intradérmica con el cóctel ESAT-6/CFP10 (antígenos ausentes en el genoma de *M. microti*), que puede ayudar a distinguir la infección por *M. microti* de la causada por *M. bovis* o *M. caprae* en algunos contextos epidemiológicos.

## **8- BIBLIOGRAFIA**

**Bibliografía:**

- Ábalos, P., Valdivieso, N., de Val, B. P., Vordermeier, M., Benavides, M. B., Alegría-Morán, R., Saadi, K., Wistuba, M., Ortega, C., Sánchez, N., & Retamal, P. (2022a). Vaccination of Calves with the Mycobacterium bovis BCG Strain Induces Protection against Bovine Tuberculosis in Dairy Herds under a Natural Transmission Setting. *Animals*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091083>
- Ábalos, P., Valdivieso, N., de Val, B. P., Vordermeier, M., Benavides, M. B., Alegría-Morán, R., Saadi, K., Wistuba, M., Ortega, C., Sánchez, N., & Retamal, P. (2022b). Vaccination of Calves with the Mycobacterium bovis BCG Strain Induces Protection against Bovine Tuberculosis in Dairy Herds under a Natural Transmission Setting. *Animals*, *12*(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091083>
- Alcaraz-López, O. A., Flores-Villalva, S., Cortéz-Hernández, O., Viguera-Meneses, G., Carrisoza-Urbina, J., Benítez-Guzmán, A., Esquivel-Solís, H., Werling, D., Salguero Bodes, F. J., Vordermeier, M., Villarreal-Ramos, B., & Gutiérrez-Pabello, J. A. (2021). Association of immune responses of Zebu and Holstein-Friesian cattle and resistance to mycobacteria in a BCG challenge model [Article]. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(6), 3360–3365. <https://doi.org/10.1111/tbed.13939>
- Allen, S. S., Cassone, L., Lasco, T. M., & McMurray, D. N. (2004). Effect of Neutralizing Transforming Growth Factor beta 1 on the Immune Response against Mycobacterium tuberculosis in Guinea Pigs [Article]. *Infection and Immunity*, *72*(3), 1358–1363. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1358-1363.2004>
- Amato, B., Di Marco Lo Presti, V., Gerace, E., Capucchio, M. T., Vitale, M., Zanghì, P., Pacciarini, M. L., Marianelli, C., & Boniotti, M. B. (2018). Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis complex strains isolated from livestock and wild animals in Italy suggests the need for a different eradication strategy for bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(2), e416–e424. <https://doi.org/10.1111/tbed.12776>
- Ameni, G., Tafess, K., Zewde, A., Eguale, T., Tilahun, M., Hailu, T., Sirak, A., Salguero, F. J., Berg, S., Aseffa, A., Hewinson, R. G., & Vordermeier, H. M. (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 [Article]. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(1), 96–104. <https://doi.org/10.1111/tbed.12618>
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., & Domínguez, L. (2003). Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(6), 1785–1789. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02532-0>
- Arcos, J., Sasindran, S. J., Fujiwara, N., Turner, J., Schlesinger, L. S., & Torrelles, J. B. (2011). Human Lung Hydrolases Delineate Mycobacterium tuberculosis–Macrophage Interactions and the Capacity To Control Infection. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 372–381. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100823>

- Arentz, M., & Hawn, T. R. (2007). Tuberculosis infection: Insight from immunogenomics [Article]. *Drug Discovery Today. Disease Mechanisms*, 4(4), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2007.11.003>
- Arnold, I. C., Hutchings, C., Kondova, I., Hey, A., Powrie, F., Beverley, P., & Tchilian, E. (2015). Helicobacter hepaticus infection in BALB/c mice abolishes subunit-vaccine-induced protection against M. tuberculosis [Article]. *Vaccine*, 33(15), 1808–1814. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.041>
- Arrazuria, R., Juste, R. A., & Elguezabal, N. (2017). Mycobacterial Infections in Rabbits: From the Wild to the Laboratory. In *Transboundary and Emerging Diseases* (Vol. 64, Issue 4, pp. 1045–1058). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/tbed.12474>
- Arrey, F., Löwe, D., Kuhlmann, S., Kaiser, P., Moura-Alves, P., Krishnamoorthy, G., Lozza, L., Maertzdorf, J., Skrahina, T., Skrahina, A., Gengenbacher, M., Nouailles, G., & Kaufmann, S. H. E. (2019). Humanized Mouse Model Mimicking Pathology of Human Tuberculosis for in vivo Evaluation of Drug Regimens [Article]. *Frontiers in Immunology*, 10, 89–89. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00089>
- Arrieta-Villegas, C., Allepuz, A., Grasa, M., Martín, M., Cervera, Z., Mercader, I., López-Soria, S., Domingo, M., & Pérez de Val, B. (2020). Long-term efficacy of BCG vaccination in goat herds with a high prevalence of tuberculosis. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77334-1>
- Arrieta-Villegas, C., Infantes-Lorenzo, J. A., Bezos, J., Grasa, M., Vidal, E., Mercader, I., Singh, M., Domingo, M., de Juan, L., & Pérez de Val, B. (2020). Evaluation of P22 Antigenic Complex for the Immuno-Diagnosis of Tuberculosis in BCG Vaccinated and Unvaccinated Goats. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00374>
- Arrieta-Villegas, C., Martín, M., Verdés Martínez, J., Moll Sánchez, X., Espada, Y., Singh, M., Villarreal Ramos, B., Domingo, M., Pérez de Val, B., & Vidal Barba, E. (2020). *Immunogenicity and Protection against Mycobacterium caprae Challenge in Goats Vaccinated with BCG and Revaccinated after One Year* [Article].
- Arrieta-Villegas, C., Perálvarez, T., Vidal, E., Puighibet, Z., Moll, X., Canturri, A., Sevilla, I. A., Espada, Y., Juste, R. A., Domingo, M., & De Val, B. P. (2018). Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated Mycobacterium bovis in experimentally challenged goats. *PLoS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196948>
- Balseiro, A., Altuzarra, R., Vidal Barba, E., Moll Sánchez, X., Espada, Y., Sevilla, I. A., Domingo, M., Garrido, J. M., Juste, R. A., Prieto, M., & Pérez de Val, B. (2017). *Assessment of BCG and inactivated Mycobacterium bovis vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep* [Article].
- Balseiro, A., Prieto, J. M., Álvarez, V., Lesellier, S., Davé, D., Salguero, F. J., Sevilla, I. A., Infantes-Lorenzo, J. A., Garrido, J. M., Adriaensen, H., Juste, R. A., & Barral, M. (2020). Protective Effect of Oral BCG and Inactivated Mycobacterium bovis Vaccines in European Badgers ( Meles meles ) Experimentally Infected With M. bovis [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 41–41. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00041>



- Balseiro, A., Thomas, J., Gortázar, C., & Risalde, M. A. (2020). Development and Challenges in Animal Tuberculosis Vaccination [Article]. *Pathogens (Basel)*, *9*(6), 472. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060472>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. In *NATURE* (Vol. 392).
- Bang, B. (1908). Measures Taken against Animal Tuberculosis in Denmark. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, *21*, 287–303. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(08\)80069-0](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(08)80069-0)
- Barclay, W. R., Anacker, R. L., Brehmer, W., Leif, W., & Ribi, E. (1970). *Aerosol-Induced Tuberculosis in Subhuman Primates and the Course of the Disease After Intravenous BCG Vaccination* (Vol. 2, Issue 5). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Basu Roy, R., Whittaker, E., Seddon, J. A., & Kampmann, B. (2019). Tuberculosis susceptibility and protection in children. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 19, Issue 3, pp. e96–e108). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30157-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30157-9)
- Bayissa, B., Sirak, A., Worku, A., Zewude, A., Zeleke, Y., Chanyalew, M., Gumi, B., Berg, S., Conlan, A., Hewinson, R. G., Wood, J. L. N., Vordermeier, H. M., & Ameni, G. (2021). Evaluation of the Efficacy of BCG in Protecting Against Contact Challenge With Bovine Tuberculosis in Holstein-Friesian and Zebu Crossbred Calves in Ethiopia [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 702402–702402. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.702402>
- Beltrán-Beck, B., Romero, B., Sevilla, I. A., Barasona, J. A., Garrido, J. M., González-Barrio, D., Díez-Delgado, I., Minguijón, E., Casal, C., Vicente, J., Gortázar, C., & Aranaz, A. (2014). Assessment of an Oral Mycobacterium bovis BCG Vaccine and an Inactivated M. bovis Preparation for Wild Boar in Terms of Adverse Reactions, Vaccine Strain Survival, and Uptake by Nontarget Species [Article]. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1128/CI.00488-13>
- Bezós, J., Álvarez, J., Mínguez, O., Marqués, S., Martín, O., Vigo, V., Pieltain, C., Romero, B., Rodríguez, S., Casal, C., Mateos, A., Domínguez, L., & De Juan, L. (2012). Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in Veterinary Science*, *93*(2), 636–640. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.009>
- Bezós, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., & Juan, L. de. (2012). Tuberculosis in goats: Assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Veterinary Journal*, *191*(2), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.02.010>
- Bezós, J., Casal, C., Álvarez, J., Roy, A., Romero, B., Rodríguez-Bertos, A., Bárcena, C., Díez, A., Juste, R., Gortázar, C., Puentes, E., Aguiló, N., Martín, C., de Juan, L., & Domínguez, L. (2017). Evaluation of the Mycobacterium tuberculosis SO2 vaccine using a natural tuberculosis infection model in goats. *Veterinary Journal*, *223*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.006>
- Bezós, J., Casal, C., Díez-Delgado, I., Romero, B., Liandris, E., Álvarez, J., Sevilla, I., de Juan, L., Domínguez, L., & Gortázar, C. (2015). Goats challenged with different members of the Mycobacterium tuberculosis complex display different clinical pictures. *Veterinary*

- Immunology and Immunopathology*, 167(3–4), 185–189.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.009>
- Bezós, J., Casal, C., Romero, B., Liandris, E., Sánchez, N., Vigo, V., Domínguez, L., & de Juan, L. (2015). Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis* [Article]. *The Veterinary Journal* (1997), 205(1), 113–115. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.024>
- Bezós, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A. J., López, L., Rueda, P., & Domínguez, L. (2014). Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. In *Research in Veterinary Science* (Vol. 97, Issue S, pp. S44–S52). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.002>
- Bezós, J., de Juan, L., Romero, B., Álvarez, J., Mazzucchelli, F., Mateos, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2010). Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2–4), 269–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.07.018>
- Bezós, J., Marqués, S., Álvarez, J., Casal, C., Romero, B., Grau, A., Mínguez, O., Domínguez, L., & De Juan, L. (2014). Evaluation of single and comparative intradermal tuberculin tests for tuberculosis eradication in caprine flocks in Castilla y León (Spain). *Research in Veterinary Science*, 96(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.10.007>
- Boniotti, M. B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., Spisani, M., Nassuato, C., Gibelli, L., Sacchi, C., Zanoni, M., & Pacciarini, M. L. (2014). Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* isolates in wild boar from northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2834–2843.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00440-14>
- Bouz, G., & Al Hasawi, N. (2018). The zebrafish model of tuberculosis - no lungs needed. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 44, Issue 6, pp. 779–792). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1523132>
- Brites, D., Loiseau, C., Menardo, F., Borrell, S., Boniotti, M. B., Warren, R., Dippenaar, A., Parsons, S. D. C., Beisel, C., Behr, M. A., Fyfe, J. A., Coscolla, M., & Gagneux, S. (2018). A new phylogenetic framework for the animal-adapted mycobacterium tuberculosis complex. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02820>
- Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T., Niemann, S., Cole, S. T., & Brosch, R. (2002). Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infection and Immunity*, 70(10), 5568–5578. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5568-5578.2002>
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., Van Soolingen, D., & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex (Vol. 99, Issue 6). [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052548299](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052548299)
- Buddle, B. M., Martin Vordermeier, H., & Hewinson, R. G. (2016). *Experimental Infection Models of Tuberculosis in Domestic Livestock*. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec>

- Buddle, B. M., Vordermeier, H. M., Chambers, M. A., & de Klerk-Lorist, L. M. (2018). Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(OCT). <https://doi.org/10.3389/FVETS.2018.00259>
- 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. In *Vaccine* (Vol. 20).
- Buendía, A. J., Navarro, J. A., Salinas, J., McNair, J., de Juan, L., Ortega, N., Cámara, P., Torreblanca, P., & Sanchez, J. (2013). Ante-mortem diagnosis of caprine tuberculosis in persistently infected herds: Influence of lesion type on the sensitivity of diagnostic tests. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 1107–1113. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.10.003>
- Buzic, I., & Giuffra, V. (2020). The paleopathological evidence on the origins of human tuberculosis: a review [Article]. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 61(1 Suppl 1), E3–E8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379>
- Byrne, A., Sreevatsan, S., Lee Smith, R., Hope, J., & Palmer, M. (2022). Bovine tuberculosis in youngstock cattle: A narrative review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9.
- Cadmus, S., Adesokan, H., Jenkis, A., & Soolingen, D. (2009). Mycobacterium bovis and M. tuberculosis in goats, Nigeria. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 2064–2066. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090792>
- Calmette, A. (1923). *Tubercle bacillus infection and tuberculosis in man and animal: processes of infection and resistance in biological and experimental study*.
- Calmette, B. A. (1931). Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proceeding of the Royal Society of Medicine*, 24(11), 1481–1490.
- Cano-Terriza, D., Risalde, M. A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Sáez, J. L., & García-Bocanegra, I. (2018). Epidemiological surveillance of Mycobacterium tuberculosis complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 159(1), 87–91. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2018.08.015>
- Canto Alarcon, G. J., Rubio Venegas, Y., Bojorquez Narvaez, L., Pizano Martínez, O. E., García Casanova, L., Sosa Gallegos, S., Nava Vargas, A., Olvera Ramírez, A. M., & Milian Suazo, F. (2013). Efficacy of a Vaccine Formula against Tuberculosis in Cattle. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076418>
- Carrisoza-Urbina, J., Zhou XiangMei, & Gutiérrez-Pabello, J. A. (2018). Innate immune response in bovine tuberculosis [Bookitem]. In *Bovine tuberculosis* (pp. 140–153). CAB International. <https://doi.org/10.1079/9781786391520.0140>
- Casais, R., Iglesias, N., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Balseiro, A., Dominguez, M., & Juste, R. A. (2024). Non-specific effects of inactivated Mycobacterium bovis oral and parenteral treatment in a rabbit scabies model [Article]. *Veterinary Research (Paris)*, 55(1), 41–41. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01293-y>
- Català, M., Bechini, J., Tenesa, M., Pérez, R., Moya, M., Vilaplana, C., Valls, J., Alonso, S., López, D., Cardona, P.-J., & Prats, C. (2020). Modelling the dynamics of tuberculosis lesions in a

- virtual lung: Role of the bronchial tree in endogenous reinfection [Article]. *PLoS Computational Biology*, 16(5), e1007772–e1007772.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007772>
- Català, M., Prats, C., López, D., Cardona, P. J., & Alonso, S. (2020). A reaction-diffusion model to understand granulomas formation inside secondary lobule during tuberculosis infection. *PLoS ONE*, 15(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239289>
- Chadwick, Derek., Cardew, Gail., & Novartis Foundation. (1998). *Genetics and tuberculosis*. 269.
- Chambers, M. A., Carter, S. P., Wilson, G. J., Jones, G., Brown, E., Hewinson, R. G., & Vordermeier, M. (2014). Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: An overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. In *Veterinary Record* (Vol. 175, Issue 4, pp. 90–96). British Veterinary Association.  
<https://doi.org/10.1136/vr.102581>
- Chan, E. D., Verma, D., & Ordway, D. J. (2020). Animal Models of Mycobacteria Infection. *Current Protocols in Immunology*, 129(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.98>
- Chandran, A., Williams, K., Mendum, T., Stewart, G., Clark, S., Zadi, S., McLeod, N., Williams, A., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, M., Maroudam, V., Prasad, A., Bharti, N., Banerjee, R., Manjari Kasibhatla, S., & McFadden, J. (2019). Development of a diagnostic compatible BCG vaccine against Bovine tuberculosis. *Scientific Reports*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54108-y>
- Chen, H., Liu, X., Ma, X., Wang, Q., Yang, G., Niu, H., Li, S., He, B., He, S., Dannenberg, J., Zhu, B., & Zhang, Y. (2017). A New Rabbit-Skin Model to Evaluate Protective Efficacy of Tuberculosis Vaccines [Article]. *Frontiers in Microbiology*, 8, 842–842.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00842>
- Ciaravino, G., Vidal, E., Cortey, M., Martín, M., Sanz, A., Mercader, I., Perea, C., Robbe-Austerman, S., Allepuz, A., & Pérez de Val, B. (2021). Phylogenetic relationships investigation of Mycobacterium caprae strains from sympatric wild boar and goats based on whole genome sequencing. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(3), 1476–1486.  
<https://doi.org/10.1111/tbed.13816>
- Clark, S., Hall, Y., & Williams, A. (2015). Animal models of tuberculosis: Guinea pigs. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018572>
- Contreras, C., Alegría-Moran, R., Duchens, M., Ábalos, P., López, R., & Retamal, P. (2023). Specific and non-specific effects of Mycobacterium bovis BCG vaccination in dairy calves [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1278329–1278329.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1278329>
- Cooke, D. M., Goosen, W. J., Burgess, T., Witte, C., & Miller, M. A. (2023). Mycobacterium tuberculosis complex detection in rural goat herds in South Africa using Bayesian latent class analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 257.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110559>
- Cooper, A. M., & Khader, S. A. (2008). The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. In *Immunological Reviews* (Vol. 226, Issue 1, pp. 191–204). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00702.x>

- Cvetnic, Z., Katalinic-Jankovic, V., Sostaric, B., Spicic, S., Obrovac, M., Marjanovic, S., Benic, M., Kirin, B. K., & Vickovic, I. (2007). *INT J TUBERC LUNG DIS* 11(6):652-658 *Mycobacterium caprae in cattle and humans in Croatia*.
- Cvetnic, Z., Spicic, S., Katalinic-Jankovic, V., Marjanovic, S., Obrovac, M., Benic, M., Mitak, M., & Pavlik, I. (2006). *Mycobacterium caprae* infection in cattle and pigs on one family farm in Croatia: a case report [Article]. *Veterinárni Medicína*, 51(11), 523–531. <https://doi.org/10.17221/5586-VETMED>
- Dallenga, T., & Schaible, U. E. (2016). Neutrophils in tuberculosis—first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? In *Pathogens and disease* (Vol. 74, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw012>
- Daniel, R., Evans, H., Rolfe, S., de la Rúa-Domenech, R., Crawshaw, T., Higgins, R. J., Schock, A., & Clifton-Hadley, R. (2009). Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain [Article]. *Veterinary Record*, 165(12), 335–342.
- Daniel, R., Evans, H., Rolfe, S., De La Rúa-Domenech, R., Crawshaw, T., Higgins, R. J., Schock, A., & Clifton-Hadley, R. (2009). Papers: Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in great britain. *Veterinary Record*, 165(12), 335–342. <https://doi.org/10.1136/vr.165.12.335>
- Dannenbergh, A. M. (2009). Liquefaction and cavity formation in pulmonary TB: A simple method in rabbit skin to test inhibitors [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 89(4), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.05.006>
- Davis, J. M., Clay, H., Lewis, J. L., Ghori, N., Herbomel, P., & Ramakrishnan, L. (2002). Real-Time Visualization of *Mycobacterium*-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos of individual host factors and cells that mediate granuloma formation and their influence on infection outcomes (Flynn and Chan, 2001). *M. marinum*, a close genomic relative of *Mycobacterium tuberculosis*, the agent of human tuberculosis (Ton-thus providing a potential niche for macrophage. In *Immunity* (Vol. 17). <http://www.immunity.com/cgi/content/>
- Dean, A. S., Cox, H., & Signol, M. (2017). Epidemiology of drug-resistant tuberculosis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1019, pp. 209–220). Springer New York LLC. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64371-7_11)
- Dean, G., Whelan, A., Clifford, D., Salguero, F. J., Xing, Z., Gilbert, S., McShane, H., Hewinson, R. G., Vordermeier, M., & Villarreal-Ramos, B. (2014). Comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines [Article]. *Vaccine*, 32(11), 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.045>
- Deforges, L., Boulouis, H. J., Thibaud, J. L., Boulouha, L., Sougakoff, W., Blot, S., Hewinson, G., Truffot-Pernot, C., & Haddad, N. (2004). First isolation of *Mycobacterium microti* (Llama-type) from a dog. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.016>
- Denis, M., Keen, D. L., Parlane, N. A., Storset, A. K., & Buddle, B. M. (2007). Bovine natural killer cells restrict the replication of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages and enhance

- IL-12 release by infected macrophages [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 87(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.03.005>
- Didkowska, A., Krajewska-Wędzina, M., Bielecki, W., Brzezińska, S., Augustynowicz-Kopeć, E., Olech, W., Anusz, K., Sridhara, A. A., Johnathan-Lee, A., Elahi, R., Miller, M. A., Ray Waters, W., & Lyashchenko, K. P. (2021). Antibody responses in European bison (*Bison bonasus*) naturally infected with *Mycobacterium caprae*. *Veterinary Microbiology*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108952>
- Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., & Gortázar, C. (2017). Parenteral Vaccination with Heat-Inactivated *Mycobacterium Bovis* Reduces the Prevalence of Tuberculosis-Compatible Lesions in Farmed Wild Boar [Article]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), e18–e21. <https://doi.org/10.1111/tbed.12526>
- Diriba, G., Alemu, A., Yenew, B., Tola, H. H., Gamtesa, D. F., Mollalign, H., Eshetu, K., Moga, S., Abdella, S., Tollera, G., Kebede, A., & Dangisso, M. H. (2023). Epidemiology of extensively drug-resistant tuberculosis among patients with multidrug-resistant tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 132, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.04.392>
- Domingo, M., Gil, O., Serrano, E., Guirado, E., Nofrarias, M., Grassa, M., Cáceres, N., Pérez, B., Vilaplana, C., & Cardona, P. J. (2009). Effectiveness and safety of a treatment regimen based on isoniazid plus vaccination with mycobacterium tuberculosis cells' fragments: Field-study with naturally mycobacterium caprae-infected goats. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(6), 500–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02251.x>
- Domingo, M., Vidal, E., Espada, Y., Moll, X., Balseiro, A., Canturri, A., & Pérez de Val, B. (2018). Improved Measurement of Lesions for Assessment of Efficacy of Tuberculosis Vaccines in Small Ruminant Models: From Scoring To Imaging and Volumetric Quantification [Article]. *Journal of Comparative Pathology*, 158, 93–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.10.006>
- Domingo, M., Vidal, E., & Marco, A. (2014). Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.03.017>
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., Greenblatt, C. L., Lev-Maor, G., Kahila Bar-Gal, G., Matheson, C., Vernon, K., Nerlich, A. G., & Zink, A. R. (2004). Tuberculosis: From prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. In *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 4, Issue 9, pp. 584–592). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01133-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01133-8)
- Dorn-In, S., Körner, T., Büttner, M., Hafner-Marx, A., Müller, M., Heurich, M., Varadharajan, A., Blum, H., Gareis, M., & Schwaiger, K. (2020). Shedding of *Mycobacterium caprae* by wild red deer (*Cervus elaphus*) in the Bavarian alpine regions, Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 308–317. <https://doi.org/10.1111/tbed.13353>
- Driver, E. R., RYAN, G. J., HOFF, D. R., IRWIN, S. M., BASARABA, R. J., KRAMNIK, I., & LENAERTS, A. J. (2012). Evaluation of a Mouse Model of Necrotic Granuloma Formation Using C3HeB/FeJ Mice for Testing of Drugs against *Mycobacterium tuberculosis* [Article]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3181–3195. <https://doi.org/10.1128/AAC.00217-12>

- Duarte, E. L., Domingos, M., Amado, A., & Botelho, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*, *130*(3–4), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.012>
- EFSA. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, *19*(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- EFSA. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. In *EFSA Journal* (Vol. 21, Issue 12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Ehlers, S., & Schaible, U. E. (2012). *The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion* [Article]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>
- Elwood, R. L., Wilson, S., Blanco, J. C. G., Yim, K., Pletneva, L., Nikonenko, B., Samala, R., Joshi, S., Hemming, V. G., & Trucksis, M. (2007). The American cotton rat: A novel model for pulmonary tuberculosis [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *87*(2), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.07.001>
- Endsley, J. J., Furrer, J. L., Endsley, M. A., McIntosh, M. A., Maue, A. C., Waters, W. R., Lee, D. R., & Estes, D. M. (2004). Characterization of Bovine Homologues of Granulysin and NK-lysin. *The Journal of Immunology*, *173*(4), 2607–2614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2607>
- Esquivel-Solís, H., Vallecillo, A. J., Benítez-Guzmán, A., Adams, L. G., López-Vidal, Y., & Gutiérrez-Pabello, J. A. (2013). Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages [Article]. *PLoS One*, *8*(5), e63464–e63464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063464>
- Estrella, J. L., Kan-Sutton, C., Gong, X., Rajagopalan, M., Lewis, D. E., Hunter, R. L., Eissa, N. T., & Jagannath, C. (2011). A novel in vitro human macrophage model to study the persistence of *Mycobacterium tuberculosis* using vitamin D3 and retinoic acid activated THP-1 macrophages. *Frontiers in Microbiology*, *2*(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00067>
- Feng, C. G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A. G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. A., Wynn, T. A., & Sher, A. (2006). NK Cell-Derived IFN- $\gamma$  Differentially Regulates Innate Resistance and Neutrophil Response in T Cell-Deficient Hosts Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology*, *177*(10), 7086–7093. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7086>
- Fennelly, & Jones-López. (2015). Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis [Article]. *Frontiers in Immunology*, *6*, 313–313. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00313>
- Fernández-Veiga, L., Fuertes, M., Geijo, M. V., Pérez de Val, B., Vidal, E., Michelet, L., Boschioli, M. L., Gómez-Buendía, A., Bezos, J., Jones, G. J., Vordermeier, M., Juste, R. A., Garrido, J. M., & Sevilla, I. A. (2023). Differences in skin test reactions to official and defined antigens in guinea pigs exposed to non-tuberculous and tuberculous bacteria. *Scientific Reports*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30147-4>
- Feuerriegel, S., Köser, C. U., & Niemann, S. (2014). Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(5), 1205–1210. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt535>

- Figl, J., Köhler, H., Wedlich, N., Liebler-Tenorio, E. M., Grode, L., Parzmair, G., Krishnamoorthy, G., Nieuwenhuizen, N. E., Kaufmann, S. H. E., & Menge, C. (2023). Safety and Immunogenicity of Recombinant Bacille Calmette-Guérin Strain VPM1002 and Its Derivatives in a Goat Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065509>
- Fitzgerald, S. D., Hollinger, C., Mullaney, T. P., Bruning-Fann, C. S., Tilden, J., Smith, R., Averill, J., & Kaneene, J. B. (2016). Herd outbreak of bovine tuberculosis illustrates that route of infection correlates with anatomic distribution of lesions in cattle and cats [Article]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(2), 129–132. <https://doi.org/10.1177/1040638715626484>
- Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). *IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS*. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Forrellad, M. A., Vázquez, C. L., Blanco, F. C., Klepp, L. I., García, E. A., Rocha, R. V., Luciana, V., Bigi, M. M., Gutierrez, M. G., & Bigi, F. (2019). Rv2617c and P36 are virulence factors of pathogenic mycobacteria involved in resistance to oxidative stress [Article]. *Virulence*, 10(1), 1026–1033. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1693714>
- Frank, W., Reisinger, E. C., Brandt-Hamerla, W., Schwede, I., & Handrick, W. (2009). Lungentuberkulose durch mycobacterium microti bei einem immunkompetenten patienten. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(7–8), 282–286. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1164-0>
- Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J., & Dye, C. (2003). Tuberculosis [Article]. *The Lancet (British Edition)*, 362(9387), 887–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14333-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14333-4)
- Fritsche, A., Engel, R., Buhl, D., & Zellweger, J.-P. (2004). Mycobacterium bovis tuberculosis: from animal to man and back. In *INT J TUBERC LUNG DIS* (Vol. 8, Issue 7).
- Galagan, J. E. (2014). Genomic insights into tuberculosis. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 5, pp. 307–320). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3664>
- Gaonkar, S., Bharath, S., Kumar, N., Balasubramanian, V., & Shandil, R. K. (2010). Aerosol Infection Model of Tuberculosis in Wistar Rats [Article]. *International Journal of Microbiology*, 2010, 426035–426036. <https://doi.org/10.1155/2010/426035>
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., ... Hewinson, R. G. (2003). The Complete Genome Sequence of Mycobacterium bovis [Article]. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 100(13), 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>
- Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R. C., Boadella, M., Lyashchenko, K. P., Romero, B., Geijo, M. V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R. A., Vicente, J., de la Fuente, J., & Gortázar, C. (2011). Protection against tuberculosis in eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated mycobacterium bovis. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024905>
- Ghielmetti, G., Kupca, A. M., Hanczaruk, M., Friedel, U., Weinberger, H., Revilla-Fernandez, S., Hofer, E., Riehm, J. M., Stephan, R., & Glawischnig, W. (2021). Mycobacterium microti



- Infections in Free-Ranging Red Deer ( *Cervus elaphus* ) [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, 27(8), 2025–2032. <https://doi.org/10.3201/eid2708.210634>
- Gil, O., Díaz, I., Vilaplana, C., Tapia, G., Díaz, J., Fort, M., Cáceres, N., Pinto, S., Caylà, J., Corner, L., Domingo, M., & Cardona, P. J. (2010). Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS ONE*, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010030>
- Glanville, R. J. (2023). Australia's colourful path to tuberculosis freedom. *Irish Veterinary Journal*, 76. <https://doi.org/10.1186/s13620-023-00244-x>
- Glover, R. E. (1944). INFECTION OF MICE WITH MYCOBACT. TUBERCULOSIS (BOVIS) BY THE RESPIRATORY ROUTE. *British Journal of Experimental Pathology*, 25(5), 141–149.
- Gompo, T. R., Shrestha, A., Ranjit, E., Gautam, B., Ale, K., Shrestha, S., & Bhatta, D. D. (2020). Risk factors of tuberculosis in human and its association with cattle TB in Nepal: A one health approach. *One Health*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100156>
- Gong, W., Liang, Y., & Wu, X. (2020). Animal Models of Tuberculosis Vaccine Research: An Important Component in the Fight against Tuberculosis [Article]. *BioMed Research International*, 2020, 4263079–21. <https://doi.org/10.1155/2020/4263079>
- Gonzalez-Juarrero, M., Bosco-Lauth, A., Podell, B., Soffler, C., Brooks, E., Izzo, A., Sanchez-Campillo, J., & Bowen, R. (2013). Experimental aerosol mycobacterium bovis model of infection in goats. *Tuberculosis*, 93(5), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.05.006>
- Good, M., Bakker, D., Duignan, A., & Collins, D. M. (2018). The history of in vivo tuberculin testing in bovines: Tuberculosis, a “One Health” issue. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 5, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00059>
- Goodchild, A. V., & Clifton-Hadley, R. S. (2001). Cattle-to-cattle transmission of Mycobacterium bovis [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 81(1–2), 23–41. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0256>
- Gortazar, C., & Cowan, P. (2013). Introduction to this issue: Dealing with TB in wildlife [Article]. *Epidemiology and Infection*, 141(7), 1339–1341. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000599>
- Gray, D. F., Noble, J. L., & O'hara, M. (1961). Allergy in experimental rat tuberculosis. *Journal of Hygiene*, 59(4), 427–436. <https://doi.org/10.1017/S0022172400039127>
- Hameed, H. M. A., Islam, M. M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., Li, X., Tan, S., Delorme, V., Yew, W. W., Liu, J., & Zhang, T. (2018). Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-Mycobacterium tuberculosis strains. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>
- Harris, S. A., White, A., Stockdale, L., Tanner, R., Sibley, L., Sarfas, C., Meyer, J., Peter, J., O'Shea, M. K., Manjaly Thomas, Z.-R., Hamidi, A., Satti, I., Dennis, M. J., McShane, H., & Sharpe, S. (2018). Development of a non-human primate BCG infection model for the evaluation of candidate tuberculosis vaccines [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 108, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.11.006>

- Hershkovitz, I., Donoghue, H. D., Minnikin, D. E., Besra, G. S., Lee, O. Y. C., Gernaey, A. M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C. L., Lemma, E., Bar-Gal, G. K., & Spigelman, M. (2008). Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the Eastern mediterranean. *PLoS ONE*, *3*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003426>
- Holder, T., Coad, M., Allan, G., Hogarth, P. J., Vordermeier, H. M., & Jones, G. J. (2023). Vaccination of calves with *Bacillus Calmette-Guerin* Danish strain 1331 results in a duration of immunity of at least 52 weeks [Article]. *Vaccine*, *41*(48), 7290–7296. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.10.060>
- Hope, J. C., Khalid, H., Thom, M. L., Howard, C. J., & Shaw, D. J. (2023). Protective Efficacy of BCG Vaccination in Calves Vaccinated at Different Ages [Article]. *Pathogens (Basel)*, *12*(6), 789. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060789>
- Hope, J. C., Thom, M. L., McCormick, P. A., & Howard, C. J. (2004). Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria [Article]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *100*(3), 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.007>
- Horstkotte, M. A., Sobottka, I., Schewe, C. K., Schäfer, P., Laufs, R., Rüscher-Gerdes, S., & Niemann, S. (2001). *Mycobacterium microti* llama-type infection presenting as pulmonary tuberculosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(1), 406–407. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.406-407.2001>
- Hunter, L., Ruedas-Torres, I., Agulló-Ros, I., Rayner, E., & Salguero, F. J. (2023). Comparative pathology of experimental pulmonary tuberculosis in animal models [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1264833–1264833. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1264833>
- Infantes-Lorenzo, J. A., Moreno, I., Rivalde, M. D. L. Á., Roy, Á., Villar, M., Romero, B., Ibarrola, N., De La Fuente, J., Puentes, E., De Juan, L., Gortázar, C., Bezos, J., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2017a). Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Clinical Proteomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9171-z>
- Infantes-Lorenzo, J. A., Moreno, I., Rivalde, M. D. L. Á., Roy, Á., Villar, M., Romero, B., Ibarrola, N., De La Fuente, J., Puentes, E., De Juan, L., Gortázar, C., Bezos, J., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2017b). Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Clinical Proteomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9171-z>
- Infantes-Lorenzo, J. A., Moreno, I., Roy, A., Rivalde, M. A., Balseiro, A., De Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Puentes, E., Åkerstedt, J., Tessema, G. T., Gortázar, C., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2019). Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Veterinary Research*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1814-z>
- Infantes-Lorenzo, J. A., Romero, B., Rodríguez-Bertos, A., Roy, A., Ortega, J., de Juan, L., Moreno, I., Domínguez, M., Domínguez, L., & Bezos, J. (2020). Tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a camel (*Camelus dromedarius*). *BMC Veterinary Research*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02665-0>

- Jones, G. J., Konold, T., Hurley, S., Holder, T., Steinbach, S., Coad, M., Neil Wedlock, D., Buddle, B. M., Singh, M., & Martin Vordermeier, H. (2022). Test performance data demonstrates utility of a cattle DIVA skin test reagent (DST-F) compatible with BCG vaccination [Article]. *Scientific Reports*, *12*(1), 12052–12052. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16092-8>
- Jones, G. J., Steinbach, S., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Juste, R., & Vordermeier, H. M. (2016). Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *182*, 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.010>
- Juste, Blanco-Vázquez, C., Barral, M., Prieto, J. M., Varela-Castro, L., Lesellier, S., Dave, D., Sevilla, I. A., Martín Ezquerra, A. B., Adriaensen, H., Herrero-García, G., Garrido, J. M., Casais, R., & Balseiro, A. (2023). Efficacy of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* vaccine delivered to European badgers (*Meles meles*) through edible bait [Article]. *Heliyon*, *9*(9), e19349–e19349. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19349>
- Juste, Sevilla, I. A., Pérez de Val, B., & Arrieta-Villegas, C. (2022). *Heterologous and homologous vaccine protection against Mycobacterium tuberculosis complex experimental infection in cattle and goats. Proceedings of the Seventh International Conference on Mycobacterium Bovis. Galway, Ireland, 35.*
- Kasempimolporn, S., Areekul, P., Thaveekarn, W., Sutthisri, R., Boonchang, S., Sawangvaree, A., & Sitprija, V. (2021). Application of transdermal patches with new skin test reagents for detection of latent tuberculosis. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 68, Issue 9, pp. 1314–1319). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001037>
- Kennedy, H. E., Welsh, M. D., Bryson, D. G., Cassidy, J. P., Forster, F. I., Howard, C. J., Collins, R. A., & Pollock, J. M. (2002). Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1+  $\gamma\delta$  T cells. *Infection and Immunity*, *70*(3), 1488–1500. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1488-1500.2002>
- Khader, S. A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D. M., Swain, S., Pearl, J. E., Ghilardi, N., Desauvage, F. J., Lund, F. E., & Cooper, A. M. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection [Article]. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1805–1815. <https://doi.org/10.1084/jem.20052545>
- Koch, R. (1882). *Die Ätiologie der Tuberkulose.*
- Kock, R., Michel, A. L., Yeboah-Manu, D., Azhar, E. I., Torrelles, J. B., Cadmus, S. I., Brunton, L., Chakaya, J. M., Marais, B., Mboera, L., Rahim, Z., Haider, N., & Zumla, A. (2021). Zoonotic Tuberculosis – The Changing Landscape. *International Journal of Infectious Diseases*, *113*, S68–S72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.091>
- Kockelkorn, T. T. J. P., Schaefer-Prokop, C. M., Bozovic, G., Muñoz-Barrutia, A., van Rikxoort, E. M., Brown, M. S., de Jong, P. A., Viergever, M. A., & van Ginneken, B. (2014). Interactive lung segmentation in abnormal human and animal chest CT scans [Article]. *Medical Physics (Lancaster)*, *41*(8Part1), 081915–n/a. <https://doi.org/10.1118/1.4890597>
- Kolyva, A. S. (2012). Old and New Tb Drugs : Mechanisms of Action and Resistance [Bookitem]. In *InTech eBooks*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/30992>

- Larson, E. C., Ellis-Connell, A. L., Rodgers, M. A., Gubernat, A. K., Gleim, J. L., Moriarty, R. V., Balgeman, A. J., Ameel, C. L., Jauro, S., Tomko, J. A., Kracinovsky, K. B., Maiello, P., Borish, H. J., White, A. G., Klein, E., Bucsan, A. N., Darrah, P. A., Seder, R. A., Roederer, M., ... Scanga, C. A. (2023). Intravenous Bacille Calmette-Guérin vaccination protects simian immunodeficiency virus-infected macaques from tuberculosis [Article]. *Nature Microbiology*, 8(11), 2080–2092. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01503-x>
- Lefford, M. J., McGregor, D. D., & Mackaness, G. B. (1973). Immune Response to Mycobacterium tuberculosis in Rats [Article]. *Infection and Immunity*, 8(2), 182–189. <https://doi.org/10.1128/IAI.8.2.182-189.1973>
- Letang, E., Ellis, J., Naidoo, K., Casas, E. C., Sánchez, P., Hassan-Moosa, R., Cresswell, F., Miró, J. M., & García-Basteiro, A. L. (2020). Tuberculosis-HIV Co-Infection: Progress and Challenges After Two Decades of Global Antiretroviral Treatment Roll-Out. In *Archivos de Bronconeumología* (Vol. 56, Issue 7, pp. 446–454). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2019.11.015>
- Liebler-Tenorio, Elisabeth., & Pabst, R. (2006). MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research*, 37(3), 257–280. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006001>
- Lindenstrøm, T., Knudsen, N. P. H., Agger, E. M., & Andersen, P. (2013). Control of Chronic Mycobacterium tuberculosis Infection by CD4 KLRG1 – IL-2–Secreting Central Memory Cells . *The Journal of Immunology*, 190(12), 6311–6319. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300248>
- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 963–975). Chinese Soc Immunology. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
- López, V., Risalde, M. A., Contreras, M., Mateos-Hernández, L., Vicente, J., Gortázar, C., & Fuente, J. (2018). Heat-inactivated Mycobacterium bovis protects zebrafish against mycobacteriosis [Article]. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1515–1528. <https://doi.org/10.1111/jfd.12847>
- Lopez-Valencia, G., Renteria-Evangelista, T., Williams, J. de J., Licea-Navarro, A., Mora-Valle, A. D. la, & Medina-Basulto, G. (2010). Field evaluation of the protective efficacy of Mycobacterium bovis BCG vaccine against bovine tuberculosis [Article]. *Research in Veterinary Science*, 88(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.022>
- Lyashchenko, K., Whelan, A. O., Greenwald, R., Pollock, J. M., Andersen, P., Hewinson, R. G., & Vordermeier, H. M. (2004). Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with Mycobacterium bovis BCG and Infected with M. bovis. *Infection and Immunity*, 72(5), 2462–2467. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2462-2467.2004>
- Lyon, R., Mentele, J., Dethloff, L., Esch, K., Zimmerman, S., Pollock, J., Cook, R., Palmer, M. V., Ray Waters, W., & Whipple, D. L. (2004). Investigation of the transmission of Mycobacterium bovis from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res*, 65(11), 1483–1489.

- MACAMAPA. (2023). *Manual para el control de la infección por CMT en establecimientos de ganado caprino incluidos en el programa nacional de erradicación de la infección por el complejo Mycobacterium Tuberculosis (CMT) 2023*.
- Magno, M., Long, Nadel, J., Wanner, A., & Lockhart, A. (1990). Comparative anatomy of the tracheobronchial circulation. Discussion [Proceeding]. *The European Respiratory Journal*, 13(S), 557S-563S.
- Manabe, Y. C., DANNENBERG, A. M., TYAGI, S. K., HATEM, C. L., YODER, M., WOOLWINE, S. C., ZOOK, B. C., PITT, M. L. M., & BISHAI, W. R. (2003). Different Strains of Mycobacterium tuberculosis Cause Various Spectrums of Disease in the Rabbit Model of Tuberculosis [Article]. *Infection and Immunity*, 71(10), 6004–6011. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6004-6011.2003>
- MAPA. (2019). *Realización de las pruebas de intradermotuberculinización y gamma-interferón*. [www.visavet.es](http://www.visavet.es)
- MAPA. (2021). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2021 (Infección por el Complejo Mycobacterium tuberculosis)*. [www.mapa.es](http://www.mapa.es)
- MAPA. (2023). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2023 (Infección por el complejo Mycobacterium tuberculosis)*. [www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tuberculosis/Tuberculosis\\_bovina.aspx](http://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/tuberculosis/Tuberculosis_bovina.aspx)
- Marais, B. J., Buddle, B. M., Klerk-Lorist, L., Nguipdop-Djomo, P., Quinn, F., & Greenblatt, C. (2019). BCG vaccination for bovine tuberculosis; conclusions from the Jerusalem One Health workshop [Article]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 1037–1043. <https://doi.org/10.1111/tbed.13089>
- Martinez, L., Verma, R., Croda, J., Horsburgh, C. R., Walter, K. S., Degner, N., Middelkoop, K., Koch, A., Hermans, S., Warner, D. F., Wood, R., Cobelens, F., & Andrews, J. R. (2019). Detection, survival and infectious potential of Mycobacterium tuberculosis in the environment: A review of the evidence and epidemiological implications. In *European Respiratory Journal* (Vol. 53, Issue 6). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.02302-2018>
- Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J. M., de la Fuente, J., & Gortazar, C. (2007). Lesions associated with Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis*, 87(4), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2007.02.003>
- Martino, A., Meraviglia, S., El Daker, S., Dieli, F., & Martini, F. (2011). T cells cross-link innate and adaptive immunity in mycobacterium tuberculosis infection. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/587315>
- McCorry, T., Whelan, A. O., Welsh, M. D., McNair, J., Walton, E., Bryson, D. G., Hewinson, R. G., Vordermeier, H. M., & Pollock, J. M. (2005). Shedding of Mycobacterium bovis in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes [Article]. *Veterinary Record*, 157(20), 613–618. <https://doi.org/10.1136/vr.157.20.613>

- McGill, J. L., Sacco, R. E., Baldwin, C. L., Telfer, J. C., Palmer, M. V., & Ray Waters, W. (2014). The role of gamma delta T cells in immunity to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *159*(3–4), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.010>
- Mclaughlin, R. F., Tyler, W. S., & Canada, R. (1961). A Study of the Subgross Pulmonary Anatomy in Various Mammals. *American Journal of Anatomy*, *108*(2), 149–165. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aja.1001080203>
- Meijer, A. H. (2016). Protection and pathology in TB: learning from the zebrafish model [Article]. *Seminars in Immunopathology*, *38*(2), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0522-4>
- Melgarejo, C., Cobos, A., Planas, C., Fondevila, J., Martín, M., Cervera, Z., Cantero, G., Moll, X., Espada, Y., Domingo, M., Vidal, E., & Pérez de Val, B. (2023). Comparison of the pathological outcome and disease progression of two *Mycobacterium caprae* experimental challenge models in goats: endobronchial inoculation vs. intranasal nebulization. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236834>
- Melgarejo, C., Planas, C., Cobos, A., Arrieta-Villegas, C., Sevilla, I. A., Bezos, J., Moll, X., Espada, Y., Garrido, J. M., Domingo, M., Vidal, E., & Pérez de Val, B. (2022). A proof-of-concept study to investigate the efficacy of heat-inactivated autovaccines in *Mycobacterium caprae* experimentally challenged goats. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26683-0>
- Mellado, M., Reséndiz, D., Martínez, A. M., de Santiago, M. A., Véliz, F. G., & García, J. E. (2015). Milk yield and reproductive performance of Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis [Article]. *Tropical Animal Health and Production*, *47*(6), 1061–1066. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0828-1>
- Michelet, L., Cruz, K. De, Zanella, G., Aaziz, R., Bulach, T., Karoui, C., Hénault, S., Joncour, G., & Boschioli, M. L. (2015). Infection with *Mycobacterium microti* in animals in France. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(3), 981–985. <https://doi.org/10.1128/JCM.02713-14>
- Michelet, L., De Cruz, K., Karoui, C., Hénault, S., & Boschioli, M. L. (2017). *Mycobacterium microti* infection in a cow in France. In *Veterinary Record* (Vol. 180, Issue 17, p. 429). British Veterinary Association. <https://doi.org/10.1136/vr.j2041>
- Michelet, L., de Cruz, K., Phalente, Y., Karoui, C., Hénault, S., Beral, M., & Boschioli, M. L. (2016). *Mycobacterium microti* infection in dairy goats, France. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 22, Issue 3, pp. 569–570). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://doi.org/10.3201/eid2203.151870>
- Michelet, L., de Cruz, K., Tambosco, J., Hénault, S., & Boschioli, M. L. (2020). *Mycobacterium microti* interferes with bovine tuberculosis surveillance. *Microorganisms*, *8*(12), 1–7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121850>
- Michelet, L., Richomme, C., Réveillaud, E., De Cruz, K., Moyen, J. L., & Boschioli, M. L. (2021). *Mycobacterium microti* infection in red foxes in France. *Microorganisms*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061257>

- Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., & Moretta, L. (2008). NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 15, Issue 2, pp. 226–233). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402170>
- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D., & Behr, M. A. (2005). Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology*, *187*(18), 6386–6395. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6386-6395.2005>
- Mulder, W. J. M., Ochando, J., Joosten, L. A. B., Fayad, Z. A., & Netea, M. G. (2019). Therapeutic targeting of trained immunity. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(7), 553–566. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0025-4>
- Napp, S., Allepuz, A., Mercader, I., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Domingo, M., Romero, B., Bezos, J., & Perez De Val, B. (2013). Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Veterinary Record*, *172*(25), 663. <https://doi.org/10.1136/vr.101347>
- Napp, S., Ciaravino, G., Pérez de Val, B., Casal, J., Saéz, J. L., & Alba, A. (2019). Evaluation of the effectiveness of the surveillance system for tuberculosis in cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, *173*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104805>
- Nedeltchev, G. G., Raghunand, T. R., Jassal, M. S., Lun, S., Cheng, Q. J., & Bishai, W. R. (2009). Extrapulmonary dissemination of *mycobacterium bovis* but not *mycobacterium tuberculosis* in a bronchoscopic rabbit model of cavitary tuberculosis. *Infection and Immunity*, *77*(2), 598–603. <https://doi.org/10.1128/IAI.01132-08>
- Neill, S. D., Bryson, D. G., & Pollock, J. M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, *81*(1–2), 79–86. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0279>
- Neill, S. D., Pollock, J. M., Bryson, D. B., & Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 40).
- Netea, M. G., Quintin, J., & Van Der Meer, J. W. M. (2011). Trained immunity: A memory for innate host defense. In *Cell Host and Microbe* (Vol. 9, Issue 5, pp. 355–361). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>
- Nol, P., Wehtje, M. E., Bowen, R. A., Robbe-Austerman, S., Thacker, T. C., Lantz, K., Rhyan, J. C., Baeten, L. A., Juste, R. A., Sevilla, I. A., Gortázar, C., & Vicente, J. (2020). Effects of Inactivated *Mycobacterium bovis* Vaccination on Molokai-Origin Wild Pigs Experimentally Infected with Virulent *M. bovis* [Article]. *Pathogens (Basel)*, *9*(3), 199. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030199>
- Nord, A., Linner, R., Salomone, F., Bianco, F., Ricci, F., Murgia, X., Schlun, M., Cunha-Goncalves, D., & Perez-de-Sa, V. (2020). Lung deposition of nebulized surfactant in newborn piglets: Nasal CPAP vs Nasal IPPV [Article]. *Pediatric Pulmonology*, *55*(2), 514–520. <https://doi.org/10.1002/ppul.24603>
- 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 [Article]. *Vaccine*, *36*(48), 7338–7344. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.025>
- O'Brien, D. J., Thacker, T. C., Salvador, L. C. M., Duffiney, A. G., Robbe-Austerman, S., Camacho, M. S., Lombard, J. E., & Palmer, M. V. (2023). The devil you know and the devil you don't: current status and challenges of bovine tuberculosis eradication in the United States. In

- Irish Veterinary Journal* (Vol. 76). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13620-023-00247-8>
- O'garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). *The Immune Response in Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A. S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B. J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBue, P., & Fujiwara, P. I. (2017). Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis* —a call for action [Article]. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(1), e21–e25. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30139-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30139-6)
- Ordway, D., Palanisamy, G., Henao-Tamayo, M., Smith, E. E., Shanley, C., Orme, I. M., & Basaraba, R. J. (2007). The Cellular Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in the Guinea Pig [Article]. *Journal of Immunology*, *179*(4), 2532–2541. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2532>
- Orgeur, M., Frigui, W., Pawlik, A., Clark, S., Williams, A., Ates, L. S., Ma, L., Bouchier, C., Parkhill, J., Brodin, P., & Brosch, R. (2021). Pathogenomic analyses of *mycobacterium microti*, an *esx-1*-deleted member of the *mycobacterium tuberculosis* complex causing disease in various hosts. *Microbial Genomics*, *7*(2), 1–18. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000505>
- Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A., Swaminathan, S., Spigelman, M., Getahun, H., Menzies, D., & Raviglione, M. (2016). Tuberculosis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
- Palmer, M. V., Thacker, T. C., & Waters, W. R. (2009). Vaccination with *mycobacterium bovis* BCG strains Danish and Pasteur in white-tailed deer (*odocoileus virginianus*) experimentally challenged with *mycobacterium bovis*. *Zoonoses and Public Health*, *56*(5), 243–251. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01198.x>
- Palmer, M. V., & Waters, W. R. (2011). Bovine tuberculosis and the establishment of an eradication program in the United States: Role of veterinarians. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.4061/2011/816345>
- Palmer, M. V., Waters, W. R., & Whipple, D. L. (2002). Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *82*(6), 275–282.
- Panteix, G., Gutierrez, M. C., Boschioli, M. L., Rouviere, M., Plaidy, A., Pressac, D., Porcheret, H., Chyderiotis, G., Ponsada, M., Van Oortegem, K., Salloum, S., Cabuzel, S., Bañuls, A. L., Van De Perre, P., & Godreuil, S. (2010). Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: A study of six recent cases in France. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(8), 984–989. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.019372-0>
- Papaventsis, D., Dougas, G., Kalkouni, O., Karabela, S., & Manika, K. (2021). Occupational exposure to zoonotic tuberculosis caused by *mycobacterium caprae*, Northern Greece, 2019. *Emerging Infectious Diseases*, *27*(7), 1997–1999. <https://doi.org/10.3201/eid2707.204399>
- Parikka, M., Hammarén, M. M., Harjula, S.-K. E., Halfpenny, N. J. A., Oksanen, K. E., Lahtinen, M. J., Pajula, E. T., Iivanainen, A., Pesu, M., & Rämetsä, M. (2012). *Mycobacterium marinum*



- causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish [Article]. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002944–e1002944.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002944>
- Parlane, N. A., & Buddle, B. M. (2015). Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. In *Current Clinical Microbiology Reports* (Vol. 2, Issue 1, pp. 44–53). Springer.  
<https://doi.org/10.1007/s40588-014-0009-4>
- Pérez de Val, B., López-Soria, S., Nofrarías, M., Martín, M., Vordermeier, H. M., Villarreal-Ramos, B., Romera, N., Escobar, M., Solanes, D., Cardona, P. J., & Domingo, M. (2011). Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11), 1872–1881.  
<https://doi.org/10.1128/CVI.05323-11>
- Pérez de Val, B., Napp, S., Velarde, R., Lavín, S., Cervera, Z., Singh, M., Allepuz, A., & Mentaberre, G. (2017). Serological Follow-up of Tuberculosis in a Wild Boar Population in Contact with Infected Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), 275–283.  
<https://doi.org/10.1111/tbed.12368>
- Pérez de Val, B., Nofrarías, M., López-Soria, S., Garrido, J. M., Vordermeier, H. M., Villarreal-Ramos, B., Martín, M., Puentes, E., Juste, R. A., & Domingo, M. (2012). Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-191>
- Pérez de Val, B., Perea, C., Estruch, J., Solano-Manrique, C., Riera, C., Sanz, A., Vidal, E., & Velarde, R. (2022). Generalized tuberculosis due to *Mycobacterium caprae* in a red fox phylogenetically related to livestock breakdowns. *BMC Veterinary Research*, 18(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03454-7>
- Pérez de Val, B., Sanz, A., Soler, M., Allepuz, A., Michelet, L., Boschiroli, M. L., & Vidal, E. (2019). *Mycobacterium microti* infection in Free-Ranging Wild Boar, Spain, 2017-2019. *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), 2152–2154.  
<https://doi.org/10.3201/eid2511.190746>
- Pérez de Val, B., Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raeber, A., & Domingo, M. (2016a). Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine*, 34(7), 881–886. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.004>
- Pérez de Val, B., Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raeber, A., & Domingo, M. (2016b). Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine*, 34(7), 881–886. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2016.01.004>
- Pérez de Val, B., Vidal, E., Villarreal-Ramos, B., Gilbert, S. C., Andaluz, A., Moll, X., Martín, M., Nofrarías, M., McShane, H., Vordermeier, H. M., & Domingo, M. (2013). A Multi-Antigenic Adenoviral-Vectored Vaccine Improves BCG-Induced Protection of Goats against Pulmonary Tuberculosis Infection and Prevents Disease Progression. *PLoS ONE*, 8(11), e81317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081317>

- 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. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(9), 1339–1347. <https://doi.org/10.1128/CVI.00275-12>
- Pesciaroli, M., Alvarez, J., Boniotti, M. B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., & Pasquali, P. (2014). Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science*, *97*(S), S78–S85. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.015>
- Peterhans, S., Landolt, P., Friedel, U., Oberhänsli, F., Dennler, M., Willi, B., Senn, M., Hinden, S., Kull, K., Kipar, A., Stephan, R., & Ghielmetti, G. (2020). *Mycobacterium microti*: Not Just a Coincidental Pathogen for Cats. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.590037>
- Pigoli, C., Tranquillo, V., Gibelli, L. R., Gaffuri, A., Alborali, G. L., Pacciarini, M., Zanoni, M., Boniotti, M. B., Sironi, G., Caniatti, M., & Grieco, V. (2021). *Mycobacterium microti* Infection in Wild Boar (*Sus scrofa*): Histopathology Analysis Suggests Containment of the Infection. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.734919>
- Plüddemann, A., Mukhopadhyay, S., & Gordon, S. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry [Article]. *Immunological Reviews*, *240*(1), 11–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00989.x>
- Pollock, J. M., & Neill, S. D. (2002a). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. In *Veterinary Journal* (Vol. 163, Issue 2, pp. 115–127). <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0655>
- Pollock, J. M., Rodgers, J. D., Welsh, M. D., & McNair, J. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, *112*(2-4 SPEC. ISS.), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.032>
- Pollock, J. M., Welsh, M. D., & McNair, J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease [Article]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *108*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.012>
- Pollock, & Neill. (2002b). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle [Article]. *The Veterinary Journal* (1997), *163*(2), 115–127. <https://doi.org/10.1053/tvj.2001.0655>
- Price, S. J., & Hope, J. C. (2009). Enhanced secretion of interferon- $\gamma$  by bovine  $\gamma\delta$  T cells induced by coculture with *Mycobacterium bovis*-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology*, *126*(2), 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02889.x>
- Prodinger, W. M., Indra, A., Koksalan, O. K., Kilicaslan, Z., & Richter, E. (2014). *Mycobacterium caprae* infection in humans. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1501–1513). Expert Reviews Ltd. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.974560>
- Quintas, H., Reis, J., Pires, I., & Alegria, N. (2010). Tuberculosis in goats. In *Veterinary Record* (Vol. 166, Issue 14, pp. 437–438). <https://doi.org/10.1136/vr.c1678>

- Rahlwes, K. C., Dias, B. R. S., Campos, P. C., Alvarez-Arguedas, S., & Shiloh, M. U. (2023). Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* [Article]. *Virulence*, *14*(1), 2150449–2150449. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
- Ramirez, I. C., Santillan, M. A., & Dante, V. (2003a). The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection. *Small Ruminant Research*, *47*(2), 113–116. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00243-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00243-2)
- Ramirez, I. C., Santillan, M. A., & Dante, V. (2003b). The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection [Article]. *Small Ruminant Research*, *47*(2), 113–116. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00243-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00243-2)
- Ramos, B., Pereira, A. C., Reis, A. C., & Cunha, M. V. (2020). Estimates of the global and continental burden of animal tuberculosis in key livestock species worldwide: A meta-analysis study. In *One Health* (Vol. 10). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100169>
- Retamal, P., Ábalos, P., Alegría-Morán, R., Valdivieso, N., Vordermeier, M., Jones, G., Saadi, K., Perez Watt, C., Salinas, C., Ávila, C., Padilla, V., Benavides, B., & Orellana, R. (2021). Vaccination of Holstein heifers with *Mycobacterium bovis* BCG strain induces protection against bovine tuberculosis and higher milk production yields in a natural transmission setting. *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.14108>
- Reviriego Gordejo, F. J., & Vermeersch, J. P. (2006). Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Microbiology*, *112*(2-4 SPEC. ISS.), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.034>
- Rifat, D., Prideaux, B., Savic, R. M., Urbanowski, M. E., Parsons, T. L., Luna, B., Marzinke, M. A., Ordonez, A. A., Demarco, V. P., Jain, S. K., Dartois, V., Bishai, W. R., & Dooley, K. E. (2018). Pharmacokinetics of rifapentine and rifampin in a rabbit model of tuberculosis and correlation with clinical trial data. In *Sci. Transl. Med* (Vol. 10). <https://www.science.org>
- Riojas, M. A., McGough, K. J., Rider-Riojas, C. J., Rastogi, N., & Hazbón, M. H. (2018). Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis* [Article]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(1), 324–332. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>
- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Javed, M. T., Sáez-Llorente, J. L., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2011). *Mycobacterium caprae* Infection in Livestock and Wildlife, Spain [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(3), 532–535. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100618>
- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Tariq Javed, M., Sáez-Llorente, J. L., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., & Aranaz, A. (2011). *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(3), 532–535. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100618>
- Rodríguez-Campos, S., González, S., De Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Casal, C., Álvarez, J., Fernández-De-Mera, I. G., Castellanos, E., Mateos, A., Sáez-Llorente, J. L., Domínguez, L., Aranaz, A., Garrido, F., Fornell, C., Gómez, J. M., Jiménez, A., Muñoz, I., Téllez, J. A., ...

- Rodríguez, J. (2012). A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(4), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.008>
- Rothel, J. S., Jonest, S. L., Corner, L. A., Cox, J. C., & Wood, P. R. (1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon- $\gamma$  and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 67(4), 134–137.
- Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Kahila Bar-Gal, G., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., & Brittain, D. (2001). Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. In *Origins of Tuberculosis in North America • CID* (Vol. 33). <https://academic.oup.com/cid/article/33/3/305/277074>
- Roy, A., Tomé, I., Romero, B., Lorente-Leal, V., Infantes-Lorenzo, J. A., Domínguez, M., Martín, C., Aguiló, N., Puentes, E., Rodríguez, E., De Juan, L., Rivalde, M. A., Gortázar, C., Domínguez, L., & Bezos, J. (2019). Evaluation of the immunogenicity and efficacy of BCG and MTBVAC vaccines using a natural transmission model of tuberculosis. *Veterinary Research*, 50(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0702-7>
- Roy, Díez-Guerrier, A., Ortega, J., de la Cruz, M. L., Sáez, J. L., Domínguez, L., de Juan, L., Álvarez, J., & Bezos, J. (2019). Evaluation of the McIntock syringe as a cause of non-specific reactions in the intradermal tuberculin test used for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 122, 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.025>
- Roy, Rivalde, M. A., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Sevilla, I., Díez-Guerrier, A., Rodríguez-Bertos, A., Domínguez, M., Garrido, J., Gortázar, C., & Domínguez, L. (2018). Response of goats to intramuscular vaccination with heat-killed Mycobacterium bovis and natural challenge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, (60), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.006>
- Salguero, F. J., Gibson, S., Garcia-Jimenez, W., Gough, J., Strickland, T. S., Vordermeier, H. M., & Villarreal-Ramos, B. (2017). Differential Cell Composition and Cytokine Expression Within Lymph Node Granulomas from BCG-Vaccinated and Non-vaccinated Cattle Experimentally Infected with Mycobacterium bovis [Article]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(6), 1734–1749. <https://doi.org/10.1111/tbed.12561>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Sanchez, J., Tomás, L., Ortega, N., Buendía, A. J., del Rio, L., Salinas, J., Bezos, J., Caro, M. R., & Navarro, J. A. (2011). Microscopical and Immunological Features of Tuberculoid Granulomata and Cavitory Pulmonary Tuberculosis in Naturally Infected Goats. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2–3), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.12.006>
- Sandor, M., Weinstock, J. V., & Wynn, T. A. (2003). Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends in Immunology*, 24(1), 44–52. <http://treimm.trends.com>

- Santos, N., Richomme, C., Nunes, T., Vicente, J., Alves, P. C., de la Fuente, J., Correia-neves, M., Boschioli, M. L., Delahay, R., & Gortázar, C. (2020). Quantification of the animal tuberculosis multi-host community offers insights for control. *Pathogens*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens9060421>
- Scanga, C. A., & Flynn, J. L. (2014). Modeling Tuberculosis in Nonhuman Primates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *a*(12). <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
- Sergeant, E. S. G., Happold, J., & Langstaff, I. (2017). Evaluation of Australian surveillance for freedom from bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, *95*(12), 474–479. <https://doi.org/10.1111/avj.12648>
- Serrano, M., Sevilla, I. A., Fuertes, M., Geijo, M., Rivalde, M. Á., Ruiz-Fons, J. F., Gortazar, C., Juste, R. A., Domínguez, L., Elguezabal, N., & Garrido, J. M. (2018). Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: Implications for diagnosis. *Veterinary Research*, *49*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>
- Seva, J., Menchén, V., Navarro, J. A., Pallarés, F. J., Villar, D., Vázquez, F., & Bernabé, A. (2002). Caprine tuberculosis eradication program: an immunohistochemical study. *Small Ruminant Research*, *46*(2–3), 107–114. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00174-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00174-8)
- Sevilla, I. A., Arnal, M. C., Fuertes, M., Martín, E., Comenge, J., Elguezabal, N., Fernández de Luco, D., & Garrido, J. M. (2020). Tuberculosis outbreak caused by *Mycobacterium caprae* in a rabbit farm in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(1), 431–441. <https://doi.org/10.1111/tbed.13366>
- Shanahan, A., Good, M., Duignan, A., Curtin, T., & More, S. J. (2011). Tuberculosis in goats on a farm in Ireland: Epidemiological investigation and control. *Veterinary Record*, *168*(18), 485. <https://doi.org/10.1136/vr.c6880>
- Sharpe, S. A., Eschelbach, E., Basaraba, R. J., Gleeson, F., Hall, G. A., McIntyre, A., Williams, A., Kraft, S. L., Clark, S., Gooch, K., Hatch, G., Orme, I. M., Marsh, P. D., & Dennis, M. J. (2009). Determination of lesion volume by MRI and stereology in a macaque model of tuberculosis. *Tuberculosis*, *89*(6), 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.09.002>
- Shea, J., Smith, C., Halse, T. A., Kohlerschmidt, D., Rourke, A. K., Musser, K. A., Escuyer, V., & Lapierre, P. (2022). Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotype Related to *M. caprae* [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, *28*(7), 1431–1436. <https://doi.org/10.3201/eid2807.212353>
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., & Enninga, J. (2012). Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathogens*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002507>
- Singh, P., Kolloli, A., & Subbian, S. (2018). Animal models of tuberculosis. In *Understanding the Host Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis Infection* (pp. 67–97). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97367-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97367-8_4)
- Singhal, A., Aliouat, E. M., Hervé, M., Mathys, V., Kiass, M., Creusy, C., Delaire, B., Tsenova, L., Fleurisse, L., Bertout, J., Camacho, L., Foo, D., Tay, H. C., Siew, J. Y., Boukhouchi, W., Romano, M., Mathema, B., Dartois, V., Kaplan, G., & Bifani, P. (2011). Experimental

- tuberculosis in the wistar rat: A model for protective immunity and control of infection. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018632>
- Smith, K., Kleynhans, L., Snyders, C., Bernitz, N., Cooper, D., van Helden, P., Warren, R. M., Miller, M. A., & Goosen, W. J. (2021). Use of the MILLIPLEX® bovine cytokine/chemokine multiplex assay to identify *Mycobacterium bovis*-infection biomarkers in African buffaloes (*Syncerus caffer*) [Article]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 231, 110152–110152. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110152>
- Smith, R. L., Tauer, L. W., Sanderson, M. W., & Gröhn, Y. T. (2014). Minimum cost to control bovine tuberculosis in cow–calf herds [Article]. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1–2), 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.014>
- Smyth, A. J., Welsh, M. D., Girvin, R. M., & Pollock, J. M. (2001). In vitro responsiveness of  $\gamma\delta$  T cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle to mycobacterial antigens: Predominant involvement of WC1+ cells. *Infection and Immunity*, 69(1), 89–96. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.89-96.2001>
- Srinivasan, S., Easterling, L., Rimal, B., Niu, X. M., Conlan, A. J. K., Dudas, P., & Kapur, V. (2018). Prevalence of Bovine Tuberculosis in India: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1627–1640. <https://doi.org/10.1111/tbed.12915>
- Srinivasan, S., Jones, G., Veerasami, M., Steinbach, S., Holder, T., Zewude, A., Fromsa, A., Ameni, G., Easterling, L., Bakker, D., Juleff, N., Gifford, G., Hewinson, R. G., Martin Vordermeier, H., & Kapur, V. (2019). HEALTH AND MEDICINE A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. In *Sci. Adv* (Vol. 5).
- Sugawara, I., Udagawa, T., Aoki, T., & Mizuno, S. (2009). Establishment of A Guinea Pig Model of Latent Tuberculosis with GFP-introduced *Mycobacterium Tuberculosis* [Article]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(3), 257–262. <https://doi.org/10.1620/tjem.219.257>
- Sugawara, I., Yamada, H., & Mizuno, S. (2004). Pulmonary Tuberculosis in Spontaneously Diabetic Goto Kakizaki Rats [Article]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 135–145. <https://doi.org/10.1620/tjem.204.135>
- Sugawara, I., Yamada, H., & Mizuno, S. (2006). Nude rat (F344/N-rnu) tuberculosis [Article]. *Cellular Microbiology*, 8(4), 661–667. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00658.x>
- Sun, H., Ma, X., Zhang, G., Luo, Y., Tang, K., Lin, X., Yu, H., Zhang, Y., & Zhu, B. (2012). Effects of immunomodulators on liquefaction and ulceration in the rabbit skin model of tuberculosis [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 92(4), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2012.03.005>
- Swaim, L. E., Connolly, L. E., Volkman, H. E., Humbert, O., Born, D. E., & Ramakrishnan, L. (2006). *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infection and Immunity*, 74(11), 6108–6117. <https://doi.org/10.1128/IAI.00887-06>
- Tagliapietra, V., Boniotti, M. B., Mangeli, A., Karaman, I., Alborali, G., Chiari, M., D'inciau, M., Zanoni, M., Rizzoli, A., & Pacciarini, M. L. (2021). *Mycobacterium microti* at the

- environment and wildlife interface. *Microorganisms*, 9(10).  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9102084>
- Tan, Z., Madzin, H., Norafida, B., ChongShuang, Y., Sun, W., Nie, T., & Cai, F. (2024). DeepPulmoTB: A benchmark dataset for multi-task learning of tuberculosis lesions in lung computerized tomography (CT) [Article]. *Heliyon*, 10(4), e25490–e25490.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25490>
- Tang, S., Mao, Y., Jones, R. M., Tan, Q., Ji, J. S., Li, N., Shen, J., Lv, Y., Pan, L., Ding, P., Wang, X., Wang, Y., MacIntyre, C. R., & Shi, X. (2020). Aerosol transmission of SARS-CoV-2? Evidence, prevention and control [Article]. *Environment International*, 144, 106039–106039. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106039>
- Tanner, R., O’Shea, M. K., Fletcher, H. A., & McShane, H. (2016). In vitro mycobacterial growth inhibition assays: A tool for the assessment of protective immunity and evaluation of tuberculosis vaccine efficacy. *Vaccine*, 34(39), 4656–4665.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.07.058>
- Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J., & Steer, K. (2006). Mycobacterium microti isolated from two pigs [2]. In *Veterinary Record* (Vol. 159, Issue 2, pp. 59–60). British Veterinary Association. <https://doi.org/10.1136/vr.159.2.59-a>
- Theus, S. A., Cave, M. D., & Eisenach, K. D. (2004). Activated THP-1 Cells: An Attractive Model for the Assessment of Intracellular Growth Rates of Mycobacterium tuberculosis Isolates. *Infection and Immunity*, 72(2), 1169–1173. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1169-1173.2004>
- Thoen, C. O., Steele, J. H., & Kaneene, J. B. (2014). Zoonotic Tuberculosis Mycobacterium bovis and other pathogenic mycobacteria Third edition. In T. Charles O., S. James H., & K. John B. (Eds.), *Zoonotic tuberculosis* (3rd ed., Vol. 16, p. 32). <http://ebookcentral.proquest.com/lib/uab/detail.action?docID=1631076>.
- Thom, M. L., Hope, J. C., McAulay, M., Villarreal-Ramos, B., Coffey, T. J., Stephens, S., Vordermeier, H. M., & Howard, C. J. (2006). The effect of tuberculin testing on the development of cell-mediated immune responses during Mycobacterium bovis infection [Article]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(1), 25–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.07.001>
- Thomas, J., Rivalde, M. Á., Serrano, M., Sevilla, I., Geijo, M., Ortíz, J. A., Fuertes, M., Ruíz-Fons, J. F., de la Fuente, J., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J., & Gortázar, C. (2017). The response of red deer to oral administration of heat-inactivated Mycobacterium bovis and challenge with a field strain [Article]. *Veterinary Microbiology*, 208, 195–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.007>
- Tonjum, T., WELTY, D. B., JANTZEN, E., & SMALL, P. L. (1998). Differentiation of Mycobacterium ulcerans, M. marinum, and M. haemophilum: Mapping of Their Relationships to M. tuberculosis by Fatty Acid Profile Analysis, DNA-DNA Hybridization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis [Article]. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 918–925.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.918-925.1998>
- Tschopp, R., Bobosha, K., Aseffa, A., Schelling, E., Habtamu, M., Iwnetu, R., Hailu, E., Firdessa, R., Hussein, J., Young, D., & Zinsstag, J. (2011). Bovine tuberculosis at a cattle-small

- ruminant-human interface in Meskan, Gurage region, Central Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-318>
- Tschopp, R., Conlan, A. J. K., Gemechu, G., Almaw, G., Hattendorf, J., Zinsstag, J., & Wood, J. L. N. (2021). Effect of Bovine Tuberculosis on Selected Productivity Parameters and Trading in Dairy Cattle Kept Under Intensive Husbandry in Central Ethiopia [Article]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 698768–698768. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.698768>
- Tsenova, L., Harbacheuski, R., Sung, N., Ellison, E., Fallows, D., & Kaplan, G. (2007). BCG vaccination confers poor protection against M. tuberculosis HN878-induced central nervous system disease [Article]. *Vaccine*, 25(28), 5126–5132. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.024>
- Uranga, S., Marinova, D., Martin, C., & Aguilo, N. (2016). Protective Efficacy and Pulmonary Immune Response Following Subcutaneous and Intranasal BCG Administration in Mice [Article]. *Journal of Visualized Experiments*, 115. <https://doi.org/10.3791/54440>
- Urbanowski, M. E., Ordonez, A. A., Ruiz-Bedoya, C. A., Jain, S. K., & Bishai, W. R. (2020). Cavitory tuberculosis: the gateway of disease transmission. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 20, Issue 6, pp. e117–e128). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30148-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30148-1)
- van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., Riksen, N., & Netea, M. G. (2015). Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. In *Molecular Immunology* (Vol. 68, Issue 1, pp. 40–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.019>
- Van Leeuwen, L. M., Van Der Sar, A. M., & Bitter, W. (2014). *Animal Models of Tuberculosis: Zebrafish*. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
- Van Rhijn, I., Godfroid, J., Michel, A., & Rutten, V. (2008). Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models [Article]. *Microbes and Infection*, 10(7), 711–715. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.005>
- Via, L. E., England, K., Weiner, D. M., Schimel, D., Zimmerman, M. D., Dayao, E., Chen, R. Y., Dodd, L. E., Richardson, M., Robbins, K. K., Cai, Y., Hammoud, D., Herscovitch, P., Dartois, V., Flynn, J. A. L., & Barry, C. E. (2015). A sterilizing tuberculosis treatment regimen is associated with faster clearance of bacteria in cavitory lesions in marmosets. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4181–4189. <https://doi.org/10.1128/AAC.00115-15>
- Via, L. E., Schimel, D., Weiner, D. M., Dartois, V., Dayao, E., Cai, Y., Yoon, Y.-S., Dreher, M. R., Kastenmayer, R. J., Laymon, C. M., Carny, J. E., Flynn, J. L., Herscovitch, P., & Barry, 3rd. (2012). Infection Dynamics and Response to Chemotherapy in a Rabbit Model of Tuberculosis using [18F]2-Fluoro-Deoxy-d-Glucose Positron Emission Tomography and Computed Tomography [Article]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4391–4402. <https://doi.org/10.1128/AAC.00531-12>
- 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 Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1182-5>
- Vidal, E., Burgaya, J., Michelet, L., Arrieta-Villegas, C., Cantero, G., de Cruz, K., Tambosco, J., Di Bari, M., Romolo, N., Boschioli, M. L., & de Val, B. P. (2022). Experimental



- Mycobacterium microti Infection in Bank Voles (*Myodes glareolus*). *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010135>
- Vidal, E., Grasa, M., Perálvarez, T., Martín, M., Mercader, I., & Pérez de Val, B. (2018). Transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* between dairy sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 158, 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.11.010>
- Villarreal-Ramos, B., Berg, S., Whelan, A., Holbert, S., Carreras, F., Salguero, F. J., Khatri, B. L., Malone, K., Rue-Albrecht, K., Shaughnessy, R., Smyth, A., Ameni, G., Aseffa, A., Sarradin, P., Winter, N., Vordermeier, M., & Gordon, S. V. (2018). Experimental infection of cattle with *Mycobacterium tuberculosis* isolates shows the attenuation of the human tubercle bacillus for cattle. *Scientific Reports*, 8(1), 894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18575-5>
- Villemin, J.-A. (1865). *Cause et nature de la tuberculose* (Vol. 61).
- Volkman, H. E., Pozos, T. C., Zheng, J., Davis, J. M., Rawls, J. F., & Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*, 327(5964), 466–469. <https://doi.org/10.1126/science.1179663>
- Vordermeier, H. M., Chambers, M. A., Cockle, P. J., Whelan, A. O., Simmons, J., & Hewinson, R. G. (2002). Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infection and Immunity*, 70(6), 3026–3032. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3026-3032.2002>
- Vordermeier, H. M., Pérez de Val, B., Buddle, B. M., Villarreal-Ramos, B., Jones, G. J., Hewinson, R. G., & Domingo, M. (2014). Vaccination of domestic animals against tuberculosis: Review of progress and contributions to the field of the TBSTEP project. *Research in Veterinary Science*, 97(S), S53–S60. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.015>
- Vordermeier, H. M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P. J., McAulay, M., Rhodes, S. G., Thacker, T., Gilbert, S. C., McShane, H., Hill, A. V. S., Xing, Z., & Hewinson, R. G. (2009). Viral Booster Vaccines Improve *Mycobacterium bovis* BCG-Induced Protection against Bovine Tuberculosis [Article]. *Infection and Immunity*, 77(8), 3364–3373. <https://doi.org/10.1128/IAI.00287-09>
- Vordermeier, H. M., Whelan, A., Cockle, P. J., Farrant, L., Palmer, N., & Hewinson, R. G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(3), 571–578. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.571-578.2001>
- Waddington, F. G., & Ellwood, D. C. (1972). An experiment to challenge the resistance to tuberculosis in B.C.G. vaccinated cattle in Malawi. *The British Veterinary Journal*, 128(11), 541–552. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)36683-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)36683-6)
- Wallis, R. S., Palaci, M., Vinhas, S., Hise, A. G., Ribeiro, F. C., Landen, K., Cheon, S.-H., Song, H.-Y., Phillips, M., Dietze, R., & Ellner, J. J. (2001). A Whole Blood Bactericidal Assay for Tuberculosis [Article]. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(8), 1300–1303. <https://doi.org/10.1086/319679>

- Wang, J., Zhou, X., Pan, B., Yang, L., Yin, X., Xu, B., & Zhao, D. (2013). Investigation of the effect of *Mycobacterium bovis* infection on bovine neutrophils functions [Article]. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, *93*(6), 675–687. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.07.002>
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., & Vordermeier, M. (2005). Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen,  $\gamma\delta$  (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*, *133*(4), 223–234. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2005.05.001>
- Warsinske, H. C., DiFazio, R. M., Linderman, J. J., Flynn, J. A. L., & Kirschner, D. E. (2017). Identifying mechanisms driving formation of granuloma-associated fibrosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Theoretical Biology*, *429*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.017>
- Waters, W. R., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Bannantine, J. P., Vordermeier, H. M., Hewinson, R. G., Greenwald, R., Esfandiari, J., McNair, J., Pollock, J. M., Andersen, P., & Lyashchenko, K. P. (2006). Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, *13*(6), 648–654. <https://doi.org/10.1128/CVI.00061-06>
- Waters, W. R., Palmer, M. V., Thacker, T. C., Davis, W. C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K. G., Hope, J. C., & Estes, D. M. (2011). Tuberculosis immunity: Opportunities from studies with cattle. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.1155/2011/768542>
- Wedlich, N., Figl, J., Liebler-Tenorio, E. M., Köhler, H., von Pückler, K., Rissmann, M., Petow, S., Barth, S. A., Reinhold, P., Ulrich, R., Grode, L., Kaufmann, S. H. E., & Menge, C. (2022). Video Endoscopy-Guided Intrabronchial Spray Inoculation of *Mycobacterium bovis* in Goats and Comparative Assessment of Lung Lesions With Various Imaging Methods. *Frontiers in Veterinary Science*, *(9)*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.877322>
- Weldingh, K., & Andersen, P. (2008). ESAT-6/CFP10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs [Article]. *PloS One*, *3*(4), e1978–e1978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001978>
- Wells, A. Q., & Oxon, D. M. (1937). TUBERCULOSIS IN WILD VOLES (From the Sir William Dunn School of Pathology). *The Lancet*, *229*(5934), 1221–1221. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)83505-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)83505-9).
- Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A., Bryson, D. G., & Pollock, J. M. (2005). Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology*, *114*(1), 101–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02003.x>
- Whelan, A., Court, P., Xing, Z., Clifford, D., Hogarth, P. J., Vordermeier, M., & Villarreal-Ramos, B. (2012). Immunogenicity comparison of the intradermal or endobronchial boosting of BCG vaccinates with Ad5-85A. *Vaccine*, *30*(44), 6294–6300. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.086>
- WHO. (2023). *1-s2.0-S2666524722003597-main*.

- Williams, A., & Orme, I. M. (2016). Animal Models of Tuberculosis: An Overview [Article]. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0004-2015>
- Wilton, S., & Cousins, D. (1992). Detection and Identification of Multiple Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. *Genome Res.*, 1, 269–273. <https://doi.org/10.1101/gr.1.4.269>
- Wolf, A. J., Desvignes, L., Linas, B., Banaiee, N., Tamura, T., Takatsu, K., & Ernst, J. D. (2008). Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20071367>
- Wood, P. R., & Jones, S. L. (2001). BOVIGAM™: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81(1–2), 147–155. <https://doi.org/10.1054/tube.2000.0272>
- Yoshida, S., Suga, S., Ishikawa, S., Mukai, Y., Tsuyuguchi, K., Inoue, Y., Yamamoto, T., & Wada, T. (2018). Mycobacterium caprae Infection in Captive Borneo Elephant, Japan [Article]. *Emerging Infectious Diseases*, 24(10), 1937–1940. <https://doi.org/10.3201/eid2410.180018>
- Zwyer, M., Çavusoglu, C., Ghielmetti, G., Pacciarini, M. L., Scaltriti, E., Van Soolingen, D., Dötsch, A., Reinhard, M., Gagneux, S., & Brites, D. (2021). A new nomenclature for the livestock-associated Mycobacterium tuberculosis complex based on phylogenomics [Article]. *Open Research Europe*, 1, 100. <https://doi.org/10.12688/openreseurope.14029.1>



## 9. Lista de Abreviaturas

**BAAR** Bacilos acido-alcohol-resistentes

**BCG** *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette-Guèrin

**CD** Células Dendríticas

**CMTB** Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**CPA** Células Presentadoras de Antígenos

**CReSA** *Centre de Recerca en Sanitat Animal*

**DIVA** Diferenciación Animales Vacunados e Infectados

**FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación

**H&E** Tinción de Hematoxilina y Eosina

**IDR** Intradermorreacción

**IFN** Interferones

**IGRA** Interferon-Gamma Release Assays

**IL** Interleucina

**IRTA** *Institut de Recerca i tecnologia Agroalimentàries*

**LCTB** Lesión Compatible con tuberculosis

### Lista de Abreviaturas

**LN** Linfonodos

**MAP** *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

**MDR-TB** *Multidrug-Resistant tuberculosis*

**NK** células asesinas naturales

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**OMSA** Organización Mundial de Sanidad Animal

**PATUBES** Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres

**PNETB** Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina

**PPD- A** *M. avium purified protein derivative*

**PPD-B** *M. bovis purified protein derivative*

**PRRs** Receptores de Reconocimiento de Patógenos

**p.v** Post vaccination

**TAC** Tomografía Axial Computarizada

**TB** Tuberculosis

**TDR-TB** *Totally Drug-Resistant tuberculosis*

**TNF- $\alpha$**  Factor de Necrosis Tumoral Alfa

**XDR-TB** *Extensively Drug-Resistant tuberculosis*

**ZN** Tinción de Ziehl-Neelsen