

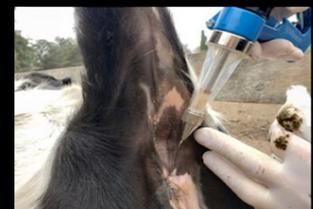
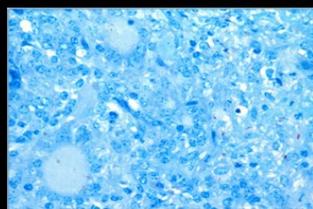


SERIE MONOGRÁFICA
MICOBACTERIAS DE INTERÉS VETERINARIO

TUBERCULOSIS BOVINA

VACUNAS EXPERIMENTALES

3



SERIE MONOGRÁFICA
MICOBACTERIAS DE INTERÉS VETERINARIO

TUBERCULOSIS BOVINA

VACUNAS EXPERIMENTALES

3

**ASOCIACIÓN ARGENTINA DE VETERINARIOS DE
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO**

COMISIÓN CIENTÍFICA DE MICOBACTERIAS

Chile 1856 PB (1227), Ciudad Autónoma de Buenos Aires,
Buenos Aires Argentina

Marzo de 2022

AUTORES

Federico Blanco (Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, CONICET, Buenos Aires, Argentina) y Angel Cataldi.

Contribución de la Comisión Científica de Micobacterias de la AAVLD

La [Comisión Científica de Micobacterias de la AAVLD](#) brinda respaldo a los contenidos del presente documento.

EDITORES

Angel Cataldi. Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, CONICET, Buenos Aires, Argentina

María Emilia Eirin. Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), CICVyA, CNIA, INTA Castelar, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, CONICET, Buenos Aires, Argentina

María Julia Traversa. Dto. Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

DISEÑO DE TAPAS

María Laura Chiapparrone y María Julia Traversa. Dto. Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina.

ÍNDICE

PRÓLOGO	1
VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA	2
INTERFERENCIA DE LA VACUNACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO DE TBB	3
CEPA <i>M. bovis</i> BCG	5
VACUNAS RECOMBINANTES CONTRA LA TBB	6
CANDIDATOS VACUNALES EXPERIMENTALES EN BOVINOS EN ARGENTINA Y BRASIL	8
REFERENCIAS	9

PRÓLOGO

La tuberculosis es una enfermedad que afecta a humanos y animales con diferentes especies de micobacterias implicadas. La tuberculosis humana es causada por *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, mientras que, en los bovinos, el agente causal es *Mycobacterium bovis*. Ambos bacilos pertenecen a un grupo taxonómico llamado complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual también incluye las especies *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae* y *Mycobacterium mungi*. *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* son altamente similares en la secuencia del genoma (99%) y causan enfermedades cursando con una fisiopatología muy parecida. En humanos, la tuberculosis se trata con un conjunto de antibióticos bien establecido y una extensa parte de la población mundial se previene mediante vacunación con la cepa *M. bovis* BCG. Esta vacuna no se aplica en bovinos para prevenir la Tuberculosis Bovina (TBB). Este capítulo trata sobre los antecedentes y el estado del arte de la investigación en vacunas contra la TBB, centrado en el empleo de vacunas vivas atenuadas.

Angel A. Cataldi

Miembro de la Comisión Científica de Micobacterias

VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS BOVINA

No existen actualmente vacunas para el control de la tuberculosis bovina (TBB), pese a que esta enfermedad además de afectar a animales de interés pecuario, es una importante zoonosis. A su vez, la única vacuna en uso para el control de la tuberculosis humana es la cepa denominada Bacilo de Calmette y Guerin (BCG), obtenida en Francia en 1921 a partir de un aislamiento de *M. bovis*. Desde entonces ha sido empleada en gran parte de la población humana para evitar las formas más exacerbadas de la tuberculosis que son la diseminada y la meníngea. Si bien confiere inmunidad para evitar estas formas, no se observó protección contra la forma más común de la enfermedad que es la pulmonar. A pesar que esta cepa ha sido probada experimentalmente en bovinos, uno de los impedimentos para el empleo de *M. bovis* BCG en el ganado bovino es que la vacunación puede causar interferencia con el método de diagnóstico avalado por la OIE para el comercio internacional de bovinos en pie que es la intradermorreacción (IDR). Además, la Unión Europea y otros países poseen legislación que prohíbe el uso de la cepa BCG en animales [2]. Aun así, la cepa *M. bovis* BCG ha sido empleada para vacunar fauna silvestre en Gran Bretaña desde el 2010 hasta el 2015¹ y como vacuna experimental para zarigüeyas en Nueva Zelanda [3]. Si bien la cepa *M. bovis* BCG se considera inocua, en humanos se observa que en pacientes pediátricos causa complicaciones con una incidencia que oscila entre 1:10.000 a 1:1.000.000 de las vacunas aplicadas [4]. Estas complicaciones generalmente son concomitantes con inmunodeficiencias primarias y por esto en Argentina existe una disposición normativa que contraindica la aplicación de la cepa *M. bovis* BCG en personas inmunodeprimidas². También en los pacientes que reciben el tratamiento oncológico con *M. bovis* BCG contra el cáncer de vejiga urinaria no muscular invasivo se observa tuberculosis diseminada en baja frecuencia [5].

Además de la cepa *M. bovis* BCG existen candidatos vacunales recombinantes que se encuentran en etapa de experimentación. Algunos de ellos como la vacuna MVA85A se evaluaron en niños, pero estas pruebas han sido causa de controversias en la comunidad académica dado que los estudios realizados en este grupo etario se habrían aprobado ignorando resultados desalentadores obtenidos a partir de los estudios en macacos [6].

¹ <https://www.gov.uk/government/publications/2010-to-2015-government-policy-bovine-tuberculosis-bovine-tb/2010-to-2015-government-policy-bovine-tuberculosis-bovine-tb>

² Ministerio de Salud de la República Argentina. 2001. Resolución 814/2001. Normas Técnicas para el Control de la Tuberculosis. Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/65000-69999/68432/norma.htm>. Fecha de consulta: 6 de agosto de 2021.

INTERFERENCIA DE LA VACUNACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO DE TBB

Como se mencionó anteriormente, una de las desventajas de la vacunación con la cepa *M. bovis* BCG es la interferencia con los métodos de diagnóstico. La inmunización con *M. bovis* BCG sensibiliza a los bovinos frente a los reactivos de uso común en las principales pruebas diagnósticas como son la intradermorreacción (IDR) y técnica *in vitro* de liberación de IFN γ frente a la estimulación específica. Cabe destacar que la sensibilización a la IDR en animales vacunados con *M. bovis* BCG disminuye, pasando de un 80% a un 8% en el período entre los seis y nueve meses posteriores a la vacunación [7].

Una alternativa es desarrollar pruebas diagnósticas que permitan diferenciar animales vacunados de infectados, denominadas pruebas DIVA, por su sigla derivada del inglés *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*. El principio de las mismas es reemplazar la tuberculina bovina por antígenos recombinantes específicos que se encuentran en las cepas salvajes de *M. bovis* y que están ausentes en las cepas vacunales. De esta manera, los animales sanos vacunados con la cepa *M. bovis* BCG no responderían a los antígenos presentes en las cepas salvajes que serían los aplicados para realizar el diagnóstico [8].

Entre la IDR y el test de liberación de IFN γ , la metodología más simple para ser adaptada a una prueba DIVA es la determinación de IFN γ , por la practicidad en el uso de distintos antígenos al momento de la estimulación de la muestra de sangre [9].

La secuenciación completa del genoma de *M. bovis* BCG [10] y de *M. bovis* [11] posibilitó la identificación de antígenos para ser utilizados en las pruebas DIVA. Principalmente por la posibilidad de seleccionar aquellos ausentes en la cepa *M. bovis* BCG con respecto a las cepas *M. bovis* salvajes.

Dos antígenos importantes que se encuentran ausentes en el genoma de *M. bovis* BCG son ESAT-6 y CFP-10, estas proteínas son codificadas por la región del genoma denominada RD1 [12]. Debido a que la misma región RD1 se encuentra presente en *M. tuberculosis*, las pruebas diagnósticas para humanos empleando cócteles de estos antígenos purificados han sido de utilidad para diferenciar a los individuos vacunados con la cepa *M. bovis* BCG de los pacientes tuberculosos [13,14].

Si bien la prueba de IFN γ estimulando a la sangre entera con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 ha sido de utilidad para diferenciar bovinos vacunados de infectados [15,16], el inconveniente que se ha observado es que la sensibilidad no supera a la alcanzada con la prueba de la tuberculina PPD Bovina. A causa de esta limitación es que las investigaciones para mejorar las pruebas DIVA están orientadas hacia la búsqueda de antígenos complementarios para la estimulación sin resignar la capacidad discriminatoria de la prueba.

A partir del mismo procedimiento, mediante el análisis de la secuencia genómica, se probaron otros antígenos pertenecientes a regiones también ausentes en *M. bovis* BCG como las denominadas RD2 y RD14. Ninguna de las pruebas realizadas pudo mejorar la sensibilidad del cóctel ESAT-6/CFP-10. Por lo tanto, se recurrió a otras áreas

de investigación como la transcriptómica (análisis del conjunto de transcritos expresados por *M. bovis* BCG y *M. bovis*) para lograr igualar la efectividad de la tuberculina PPD Bovina en todos sus aspectos. Se realizaron ensayos para analizar la expresión de genes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* que fueran altamente representativos y de expresión estable bajo diferentes condiciones de cultivo. En estos ensayos se pudo identificar a una proteína denominada Rv3615c, la cual a pesar de estar presente en el genoma de *M. bovis* BCG no puede ser secretada debido a que depende del sistema de secreción ESX-1 codificado dentro de la región RD1 [17]. Al no ser secretada Rv3615c, pierde la antigenicidad. El empleo de Rv3615c recombinante, en estudios preliminares permitió detectar mediante la prueba diagnóstica al 37% de animales infectados con *M. bovis* sin dar resultados positivos para bovinos vacunados con *M. bovis* BCG [18]. La utilización del cóctel ESAT-6/CFP-10 junto a Rv3615c permitió mejorar la sensibilidad de la prueba diagnóstica con respecto al empleo de ESAT-6/CFP-10 tanto en el diagnóstico de tuberculosis en humanos como en bovinos [17,18,19].

La modificación de la prueba diagnóstica de liberación de IFN γ para diferenciar la sensibilización inespecífica que puede aplicarse con fines DIVA permitió abrir el camino hacia el desarrollo de antígenos específicos para inocular en la IDR. En comparación con el ELISA para detección de la liberación de IFN γ , la técnica de la IDR resulta más eficiente en la relación costo-beneficio y es la más difundida y aceptada en el diagnóstico de la TBB. Al igual que lo descrito para el IFN γ , el uso en la IDR de los antígenos ESAT-6/CFP-10 junto a Rv3615c demostró diferenciar bovinos infectados de vacunados con *M. bovis* BCG [20]. En un estudio preliminar el agregado de la proteína Rv3020c a esta última combinación permitió mejorar la sensibilidad de la IDR [21].

CEPA *M. bovis* BCG

A lo largo de los años de investigación la cepa *M. bovis* BCG fue empleada como vacuna para bovinos por distintas vías y a diferentes dosis [22]. Principalmente vía subcutánea a dosis bajas (1×10^4 - 1×10^6) y vía oral a dosis mayores (1×10^8 UFC) [23]. Además, otra de las variaciones introducidas fue el empleo de diferentes cepas, entre ellas *M. bovis* BCG Danish y *M. bovis* BCG Pasteur, y la edad de los animales a vacunar [24,25]. Los resultados obtenidos indicaron que se alcanzó un grado de protección mayor en bovinos menores de un mes de vida en comparación con animales mayores a seis meses de edad [26,27].

Sin embargo, a pesar de todos los avances realizados en el uso de la cepa *M. bovis* BCG en el ganado bovino, la misma no forma parte actualmente de los programas sanitarios para el control y erradicación de la TBB en ningún país.

De los recientes ensayos con la cepa *M. bovis* BCG se destacan tres por haberse realizado en condiciones de transmisión natural. En los siguientes párrafos detallaremos los principales resultados obtenidos en los mismos.

En México, Lopez-Valencia y colaboradores realizaron un ensayo a campo para evaluar la eficacia de protección de *M. bovis* BCG. En el mismo emplearon una dosis vacunal única de 10^6 bacterias. En total se utilizaron 140 terneros de una o dos semanas de edad. La mitad fueron vacunados con *M. bovis* BCG y la otra mitad con placebo. Luego de vacunados, los terneros permanecieron en contacto con bovinos positivos a la IDR hasta los 12 meses de edad. El nivel de protección se evaluó considerando dos pruebas que miden la inmunidad mediada por células. Una de ellas la liberación de IFN γ , empleando tuberculina PPD Bovina como estímulo o los antígenos recombinantes ESAT-6/CFP-10, y la otra la IDR. De esta manera, la eficacia de protección fue del 59,4% (IC95%: 47.64-71.16) y los terneros no vacunados presentaron un riesgo de contagio 2,4 veces mayor que los vacunados [28].

En Etiopía, Ameni y colaboradores [29] evaluaron la capacidad protectora de *M. bovis* BCG. Se vacunaron 13 terneros neonatos y otros 14 se dejaron como grupo control. Luego estos animales se expusieron a bovinos positivos a la IDR durante un período de diez a veintitrés meses. Las pruebas empleadas fueron la liberación de IFN γ , pruebas comparativas de IDR, examen *post mortem* y cultivo bacteriológico. La patología y la cantidad de aislamientos de *M. bovis* fueron mayores en los bovinos del grupo control. En general, la protección conferida por la vacunación calculando los distintos parámetros se estimó entre 56 y 68%. En este ensayo también se evaluó la capacidad de identificar animales vacunados protegidos y no protegidos mediante el empleo del ensayo de liberación de IFN γ usando los antígenos recombinantes ESAT-6/CFP-10, concluyendo que estos antígenos permiten diferenciar animales vacunados y no protegidos de aquellos que resultaron protegidos.

En Nueva Zelanda, Nuggent y colaboradores [30] realizaron un ensayo de vacunación en el cual se empleó una dosis baja de *M. bovis* BCG (3×10^5 UFC) en comparación a los otros ensayos, y además, los animales vacunados estuvieron expuestos a los animales positivos a la IDR durante un período de tiempo más prolongado, el cual fue de 3,7

años. Este estudio de varios años de duración involucró a más de 800 animales de 1 a 2 años de edad, divididos en tres cohortes, los cuales fueron aleatoriamente seleccionados para recibir la vacuna o para integrar el grupo de los animales control no vacunados. Este ensayo de vacuna constituyó una prueba piloto que se efectuó en las condiciones de cría extensiva existentes en ese país. Al finalizar el ensayo se realizó el examen patológico de los animales incluyendo análisis de los ganglios para corroborar presencia de *M. bovis* aún en ausencia de lesiones tuberculosas. La prevalencia general de TBB fue menor al 4% anual e identificada por las lesiones macroscópicas detectadas. Hubo dos casos de presencia de lesiones entre 520 bovinos vacunados en comparación con ocho de los 297 bovinos no vacunados. La vacunación con *M. bovis* BCG en baja dosis no afectó significativamente las tasas de respuesta del ganado a las pruebas diagnósticas *ante mortem*, IDR y liberación de IFN γ , realizadas a un tiempo mayor a los 7 meses luego de la vacunación.

VACUNAS RECOMBINANTES CONTRA LA TBB

Las opciones para nuevos candidatos a vacunas se han incrementado con el correr de los años, la capacidad de generar nuevas mutantes atenuadas de cepas de *M. bovis* mediante manipulación genética, así como el empleo de vacunas a sub-unidad con proteínas recombinantes, vacunas a ADN y basadas en vectores virales, abrió un campo nuevo de investigación en el área de la vacunación contra la tuberculosis. En general, las vacunas a subunidad no lograron inducir una respuesta inmune eficiente y por lo tanto las mismas requieren del avance en el uso de nuevos adyuvantes para mejorar su capacidad protectora. Las vacunas a subunidades suelen ser además las más costosas. Gran Bretaña, Nueva Zelanda y en menor medida Estados Unidos, Argentina, España y México conforman los países en los cuales se han evaluado vacunas recombinantes. En la **Tabla 1** se resumen algunos de los ejemplos evaluados en estos países.

Tabla 1. Estrategias y candidatos vacunales en experimentación.

Tipo de vacuna	Composición	Dosis/aplicación	Resultado	Referencia
Viva atenuada	Simple deletada $\Delta RD1$	Una dosis	Desafío en establos P2 Protección equivalente a BCG a 4 meses <i>post</i> desafío	Waters et al. (2009) Vaccine 27, 1201–1209.(12).
Viva atenuada	Doble deletada $\Delta RD1\Delta panCD$	Una dosis	Desafío en establos P2 Sin protección	Waters et al. (2007) Vaccine 25, 7832–7840.(13).
Viva atenuada	Auxótrofa $\Delta leuD$	Una dosis	Desafío en establos P2 Protección (BCG no incluida)	Khare et al. (2007) Vaccine 25, 1743–1755.(14).
Vacuna atenuada	Simple/Doble deletada $\Delta mce2/\Delta mce2\Delta phoP$	Una dosis	Desafío en establos P2 ($\Delta mce2$) Protección mayor a BCG $\Delta mce2\Delta phoP$ no evaluada en bovinos	Blanco et al. (2013) Tuberculosis;93:363-72. (15). García et al.(2015) tuberculosis;95:186-9.(16).
Vacuna atenuada	BCG sobreexpresando Ag85B	Una dosis	Desafío en establos P2 Protección mayor a BCG	Rizzi et al PLoS One. 2012;7:e51396.(17).
Vacuna atenuada	BCG sobreexpresando Ag85B	Una dosis	Desafío en establos P2 Protección mayor a BCG	Horwitz et al. Vaccine 24 (2006) 1593–1600.(18).
Vacuna a ADN	ESAT-6:CFP10 DNA	Administrada junto a BCG	Desafío en establos P2 Protección mayor a BCG	Maue et al. (2007)Vaccine 25, 4735–4746.(19).
Vacuna a ADN	Constructos con Hsp 65, Hsp 70, Apa	Como refuerzo de BCG	Desafío en establos P2 Protección mayor a BCG	Skinner et al.(2005) Infect Immun. 73(7):4441-4. (20).
Vacuna a ADN	Constructos con MPB70 o MPB83	3 dosis (2 primeras ADN y la 3ª proteína)	Desafío en corrales contenidos Protección menor a BCG	Wedlock et al. (2003) Tuberculosis 83(6):339-49.(21).
Basadas en vectores virales	MVA85A o (Ad85A)	Como refuerzo de BCG	Desafío en establos P2 Protección mayor a BCG	Vordermeier et al. (2009) Infect Immun. 2009;77(8):3364-73.(22).

CANDIDATOS VACUNALES EXPERIMENTALES EN BOVINOS EN ARGENTINA Y BRASIL

La construcción de cepas mutantes de *M. bovis* ha permitido identificar varios genes involucrados en la patogenia de la bacteria. En nuestro grupo de investigación, siguiendo el enfoque de la genómica funcional, se realizaron varias mutantes de *M. bovis* mediante delección puntual de genes de interés. La evaluación de las cepas mutantes en distintos modelos animales como el ratón y cobayo, posibilitó analizar la virulencia de las mismas comparando con la cepa parental.

M. bovis BCG obtenida en 1921 tiene más de 100 mutaciones en comparación con *M. bovis*. La capacidad de generar un candidato vacunal que posea una o más deleciones seleccionadas según su impacto en la virulencia del patógeno y que preserve proteínas altamente inmunogénicas ausentes en *M. bovis* BCG, como ESAT-6 y CFP-10, resulta una estrategia prometedora.

En 1993 se describió un fragmento de ADN presente en *M. tuberculosis* responsable de la codificación de proteínas involucradas en el ingreso a la célula del hospedador. Estos genes se denominaron *mce* (por sus siglas en inglés *mammalian cell entry*) [31] y se encuentran codificados en cuatro operones. La virulencia de las cepas mutantes en los genes *mce* en los modelos de infección de ratón parecen diferir, pero en la mayoría de los estudios la pérdida de uno o más de los operones *mce* generalmente resulta en atenuación.

El grupo dirigido por la Dra. Fabiana Bigi obtuvo una cepa de *M. bovis* deletada en los genes *mce2A* y *mce2B* (denominada *M. bovis* $\Delta mce2$), la cual fue evaluada como vacuna en el ganado bovino en un ensayo en condiciones experimentales. El ensayo se llevó a cabo en boxes de bioseguridad realizando el desafío con una cepa patógena de *M. bovis*. Se emplearon grupos de cinco a seis terneros de tres meses y medio de edad. Uno de estos grupos fue vacunado con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2$, otro con la cepa *M. bovis* BCG y el último permaneció como el control sin vacunar. Durante cien días los animales fueron evaluados mediante el ensayo de liberación de IFN γ , citometría de flujo, cuantificación de citoquinas e IDR. La necropsia detallada de los animales reveló que el grupo vacunado con la cepa *M. bovis* $\Delta mce2$ presentó menor grado de patología en conjunto con una puntuación histopatológica significativamente más baja para las lesiones en los pulmones y los ganglios linfáticos pulmonares que para los otros grupos [32]. A diferencia de los ensayos en bovinos mencionados anteriormente, la presente prueba fue realizada con desafío experimental y en tiempos controlados. Una próxima evaluación en condiciones de campo y con un número mayor de animales permitirá evaluar en mayor profundidad este nuevo candidato.

En conjunto con el candidato vacunal denominado *M. bovis* $\Delta mce2$, se evaluó otro candidato desarrollado por el laboratorio del Dr. Dellagostin en Brasil. El mismo se trata de una cepa de *M. bovis* BCG Pasteur modificada genéticamente que sobreexpresa el antígeno Ag85B [33]. En la evaluación de este candidato a vacuna se emplearon los mismos controles y determinaciones usadas para la cepa *M. bovis* $\Delta mce2$. La vacunación con el segundo candidato permitió mejorar los niveles de

protección observados para *M. bovis* BCG [34]. En conclusión, al igual que se observó con el candidato vacunal experimental desarrollado en Argentina, esta primera prueba resultó promisorio y se requiere un estudio a campo más extensivo para evaluar su potencial.

REFERENCIAS

1. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. 2005. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol. 187(18): 6386–6395.
2. Buddle BM, Vordermeier HM, Chambers MA, de Klerk-Lorist LM. 2018. Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. Front. Vet. Sci. 5:259.
3. Nugent G, Yockney IJ, Whitford EJ, Cross ML, Aldwell FE, Buddle BM. 2016. Field Trial of an Aerially-Distributed Tuberculosis Vaccine in a Low-Density Wildlife Population of Brushtail Possums (*Trichosurus vulpecula*). PLoS One;11(11):e0167144.
4. Ying W, Sun J, Liu D, Hui X, Yu Y, Wang J, Wang X. 2014. Clinical characteristics and immunogenetics of BCGosis/BCGitis in Chinese children: A 6year follow-up study. PLoS One; 9(4). e94485.
5. Macleod LC., Ngo TC., Gonzalgo ML. 2014. Complications of Intravesical Bacillus Calmette-Guérin. Can Urol Assoc J.; 8(7-8): E540–E544.
6. Cohen, D. 2018. Oxford TB vaccine study calls into question selective use of animal data. 2018. McShane H., Hill A, Hatherill M, Tameris M, Shea J, Ginsberg A. 2018. Helen McShane and colleagues reply to Deborah Cohen. BMJ; 360:k236.
7. Whelan AO, Coad M, Upadhyay BL, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2011. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. Vaccine 29:5453–58.
8. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. 2016. Bovine Tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. Annu. Rev. Anim. Biosci. 4:87-109.
9. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:571–78.
10. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178:1274–82.
11. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. PNAS 100:7877–82.
12. van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:155–60.
13. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff TH. 2000. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. Infect. Immun. 68:3314–21.
14. Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6:1–5.
15. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:571–78.
16. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. 2016. Bovine Tuberculosis in cattle: vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. Annu. Rev. Anim. Biosci. 4:87-109.
17. Sidders B, Pirson C, Hogarth PJ, Hewinson RG, Stoker NG, Vordermeier HM, Ewer K. 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect. Immun. 76:3932–39.
18. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG. Vet Immunol Immunopathol. 2016. Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. Vet Immunol Immunopathol 15;181:10-14. Review

19. Millington KA, Fortune SM, Low J, Garces A, Hingley-Wilson SM, Wickremasinghe M, Kon OM, Lalvani A. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. PNAS 108:5730–35.
20. Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Breadon EL, McNair J, Hewinson GR, Vordermeier MH. 2010. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. J Clin Microbiol. 48:3176–81.
21. Jones GJ, Khatri BL, Garcia-Pelayo MC, Kaveh DA, Bachy VS, Hogarth PJ, Wooff E, Golby P, Vordermeier HM. 2013. Development of an unbiased antigen-mining approach to identify novel vaccine antigens and diagnostic reagents for bovine tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 20(11):1675-82.
22. Buddle BM, de Lisle GW, Pfeiffer A, Aldwell FE. 1995. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vaccine 13:1123–30.
23. Wedlock DN, Aldwell FE, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM. 2011. Protection against bovine tuberculosis induced by oral vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG is not enhanced by co-administration of mycobacterial protein vaccines. Vet. Immunol. Immunopathol. 144:220–27.
24. Hope JC, Thom ML, McAulay M, Mead E, Vordermeier HM, Clifford D, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. 2011. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. Clin. Vaccine Immunol. 18:373–79
25. Wedlock DN, Denis M, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM. 2007. Vaccination of cattle with Danish and Pasteur strains of *Mycobacterium bovis* BCG induce different levels of IFN γ post-vaccination, but induce similar levels of protection against bovine tuberculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 118:50–8
26. Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ. 2005. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. Clin. Exp. Immunol. 139:48–56
27. Buddle BM, Wedlock DN, Parlange NA, Corner LA, De Lisle GW, Skinner MA. 2003. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination. Infect. Immun. 71:6411–19
28. Lopez-Valencia G, Renteria-Evangelista T, Williams Jde J, Licea-Navarro A, Mora-Valle Ade L, Medina-Basulto G. 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. Res Vet Sci.;88(1):44-9.
29. Ameni G, Vordermeier M, Aseffa A, Young DB, Hewinson RG. 2010. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. Clin Vaccine Immunol.;17(10):1533-8.
30. Nugent G, Yockney IJ, Cross ML, Buddle BM. 2018. Low-dose BCG vaccination protects free-ranging cattle against naturally-acquired bovine tuberculosis. Vaccine. 19;36(48):7338-7344.
31. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. Science; 261:1454e7.
32. Blanco FC, Bianco MV, Garbaccio S, Meikle V, Gravisaco MJ, Montenegro V, Alfonseca E, Singh M, Barandiaran S, Canal A, Vagnoni L, Buddle BM, Bigi F, Cataldi A. 2013. *Mycobacterium bovis* Δ mce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*. Tuberculosis (Edinb); 93(3):363-72.
33. Borsuk S, Mendum TA, Fagundes MQ, Michelon M, Cunha CW, McFadden J, Dellagostin OA. 2007. Auxotrophic complementation as a selectable marker for stable expression of foreign antigens in *Mycobacterium bovis* BCG. Tuberculosis (Edinb) 87: 474–480.
34. Rizzi C, Bianco MV, Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Montenegro V, Vagnoni L, Buddle B, Garbaccio S, Delgado F, Leal KS, Cataldi AA, Dellagostin OA, Bigi F. 2012. Vaccination with a BCG strain overexpressing Ag85B protects cattle against *Mycobacterium bovis* challenge. PLoS One; 7(12):e51396.

COMISIÓN CIENTÍFICA DE MICOBACTERIAS AAVLD

Sergio Gabriel Garbaccio garbaccio.sergio@inta.gob.ar IPVet, CICVyA, INTA. N. Repetto y De Los Reseros s/n, (B1686IGC) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Fernando Alberto Paolicchi paolicchi.fernando@inta.gob.ar Laboratorio de Bacteriología, Grupo de Sanidad Animal INTA, EEA Balcarce, Ruta 226 Km 73,5, (7620), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Ana María Canal acanal@fcv.unl.edu.ar Cátedra de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R. P. Kreder 2805, (3080), Esperanza, Santa Fe, Argentina

Marcela E. Martinez Vivot mvivot@fvvet.uba.ar Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Av. Chorroarín 280, (C1427CWO), CABA, Buenos Aires, Argentina

Martín José Zumárraga zumarraga.martin@inta.gob.ar IABIMO, CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686), Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Delia Susana Oriani orianids@yahoo.com.ar Laboratorio de Micobacterias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Calle 5 esq. 116, (6360), General Pico, La Pampa, Argentina

Gabriel Magnano gmagnano@ayv.unrc.edu.ar Enfermedades transmisibles y tóxicas de los rumiantes, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nac. 36 - Km. 601, (X5804BYA), Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Angel Cataldi cataldi.angeladrian@inta.gob.ar Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Nora Morcillo nora_morcillo@yahoo.com.ar Laboratorio de Referencia del Programa de Control de Tuberculosis de la Provincia de Buenos Aires, Hospital Dr. Cetrangolo, Italia 1750, (B1602), Florida, Buenos Aires, Argentina

María Julia Traversa mjt@vet.unicen.edu.ar Área Medicina Preventiva. Laboratorio de Micobacterias. Dto. SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, CIVETAN, CIC, CONICET, Campus Universitario, Tandil, Buenos Aires, Argentina

Alejandro Abdala abdala.alejandro@inta.gob.ar Grupo de Sanidad Animal. E.E.A. INTA Rafaela, Ruta 34 Km 227, EEA, (S2300), Rafaela, Provincia de Santa Fe, Argentina

Alejandra Colombatti colombatti.alejandra@inta.gob.ar IABIMO, CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Gabriel Travería traveria@fcv.unlp.edu.ar CEDIVE, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Calle 49 y 115 s/n 1er piso Edificio ex Liceo, (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina

Amelia Bernardelli amelia.bernardelli@ceva.com Ceva Salud Animal, Camila O'Gorman 412, Piso 12, (1107), Puerto Madero, CABA, Buenos Aires, Argentina

Francisco Gentile franciscogentile@hotmail.com Centro Diagnóstico Veterinario S.A., Parque Industrial de Pilar, calle 9 N°523 (1629), Pilar, Buenos Aires

Carlos Javier Garro garro.carlos@inta.gob.ar Instituto de Patobiología, CICVyA, CNIA, INTA, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Claudia Tortone ctortone@yahoo.com.ar Laboratorio de Micobacterias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Calle 5 esq. 116, (6360), General Pico, La Pampa, Argentina

Bernardo Alonso balonso@senasa.gob.ar SENASA – Laboratorio Central, Martínez, Buenos Aires, Argentina

Soledad Barandiaran solebarandiaran@hotmail.com Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Av. Chorroarín 280, (C1427CWO), CABA, Buenos Aires, Argentina

María Emilia Eirin eirin.maria@inta.gob.ar (IABIMO), CICVyA, CNIA, INTA-CONICET, Dr. N. Repetto y Los Reseros s/n, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Fabiana Cipollini mfcipolini@vet.unne.edu.ar Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Sargento Cabral 2139, (3400), Corrientes, Corrientes, Argentina

Los tres números que componen la Serie Monográfica Micobacterias de Interés Veterinario terminaron de revisarse en diciembre de 2021.



3

