UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

Desarrollo y caracterización de un candidato vacunal recombinante contra tuberculosis bovina

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

ROXANA VALESKA ZÚNIGA SÁNCHEZ

CHILLÁN-CHILE

2023

Profesor Guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Dpto. de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

© Roxana Valeska Zúniga Sánchez. 2023

Se autoriza la reproducción con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas , Universidad de Concepción .

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Fidel Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dra. Janel Acosta Alba
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Álvaro Ruíz Garrido
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. LLeretny Rodriguez Alvarez
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento de:

Becas de Doctorado Nacional, Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo ANID.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....i

DERECHOS DE AUTOR……i

PÁGINA DE FIRMAS.....ii

AGRADECIMIENTOS.....iii

ÍNDICE DE TABLAS.....x

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....xi

RESUMEN.....xii

ABSTRACT.....xv

1 INTRODUCCIÓN.....1

1.1 Aspectos generales de la Tuberculosis bovina.....1

1.1.1 Antecedentes Históricos.....1

1.1.2 Distribución mundial y datos Epidemiológicos.....2

1.1.3 Costos Económicos Asociados a Tuberculosis bovina.....4

1.2 Agente Etiológico de la Tuberculosis bovina.....6

1.2.1 Clasificación Taxonómica.....6

1.2.2 Genoma de Mycobacterium bovis.....7

1.2.3 Características morfológicas y bioquímicas de M. bovis.....8

1.3 Transmisión de la Tuberculosis bovina.....10

1.4 Patogenia de la Tuberculosis bovina.....13

1.4.1 Signos clínicos de la Tuberculosis bovina.....14

1.5 Principales Factores de Virulencia de M. bovis.....16

1.6 Respuesta Inmune inducida por M. bovis.....19

1.6.1 Inmunidad Innata.....19

1.6.2 Inmunidad Adaptativa 22
1.6.2.1 Respuesta humoral 22
1.6.2.2 Respuesta celular 24
1.6.3 Antígenos de M. bovis inmunogénicos relacionados a la Inmunidad protectora 29
1.7 Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune de M. bovis 31
1.7.1 Inhibición de metabolitos reactivos del nitrógeno y óxido nítrico 31
1.7.2 Inhibición de la maduración del fagosoma y fusión fagosoma-lisosoma 32
1.7.3 Interferencia en la presentación antigénica mediante MHC clase II 33
1.7.4 Persistencia de M. bovis a través de la fase de latencia 35
1.8 Vacunas 36
1.8.1 Vacunas Convencionales 36
1.8.2 Vacunas de nueva generación 38
1.9 Adyuvantes inmunológicos 41
1.9.1 Adyuvantes inmunológicos moleculares. 42
1.10 Vacunas contra Tuberculosis bovina 45
1.10.1 Parámetros inmunológicos que debe inducir una vacuna protectora contra Tuberculosis bovina 47
1.11 Diagnóstico de Tuberculosis bovina 49
1.11.1 Diagnóstico de laboratorio 49
1.11.2 Diagnóstico de Campo 52
1.12 Control y Prevención de Tuberculosis bovina 54
2 HIPÓTESIS 57
3 OBJETIVO GENERAL 57

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 57

5 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....59

5.1 MATERIALES UTILIZADOS 59

5.1.1 ANIMALES 59

5.1.2 ANTIBIÓTICOS DE USO EN CULTIVOS BACTERIANOS Y CELULARES 59

5.1.3 CEPAS BACTERIANAS 59

5.1.4 KITS COMERCIALES 60

5.1.5 MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS..... 60

5.1.6 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS..... 61

5.1.7 PROTEÍNAS 61

5.1.7.1 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN 61

5.1.7.2 PROTEÍNAS COMERCIALES 61

5.1.8 ANTICUERPOS 61

5.1.9 SECUENCIAS PARTIDORES..... 62

5.1.10 SECUENCIAS PROTEICAS 62

5.1.11 SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE ADN ……63

5.1.12 SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES REDUCTORAS Y WESTERN BLOT 64

5.1.13 SOLUCIONES, MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS PARA CULTIVO DE CÉLULAS SUPERIORES. 65

5.1.14 SOLUCIONES PARA EL DESARROLLO DE ENSAYOS ELISA .. 65

5.1.15 SOLUCIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS ANTÍGENOS QUIMÉRICOS 66

5.1.16 VACUNAS COMERCIALES..... 66

5.1.17 VECTORES DE EXPRESIÓN..... 66

5.2 METODOLOGÍA GENERAL 67

5.2.1 TÉCNICAS PARA ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ADN. 67
5.2.1.1 Purificación de ADN plasmídico. 67
5.2.1.2 Purificación de ADN genómico. 67
5.2.1.3 Preparación Curva Estándar de BCG. 68
5.2.1.4 Preparación de bacterias E.coli quimiocompetentes y transformación por shock térmico. 70
5.2.1.5 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción. 70
5.2.2 TÉCNICAS PARA ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS. ……71
5.2.2.1 Precipitación de proteínas. 71
5.2.2.2 Electroforesis de proteínas en condiciones reductoras y denaturantes 71
5.2.2.3 Inmunoidentificación mediante Western blotting. 71
5.2.2.4 Tinción Inversa de Proteínas. 73
5.2.2.5 Electroelución de Proteínas. 73
5.2.2.6 Detección de citocinas/quimiocinas en MILLIPLEX® 74
5.2.3 TÉCNICAS PARA CULTIVO DE CÉLULAS. 74
5.2.3.1 Aislamiento de PBMC. 74
5.2.3.2 Congelación. 75
5.2.3.3 Descongelación. 75
5.2.3.4 Conteo de células. 75
5.2.4 PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS qTBA-16MRA Y qTBA-85ESAT 76
5.2.4.1 Diseño y clonamiento de los genes que codifican para los antígenos quiméricos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. 76
5.2.4.2 Análisis de restricción de los plásmidos sintetizados. 76
5.2.4.3 Expresión de los antígenos quiméricos. 77
5.2.4.4 Ruptura celular y extracción de los cuerpos de inclusión. 77
5.2.4.5 Lavado de los cuerpos de inclusión. 78

5.2.4.6 Cuantificación y determinación del nivel de pureza de las proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. 78
5.2.4.7 Purificación de las proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT mediante electroelución. 79
5.2.5 EXPERIMENTOS EN MODELOS ANIMALES. 79
5.2.5.1 Ensayo de inmunización en caprinos. 80
5.2.5.2 Ensayo de inmunización y desafío en terneros. 84
5.2.6 Análisis Estadístico 94
6 RESULTADOS 95
6.1 Secuencias génicas codificantes para las proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. 95
6.2 Proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT producidas como cuerpos de inclusión en E. coli. 98
6.3 Purificación de las quimeras qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT mediante electroelución. 100
6.4 Títulos de anticuerpos IgG específicos inducidos por la vacunación de modelos animales con las formulaciones basadas en las proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. 101
6.5 Poblaciones de linfocitos T de memoria y perfil de citoquinas proinflamatorias inducidas por las formulaciones vacunales administradas en bovinos. 105
6.6 Respuesta de anticuerpos contra antígenos presentes en el bPPD…112
6.7 Respuesta celular inducida por la vacunación en cabras y terneros contra la prueba de tuberculina. 115
6.8 Protección en terneros inoculados por vía intranodal con una cepa atenuada de M. bovis. 118

7 DISCUSIÓN 121

7.1 Diseño y Expresión de los antígenos quiméricos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. 121

7.2 Respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación con las proteínas quiméricas en caprinos y bovinos. 124

7.3 Respuesta celular inducida por la vacunación con las proteínas quiméricas en bovinos. 129

7.4 Respuesta cruzada entre las proteínas quiméricas y los antígenos del bPPD de la prueba de la tuberculina. 133

7.5 Respuesta protectora inducida por la vacunación de terneros con los antígenos quiméricos contra el desafío con BCG. 137

8 CONCLUSIONES.....141

9 REFERENCIAS.....142

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de proteínas de *M. bovis* obtenidas desde la base de datos del Centro Nacional de información biotecnológica o NCBI.....63
Tabla 2. Protocolo para la preparación de gel de poliacrilamida al 15 %. 72
Tabla 3. Obtención de la concentración de ADN genómico requerido para la elaboración de curva estándar.....69
Tabla 4. Títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación en caprinos y bovinos. 104
Tabla 5. Comparación de subpoblaciones celulares obtenidas en los diferentes grupos de terneros inmunizados y el grupo placebo.....108
Tabla 6. Comparación de citocinas proinflamatorias detectadas en los diferentes grupos de terneros inmunizados y el grupo placebo.....111

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Representación gráfica de la respuesta inmune inducida por M. bovis en bovinos 25
Figura 2. Esquema de inmunización en cabras. 81
Figura 3. Esquema de inmunización y desafío en terneros 86
Figura 4. Imágenes del procedimiento del modelo de desafío..... 88
Figura 5. Diseño, clonamiento y chequeo de restricción de la quimera qTBA-16MRA..... 96
Figura 6. Diseño, clonamiento y chequeo de restricción de la quimera qTBA-85ESAT 97
Figura 7. Evaluación del nivel de expresión, pureza y concentración de los antígenos qTBA-16MRA y qTBA-85ESAT..... 99
Figura 8. Purificación de los antígenos qTBA-16MRA y qTbA-85ESAT desde gel de poliacrilamida mediante electroelución 101
Figura 9. Cinética de los títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación en cabras (A y B) y en terneros (Cy D)..... 103
Figura 10. Estrategia de gating para la detección de poblaciones de linfocitos T de memoria CD8+CD44+ y CD4+CD44+ 107
Figura 11. Frecuencia de linfocitos CD4+CD44+ y CD8+CD44+..... 108
Figura 12. Detección de citocinas proinflamatorias identificadas en MILLIPLEX® 110
Figura 13. Detección de anticuerpos contra bPPD en el plasma de cabras y terneros..... 114
Figura 14. Respuesta contra el bPPD de la prueba de tuberculina aplicada en caprinos y bovinos previamente inmunizados. 117
Figura 15. Determinación del número de copias del gen MPB70 de M. bovis mediante qPCR..... 119

RESUMEN

La tuberculosis bovina (bTB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis* que afecta al ganado generando enormes pérdidas en la industria pecuaria en Chile y el mundo. La inmunización de los animales contra la enfermedad no está permitida debido a que vacunas vivas atenuadas han demostrado una baja protección e interfieren con el diagnóstico de la tuberculina. Debido a esto, el control de bTB se basa fundamentalmente en diagnosticar a los animales con la prueba de tuberculina y la posterior eliminación de los individuos contagiados. No obstante, estas medidas han demostrado ser insuficientes en controlar y erradicar la enfermedad por lo que se requiere de una vacuna efectiva que proteja al ganado y que no interfiera con el diagnóstico. En este trabajo se propuso desarrollar y caracterizar una vacuna de subunidades recombinante contra *M. bovis,* con capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en bovinos, y que no interfiera con la prueba de tuberculina. Para esto se diseñaron las moléculas quiméricas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* conformada cada una por dos antígenos de la bacteria AcR-Rv2660c y Ag85b-ESAT6, respectivamente, y se produjeron por vía recombinante de forma insoluble en *E.coli.* Con las quimeras insolubles se prepararon tres formulaciones vacunales para inmunizar caprinos y bovinos. Dos de las formulaciones incluyeron un adyuvante molecular para potenciar la respuesta inducida por los antígenos (DIVA, DIVA IFNα y DIVA TNFα). Además, en terneros se incluyó un grupo experimental al que se le administró la vacuna BCG. A partir de los ensayos de inmunización se caracterizó la respuesta inmune humoral y celular inducida por la vacunación de ambas especies animales, y se evaluó la interferencia de las distintas formulaciones con la prueba de tuberculina. Luego, los terneros se retaron por vía intranodal con una cepa atenuada de *M. Bovis* BCG Danish 1331 y se evaluó la capacidad protectora de las formulaciones vacunales. Los resultados obtenidos demostraron que todas las formulaciones DIVA indujeron respuesta de anticuerpos tanto en caprinos como en bovinos, sin embargo, la DIVA IFNα indujo

los mayores títulos de anticuerpos en terneros. Tanto en cabras como en terneros se observó que la quimera que indujo los mayores títulos de anticuerpos fue *qTbA-16MRA*. En los terneros esta respuesta fue significativamente superior. Por otra parte, se obtuvo que la estimulación conjunta de las células con los antígenos quiméricos indujo una respuesta de linfocitos T de memoria $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$. Al contrastar la respuesta inducida en los diferentes grupos contra el placebo, se evidenció que los terneros inmunizados con BCG y DIVA IFNα exhibieron porcentajes de $CD4^+CD44^+$ estadísticamente mayores. Todos los grupos inmunizados obtuvieron concentraciones significativas de IFNγ, donde los animales que recibieron la vacuna BCG y DIVA IFNα fueron quienes alcanzaron los valores más altos. Se encontraron diferencias estadísticas entre BCG y el resto de los grupos inmunizados, siendo muy superior la producción de TNFα en los animales vacunados con BCG ($p < 0.001$). Por otro lado, los grupos BCG y DIVA IFNα fueron los únicos que mostraron concentraciones de IL-17A significativas. También, se detectaron diferencias estadísticas entre los terneros vacunados con BCG y DIVA IFNα ($p < 0.05$). Los resultados de interferencia mostraron que en los grupos DIVA y DIVA IFNα todos los animales fueron negativos al diagnóstico y que del grupo DIVA TNFα uno de los cinco terneros fue reaccionante al bPPD de la tuberculina. Los resultados de protección mostraron que el número de copias del gen MPB70 obtenido tanto en el grupo de terneros vacunados con BCG como los que fueron inmunizados con DIVA IFNα mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p< 0.001$)en comparación con el grupo placebo. A partir de este trabajo se concluyó que la inmunización de los animales con los antígenos quiméricos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* genera altos títulos de anticuerpos IgG, inducidos principalmente por la quimera *qTbA-16MRA.* La vacunación con los antígenos permite inducir respuesta celular de memoria mediada por linfocitos T $CD4^+CD44^+$ y respuesta celular Th1. Por otra parte, la incorporación de IFNα en la formulación vacunal basada en los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* potencia la respuesta

celular producida por estos debido a que induce una respuesta Th17. Además, de forma preliminar, se demostró que la vacunación con los antígenos quiméricos no induciría una respuesta cruzada contra la prueba de la tuberculina. Por último, los antígenos quiméricos por si solos no inducen protección frente a un reto con la cepa atenuada de *M. bovis* BCG Danish 133, no obstante, la incorporación de IFNα en la formulación con las quimeras otorga protección en los terneros.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (bTB) is a disease caused by Mycobacterium bovis that affects cattle, generating enormous losses in the livestock industry in Chile and the world. Immunization of animals against the disease is not allowed because live attenuated vaccines have shown low protection and interfere with tuberculin diagnosis. Because of this, bTB control relies primarily on diagnosing animals with the tuberculin test and subsequent culling of infected individuals. However, these measures have proven to be insufficient to control and eradicate the disease, so an effective vaccine that protects cattle and does not interfere with diagnosis is required. In this work we proposed to develop and characterize a recombinant subunit vaccine against M. bovis, with the capacity to induce a protective immune response in cattle, and that does not interfere with the tuberculin test. For this purpose, the chimeric molecules qTbA-16MRA and qTbA-85ESAT, each one conformed by two antigens of the bacterium AcR-Rv2660c and Ag85b-ESAT6, respectively, were designed and produced by the recombinant route in an insoluble form in E.coli. Three vaccine formulations were prepared with the insoluble chimeras to immunize goats and cattle. Two of the formulations included a molecular adjuvant to enhance the antigen-induced response (DIVA, DIVA IFNα and DIVA TNFα). In addition, an experimental group was included in calves that were administered BCG vaccine. From the immunization assays, the humoral and cellular immune response induced by vaccination of both animal species was characterized, and the interference of the different formulations with the tuberculin test was evaluated. Then, calves were challenged intranodally with an attenuated strain of M. Bovis BCG Danish 1331 and the protective capacity of the vaccine formulations was evaluated. The results obtained showed that all DIVA formulations induced antibody response in both goats and cattle, however, DIVA IFNα induced the highest antibody titers in calves. In both goats and calves, it was observed that the chimera that induced the highest antibody titers was qTbA-16MRA. In calves this response was significantly higher. On the other hand, it was

obtained that the joint stimulation of the cells with the chimeric antigens induced a response of CD4+CD44+ and CD8+CD44+ memory T lymphocytes. When contrasting the response induced in the different groups against placebo, it was evident that calves immunized with BCG and DIVA IFNα exhibited statistically higher CD4+CD44+ percentages. All immunized groups obtained significant IFNγ concentrations, where animals receiving BCG and DIVA IFNα vaccine achieved the highest values. Statistical differences were found between BCG and the rest of the immunized groups, with TNFα production being much higher in animals vaccinated with BCG ($p < 0.001$). On the other hand, the BCG and DIVA IFNα groups were the only ones that showed significant IL-17A concentrations. Also, statistical differences were detected between calves vaccinated with BCG and DIVA IFNα ($p < 0.05$). Interference results showed that in the DIVA and DIVA IFNα groups all animals were negative at diagnosis and that of the DIVA TNFα group one of the five calves was reactive to tuberculin bPPD. The protection results showed that the MPB70 gene copy number obtained in both the BCG vaccinated calf group and those immunized with DIVA IFNα showed statistically significant differences ($p< 0.001$)compared to the placebo group. From this work it was concluded that immunization of animals with the chimeric qTbA-16MRA and qTbA-85ESAT antigens generates high IgG antibody titers, mainly induced by the qTbA-16MRA chimera. Vaccination with the antigens induces a memory cell response mediated by CD4+CD44+ T lymphocytes and a Th1 cell response. On the other hand, the incorporation of IFNα in the vaccine formulation based on qTbA-16MRA and qTbA-85ESAT antigens potentiates the cellular response produced by these antigens because it induces a Th17 response. In addition, preliminarily, it was shown that vaccination with the chimeric antigens would not induce a cross-response against the tuberculin test. Finally, the chimeric antigens alone do not induce protection against a challenge with the attenuated M. bovis BCG Danish 133 strain, however, the incorporation of IFNα in the formulation with the chimeras confers protection in calves.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la Tuberculosis bovina

1.1.1 Antecedentes Históricos

La tuberculosis bovina (bTB) corresponde a una enfermedad zoonótica de carácter crónico, la cual se encuentra en la lista de enfermedades de denuncia obligatoria de la Oficina internacional de epizootias u OIE. La bTB genera severos problemas en la salud animal y humana, siendo su principal agente causal el *Mycobacterium bovis (M. bovis*) (1). Esta patología fue descrita por primera vez en 1898 por Robert Koch, quien sugirió que tanto la tuberculosis humana (hTB) como la tuberculosis bovina eran causadas por el mismo agente etiológico. Sin embargo, años más tarde el científico Theobald Smith logró aislar a *M. bovis*, demostrando que las características morfológicas y de virulencia de esta bacteria diferían de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) causante de la hTB (2). Además, las investigaciones realizadas por Smith comprobaron que *M. bovis* no solo podía infectar a especies como los cerdos, caprinos u ovinos, entre otras, sino que también a la especie humana (3). Es así como se determinó que los humanos podían contagiarse con esta bacteria principalmente a través del consumo de productos lácteos no pasteurizados provenientes de animales enfermos con bTB, representando cerca del 20-40% de los casos de tuberculosis humana causada por *M. bovis*. Debido a esto, las primeras medidas que se implementaron para el control de esta enfermedad fueron la pasteurización de los derivados lácteos y el diagnostico *in vivo* de la enfermedad mediante la prueba de tuberculina, que consiste en un preparado proteico (PPD) de *M. bovis* el cual genera una reacción inflamatoria en el sitio de inoculación (4,5). Años más tarde, se desarrolló una vacuna viva atenuada de *M. bovis* conocida como Bacillo Calmette- Guerin (BCG), la cual fue evaluada primeramente en animales y posteriormente en humanos, utilizándose hasta el día de hoy dentro del plan de vacunación obligatorio en muchos países del mundo como medida preventiva

frente al contagio con tuberculosis humana. No obstante, en bovinos no se utiliza BCG principalmente debido a que interfiere con el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad realizado a través de la prueba de tuberculina (6).

1.1.2 Distribución mundial y datos Epidemiológicos

La tuberculosis bovina ha sido reportada en 82 países del mundo, algunos de ellos pertenecientes a la Unión Europea (Inglaterra, Irlanda, Italia, Francia, España), otros al continente africano (Tanzania, Etiopia, Kenia), continente asiático (India), países del Medio Oriente, Norteamérica (México, Estados Unidos y Canadá) y de Latinoamérica (Brasil, Argentina, Panamá, Chile) entre otros (7). A nivel mundial se estima que la prevalencia de bTB es de aproximadamente el 9%, donde países no desarrollados (principalmente africanos y asiáticos) presentan la enfermedad de forma endémica, liderando con los mayores índices de prevalencia en sus rebaños bovinos con porcentajes cercanos al 3% (8). Países desarrollados tales como Australia, Dinamarca y Suiza entre muchos otros, han logrado eliminar la enfermedad de su territorio gracias a la implementación de programas de control y erradicación. Sin embargo, si bien en otros países desarrollados como EE.UU, Canadá e Inglaterra han logrado erradicar la bTB en gran parte de su territorio, la enfermedad continúa presente de forma endémica en ciertas regiones. La mayor dificultad que deben enfrentar en estos países es el control de *M. bovis* en animales silvestres, en los cuales la bacteria es altamente prevalente y remarca un continuo riesgo de contagio para los animales domésticos. Dentro de las especies silvestres en las que se hospeda la bacteria se encuentran el bisonte en Inglaterra, alce y bisonte americano en Canadá y el venado de cola blanca en EE.UU, entre otras (9). En EE.UU se estima que la prevalencia aparente de bTB en el ganado ha disminuido considerablemente desde un 5% durante los años 90´ hasta 0.006% en la actualidad (10,11). En países de la Unión Europea declarados oficialmente libres

de bTB en el año 2017 se reportó que la prevalencia anual de tuberculosis bovina en el ganado fue de 0.011% (11).

En Chile, la bTB se encuentra a lo largo de todo el territorio nacional donde existen zonas de presentación esporádica de la enfermedad, dentro de las que se encuentran las regiones del norte de Chile desde Tarapacá hasta Coquimbo y algunas provincias de la zona sur como Chiloé y Palena (Región de los Lagos) y las regiones de Aysén y Magallanes. Igualmente existen zonas donde la bTB tiene una presentación endémica, que abarcan desde la región de Valparaíso hasta la del Biobío, y desde la Araucanía a Los Lagos. En Chile se estima que la incidencia nacional de bTB es del 0.46% y que desde la región del Biobío hacia el norte del país existe un mayor porcentaje de predios infectados, cercano al 20% del total de predios testeados en esta zona geográfica. No obstante, desde el Biobío hacia el sur, alrededor del 5% del total de predios testeados en estas regiones son positivos a la enfermedad según un estudio realizado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (12).

A nivel mundial se han reportado diversos casos de tuberculosis humana generada por *M. bovis*, representando cerca del 3% de los casos de hTB según la Organización mundial de la salud (OMS). La hTB causada por *M. bovis* está subdiagnosticada debido a que la signología clínica generada en pacientes contagiados con esta bacteria y con *M. tuberculosis* (principal agente causal de tuberculosis humana) es indistinguible y en muchos casos no se cuenta con las técnicas de laboratorio necesarias para realizar la diferenciación entre ambos patógenos. Estudios realizados en la Unión Europea han determinado que la tuberculosis humana causada por *M. bovis* representa alrededor del 0.4%. Sin embargo, en países no desarrollados como Tanzania se ha estimado que la incidencia de tuberculosis zoonótica generada por *M.bovis* responde a cerca del 16%, demostrando que continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial (3).

1.1.3 Costos Económicos Asociados a Tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades del ganado bovino que genera mayores costos económicos a la industria pecuaria lechera y de carne de Chile y el mundo. Estos costos son variados dependiendo del país en estudio, lo cual va de acuerdo con su situación epidemiológica, sistemas productivos, estrategias empleadas en el control de enfermedad, entre otros. Sin embargo, se ha logrado estimar que globalmente esta patología generaría costos de alrededor de los 3000 millones USD/año (8,13)**.** En general los costos que genera la presencia de bTB en un determinado país se traduce en pérdidas económicas directas e indirectas, es decir, en aquellas relacionadas directamente al impacto que genera la bTB sobre los sistemas productivos y aquellas asociadas a las diversas estrategias implementadas en el control y erradicación de la enfermedad (14). Las pérdidas directas se estiman de acuerdo con diversos parámetros productivos y reproductivos de aquellos animales que pertenecen a predios positivos a la enfermedad. Es por ello por lo que diversos estudios han demostrado que la presencia de bTB repercute fuertemente en la producción lechera durante los días de lactancia de las hembras, las cuales producen entre 100 y 300 litros menos de leche que aquellos animales no infectados (15,16). Se ha determinado también que hembras con bTB presentan mayor predisposición a desarrollar cuadros de mastitis, representando un 1% de la población. Además, se ha comprobado que la enfermedad genera una reducción en el tiempo de vida productiva de animales enfermos, afectando de igual manera la productividad económica del predio (14).

Las pérdidas indirectas corresponden a otro costo económico importante asociado a la presencia de bTB. Estas derivan de los programas de control y erradicación que se han puesto en práctica en la mayoría de los países que han reportado tener la enfermedad. El objetivo de estos programas es reducir la prevalencia e incidencia de bTB y la erradicación de esta, es así como las

entidades gubernamentales de cada país han debido invertir un gran capital para la ejecución de múltiples medidas sanitarias (10). Dentro de estas medidas se encuentran la utilización de pruebas diagnósticas como la prueba de tuberculina para realizar la detección de animales positivos en los mismos predios (con un precio estimado de 7 USD/animal testeado), análisis de laboratorio como pruebas confirmatorias del diagnóstico de campo tales como ensayos de liberación de Interferón gamma (IGRA) (aproximadamente 40 USD/muestra), ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) e Histopatología entre otros (17). Por otro lado, los programas contemplan la completa o parcial eliminación de los animales infectados a través de su beneficio en mataderos certificados. Esta eliminación parcial o total de los animales enfermos no solo genera pérdidas económicas para los productores sino también para el estado, el cual entrega incentivos monetarios a los productores por cada animal. El precio que ofrecen los gobiernos como pago por animal eliminado se ajusta al precio de mercado de acuerdo con el grado de lesiones que presenten los respectivos animales beneficiados. Por ejemplo, en Francia el estado indemniza a los agricultores con aproximadamente 2200 € por animal beneficiado (2400 USD) y en EE.UU alrededor de 600 USD (10,17).

Si bien las principales pérdidas económicas se generan en la industria lechera, también la industria de la carne se ve afectada a causa de la enfermedad. Estas mermas se deben principalmente a la disminución en la producción de carne estimada en un 15%, y a los decomisos de canales y vísceras para consumo humano en plantas faenadoras. Otro costo económico no menor en torno a la bTB son las pérdidas económicas por la restricción al comercio internacional de subproductos cárnicos y lácteos hacia países libres con normas sanitarias exigentes y que prohíben el ingreso de esos derivados (18,19) .

En Chile las pérdidas económicas estimadas en torno a la bTB se basan en los mismos parámetros analizados a nivel mundial. Las principales mermas en la

industria lechera son aquellas relacionadas a las tasas productivas y reproductivas tales como la disminución en la producción de leche (en torno al 10%) y la disminución en las tasas de fertilidad respectivamente, y en la industria de la carne derivan de los decomisos en las plantas faenadoras. En nuestro país el comercio internacional de subproductos lácteos y carne también se encuentra limitado debido al no tener el estatus de país libre de tuberculosis bovina, lo cual repercute fuertemente en la economía nacional. Por último, en Chile desde el 2011 se puso en marcha un programa de control y erradicación de bTB liderado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la cual es la entidad gubernamental reguladora y ejecutora de este programa. Esta institución es quien asume los costos de la implementación del programa contra bTB, destacando principalmente aquellos asociados al pago de indemnizaciones a los agricultores por animal sacrificado (14,18).

1.2 Agente Etiológico de la Tuberculosis bovina

1.2.1 Clasificación Taxonómica

La bTB es causada por la bacteria *Mycobacterium bovis* perteneciente a la orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Dentro del género *Mycobacterium* se han identificado más de 120 especies distintas de bacterias, muchas de las cuales han sido clasificadas dentro del grupo de micobacterias del complejo tuberculoso (MTC). Las micobacterias pertenecientes al MTC comparten secuencias 16S rARN genéticamente idénticas y un 99.9% de identidad nucleotídica en sus genomas (20,21). La clasificación de las bacterias pertenecientes al MTC tiene relación con su capacidad de generar un cuadro de tuberculosis caracterizado por lesiones granulomatosas principalmente asociadas al sistema respiratorio en su hospedador. *M. bovis* es uno de los miembros más característicos del MTC junto a *M. tuberculosis* (principal agente causal de la tuberculosis humana), *M. canettii* (cepa más antigua del complejo tuberculoso), *M. africanum* (responsable de la tuberculosis humana en África), *M.*

pinnipedi (afecta a especies como las focas), *M. microti* (afecta principalmente a roedores), *M. caprae* (cepa responsable de la tuberculosis en cabras y otros mamíferos), *M. mungi* (aislada desde las mangostas), *M. suricattae* (afecta las especies suricatas) *y M. orygis* (aisaldo desde antílopes) (19,22).

1.2.2 Genoma de *Mycobacterium bovis*

De las bacterias pertenecientes al complejo tuberculoso, *M. bovis* y *M. tuberculosis* son las especies que presentan mayor homología genómica entre sí, superior al 99.95%, en relación con sus genes compartidos (23). Si bien el genoma de *M. bovis* no posee genes únicos en comparación con *M. tuberculosis,* características como la virulencia, fisiología y tropismo por el hospedador son el resultado de una expresión génica diferencial, donde solo el 6% de los transcriptomas son diferencialmente expresados entre ambas bacterias. Dentro de estos genes destacan aquellos asociados a componentes de la pared celular, proteínas hipotéticas y metabolismo de la bacteria (22,24). Durante mucho tiempo se pensó que *M. tuberculosis* había evolucionado a partir de *M. bovis* como un mecanismo de adaptación de la bacteria para infectar al ser humano, sin embargo, gracias a diferentes estudios del genoma de ambas bacterias se ha podido descubrir que el genoma de *M. bovis* es más pequeño y ha sufrido la eliminación de diversos genes durante su proceso evolutivo, comprobando que *M. tuberculosis* y *M. bovis* provienen de un ancestro en común (24,25). *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin, actualmente utilizada en el control de la tuberculosis humana surgió a partir de la atenuación de la cepa original de *M. bovis* mediante pasos seriados en cultivo de papa con bilis de buey y glicerol durante varios años. Esta atenuación está basada en la eliminación de tres regiones de diferencia (RD) en *M. bovis* Calmette-Guérin (RD1, RD2 y RD3), además de la presencia de mutaciones en el gen *phoT* y de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) que también contribuyeron a la pérdida de virulencia de la cepa (25).

En un estudio donde se analizó la secuencia genómica de la cepa de *M. bovis* AF2122/97, se determinó que el tamaño del genoma es de 4,345,492 bp, el cual está organizado en un cromosoma circular con un contenido promedio de bases de guanina y citosina (G + C) del 65.63% (25). El genoma de *M. bovis* contiene un total de 3.952 genes que codifican para distintas proteínas, un profago y 42 secuencias de inserción (IS). Entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* se identificaron aproximadamente 2500 SNPs, los cuales son responsables de distintas características de *M. bovis*, como por ejemplo de su resistencia a la pirazinamida debido a una mutación en su gen *pncA*. Además, comparaciones de regiones codificantes (CDs) entre el genoma de *M. bovis* y de *M. tuberculosis* demostraron la estrecha relación filogenética que existe entre ambas bacterias.

1.2.3 Características morfológicas y bioquímicas de *M. bovis*

Mycobacterium bovis es una bacteria intracelular facultativa con capacidad de crecer en medios de cultivo *in vitro.* Su forma es bacilar con un tamaño que varía entre 1-4 µm de largo, es inmóvil y no forma esporas (26). *M. bovis* posee una pared celular compleja propia del género *Mycobacterium*, la cual protege a la bacteria manteniendo su estructura interna y también confiriéndole propiedades específicas para la resistencia frente a antibióticos e impermeabilidad a diferentes agentes químicos. Esta pared posee una capa externa compuesta de ácidos micólicos, glicolípidos (Ej: lipoarabinomanano (Man-LAM) y lipomanano (LM)) y manoglicoproteína, y de una membrana interna de peptidoglicano, la cual se encuentra unida covalentemente a una capa de arabinogalactano y manosidos fosfolidil-mioinositol (PIM) (27). El principal componente de la pared celular corresponde a ácidos micólicos, los que cumplen la función de proteger a la bacteria de la degradación mediada por lisozimas. Los ácidos micólicos de la pared representan alrededor del 50% del peso de la bacteria. El Man-LAM, LM y PIM presentan un dominio asilo-fosfatidil-mio-inositol (MPI) conservado, cuya función es anclar estas estructuras de la pared a la membrana plasmática de la

bacteria. El LAM corresponde al glicolípido más abundante de la pared y cumple la función de ser un relevante factor de virulencia de la bacteria. Por otro lado, el LM puede o no tener una cobertura de fosfo-mio-inositol, lo cual influye en sus características inmunoestimulantes. Por su parte, los residuos de manosa presentes en el PIM de la pared bacteriana son reconocidos por receptores de las células presentadoras de antígeno (APC) mediando el proceso de fagocitosis de la micobacteria. Las manoglicoproteínas de la superficie celular pueden también ser secretadas durante la fase de crecimiento de la bacteria, siendo un importante factor de virulencia (27–29).

M. bovis tiene la característica de ser una bacteria ácido alcohol-resistente, permitiendo que la bacteria puede ser teñida utilizando fluorocromos ácidos (auramina-rodamina) o tinción de Zhiel-Nielsen. Ambas tinciones reaccionan con el ácido micólico de la superficie bacteriana permitiendo su posterior visualización al microscopio (29,30) .

En condiciones experimentales, se ha demostrado que la bacteria puede comportarse como un microrganismo aerobio estricto (no crece en ausencia de oxígeno) y también microaerófilo, es decir, puede crecer y sobrevivir en medios con bajo porcentaje de oxígeno (5-10%). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37ºC, se multiplica cada 20 horas, y su crecimiento es lento, por lo que, se cultiva durante al menos 3-4 semanas (31). Las colonias de *M. bovis* cultivadas en medios sólidos se caracterizan por ser disgónicas, vale decir, brillantes no cromogénicas, de superficie lisa y bordes definidos. Esta bacteria posee un mejor crecimiento en medios enriquecidos tales como medio de “Stonebrink” y “Löwenstein – Jensen”, los cuales están elaborados en base a huevo y enriquecidos con piruvato, medio “Middlebrook 7H10” y “7H11” hechos en base a agar y enriquecidos con suero o sangre (26).

Algunas características bioquímicas propias de *M. bovis* permiten diferenciarla de otras micobacterias pertenecientes al complejo tuberculoso. Dentro de ellas

está su propiedad niacina negativa basada en la baja producción de esta molécula en el medio de cultivo, en contraste con *M. tuberculosis* que lo produce en exceso pudiendo ser detectado en el medio. Asimismo, *M. bovis* es catalasa negativa debido a que produce catalasas termolábiles capaces de reducir el peróxido, sin embargo, pierden actividad a temperaturas de 68ºC. Otra característica importante es que este microrganismo es considerado nitrato negativo, debido a que no produce la enzima nitrato reductasa capaz de reducir el nitrato a nitrógeno o nitritos (32).

En relación con la resistencia de *M. bovis* a diferentes agentes antimicrobianos, se ha descrito que su crecimiento es inhibido con hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), no obstante, es resistente natural a la pirazamida (33).

1.3 Transmisión de la Tuberculosis bovina

El *Mycobacterium bovis* corresponde al miembro del MTC que posee el más amplio rango de hospedadores. Esta característica es un factor determinante en la diseminación de la enfermedad y, por lo tanto, también es en gran medida responsable de dificultar el control de bTB. Es así como a pesar de que la especie bovina es el hospedador original y principal de la bacteria dónde la patología puede desarrollarse de forma progresiva y posteriormente diseminarse, también se han identificado a la cabra, búfalo, y al ser humano como hospedadores aptos para adquirir la bacteria y en generar el cuadro clínico característico de la bTB. Además, existen otros animales susceptibles al microrganismo, los cuales se comportan como reservorios naturales de *M. bovis* y representan una constante amenaza de infección. Dentro de ellos encontramos especies domésticas tales como cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros, y animales silvestres como cerdos salvajes, ciervos, bisontes, alces y venados, entre otros (34).

La transmisión de la bTB en animales puede ser de forma directa o indirecta. La directa corresponde a la forma de transmisión más efectiva y se refiere al contagio con *M. bovis* a través del contacto directo entre animales enfermos y

sanos. Por el contrario, la indirecta tiene relación al contagio con *M. bovis* derivado de la exposición al microorganismo viable en un ambiente o fómite contaminado. La transmisión indirecta de bTB es muy habitual, representando un alto riesgo de diseminación del agente entre el ganado y los animales susceptibles en general (35). Se ha descrito en distintos estudios que la transmisión directa de la enfermedad se ve favorecida en rebaños de producción intensiva, dónde existe un mayor grado de confinamiento de los animales, en otras palabras, existe una mayor densidad animal (Nº de animales/metro^2). Por ende, implica un mayor contacto entre animales (roce de naríz-naríz, contacto con secreciones, entre otros), permitiendo el contagio directo con el patógeno. Esto último se basa principalmente en que se ha determinado que la distancia necesaria entre individuos para que se transmita la enfermedad es de aproximadamente 1 a 2 metros (36). En condiciones naturales, la vía respiratoria es la principal ruta de contagio en bovinos y en las demás especies susceptibles. Esta forma de contagio se genera por la inhalación de partículas conocidas como aerosoles, las que se encuentran suspendidas en el ambiente y pueden contener desde 1 a cientos de bacilos. De esta manera, el microrganismo puede sobrevivir durante un largo periodo de tiempo bajo condiciones cálidas y húmedas (36). La transmisión oral también es una ruta de infección común en animales y ocurre a través de la ingesta de aerosoles, agua o alimentos contaminados (37).

Se ha descrito que la ruta de ingreso de la bacteria determina la gravedad, el lugar y el grado de las lesiones características de la enfermedad. Debido a esto último, es que la vía aerógena ha sido asociada a las lesiones más severas de la patología, comprometiendo principalmente al pulmón y linfonodos adyacentes (9). Animales con estas infecciones avanzadas tienden a ser una gran amenaza de contagio, pues son capaces de eliminar mayor carga bacteriana al ambiente. En contraste, animales infectados con *M. bovis* a través del consumo de forraje o pasto contaminado (vía de transmisión oral o digestiva) no siempre desarrollan

lesiones graves, sin embargo, también revisten riesgo de eliminar la bacteria hacia el medio ambiente. Debido a que la mayoría de los animales contagiados con bTB no exhiben signos clínicos evidentes de la enfermedad, sino que transitan con presentación subclínica, estos individuos son una de las principales fuentes de infección ya que diseminan de forma silenciosa la enfermedad entre el ganado(38). La excreción de la bacteria hacia el ambiente puede ocurrir desde el momento en que comienzan a aparecer las lesiones en los animales infectados. Las vías de eliminación de *M. bovis* pueden ser cualquier orificio natural del organismo, ya sea boca, nariz, pezón, ano, vagina o pene. De acuerdo con esto mismo, *M. bovis* puede ser aislada en todos los fluidos y secreciones asociadas a aberturas naturales, tales como esputo, secreción nasal, leche, heces, orina y semen. Cada uno de estos corresponden a importantes fuentes de infección para otros animales (11,39). Existen otras vías de contagio en animales, tales como la transmisión congénita (durante la gestación), cutánea (entrada a través de heridas) y genital, no obstante, estas formas son menos frecuentes que la respiratoria o digestiva (40). Al mismo tiempo, se han descrito factores como el tipo de sistema productivo empleado, el movimiento de animales de un predio a otro, hacinamiento de animales, entre otros, los cuales estarían asociados en permitir el ingreso y la mantención bTB en el ganado (41).

El contagio de *M. bovis* hacia el ser humano también puede ocurrir de forma directa o indirecta, existiendo un mayor riesgo de infección en zonas donde la enfermedad es endémica. La transmisión directa de bTB acontece principalmente en personas que viven en condiciones que favorecen el contacto directo con animales infectados, es así como veterinarios, trabajadores de plantas faenadoras y agricultores están más expuestos a contraer la patología. Las vías de contagio primarias en estos casos son la respiratoria y cutánea(42). Por el contrario, la forma indirecta de contagio está dada por el consumo de leche cruda no pasteurizada o de subproductos animales no tratados. Para este caso, la vía

de ingreso de la bacteria es principalmente digestiva. Además, en zonas donde existe una alta prevalencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son comunes las infecciones concomitantes con *M. bovis*. Por último, se ha demostrado que el ser humano también posee la capacidad de infectar en sentido contrario a animales susceptibles, conformando también una fuente de infección para otras especies (41,43)

1.4 Patogenia de la Tuberculosis bovina

Los animales contagiados con *M. bovis* comienzan a desarrollar una serie de eventos inmunológicos y patológicos desde el momento en que la bacteria ingresa al organismo. La vía de ingreso más frecuente de *M. bovis* son las vías respiratorias superiores, desde dónde la bacteria migra hasta los alveolos pulmonares(44). Es así como en este lugar patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs), tales como moléculas de superficie de la pared bacteriana, son reconocidos por receptores de las células de sistema inmune innato (principalmente los macrófagos), activando vías de señalización inflamatorias. Los macrófagos fagocitan la bacteria y liberan quimioquinas que atraen neutrófilos y otras células inmunes hasta el sitio de infección, generando un edema con acumulación de fibrina (exudado inflamatorio). En algunos animales, el sistema inmune mediado principalmente por la acción de linfocitos T CD4+ y macrófagos activados es capaz de contener la infección inicial(45). De esta manera, la bacteria puede ser eliminada del organismo o puede inhibirse su multiplicación generándose el estado de latencia de la enfermedad en la mayoría de los animales. La fase de latencia de la enfermedad tiene una gran relevancia debido a que la bacteria disminuye su metabolismo al máximo y entra en un estado no replicativo para lograr sobrevivir(46). Sin embargo, cuando la bacteria continua viable la enfermedad progresa dando lugar a la formación de tubérculos en el sitio de infección. Estos nódulos corresponden a lesiones granulomatosas circunscritas y amarillentas que se forman a partir de la acumulación de células

fagocíticas en el foco de infección, tales como neutrófilos, macrófagos y células gigantes de Langhans en el centro del tubérculo, y rodeadas de linfocitos y monocitos, además de tejido conectivo(47). A medida que la enfermedad avanza, los granulomas comienzan a rodearse de tejido fibroso y centro necrosado producto de la excesiva acción de citoquinas (ej: factor de necrosis tumoral TNF-alfa), muerte celular y de factores tóxicos liberados a partir de la lisis de la bacteria. Además, en el centro del granuloma se encuentra material caseoso y calcificado producto del acúmulo de calcio. El tamaño de estos granulomas es variable (desde mm hasta cm de diámetro) y depende del estado de avance de la infección, es por ello que a medida que la lesión crece la enfermedad se vuelve crónica.

Además de la formación de los granulomas, el patógeno puede ser transportado por las células fagocíticas a través del sistema linfático hasta el linfonodo regional, generando una segunda infección. Es así como la primoinfección en los pulmones, sumada a la nueva infección en el linfonodo, conforman el ´´complejo primario´´ de la enfermedad. Cuando el sistema inmune adquirido no es capaz de mantener la infección dentro del complejo primario, la bacteria pasa nuevamente al sistema linfático y al sistema sanguíneo (bacteriemia) desde donde se difunde hacia otros órganos y tejidos provocando la generalización de la enfermedad(48).

1.4.1 Signos clínicos de la Tuberculosis bovina

Debido a que la tuberculosis bovina corresponde a una enfermedad de curso crónico, es decir tiene una progresión lenta, la mayoría de los animales infectados con *M. bovis* no desarrollan signos clínicos evidentes en el corto plazo, sino que después de meses o años de haber entrado en contacto con la bacteria(49). En virtud de esto, se considera que la forma de presentación más común de la bTB es la subclínica, ya que es una enfermedad que tiende a pasar desapercibida durante sus fases tempranas. Sin embargo, cuando la enfermedad progresa los

animales infectados manifiestan signos clínicos como emaciación, disnea, neumonía y lesiones en órganos relacionados a la vía de entrada de la bacteria. Es así como los granulomas pueden encontrarse en los pulmones y linfonodos asociados al sistema respiratorio (retrofaríngeos, bronquiales y mediastinales) cuando la ruta de contagio ocurrió a través de las vías respiratorias superiores. Por el contrario, cuando los tubérculos se localizan a nivel del estómago, hígado, y linfonodos mesentéricos, la vía de contagio fue oral o digestiva(45,50).

Por otro lado, la aparición de los signos clínicos en animales infectados tiene directa relación con el nivel de gravedad de la enfermedad (grado de generalización dentro del organismo), de modo que los casos más severos han sido percibidos en estadios tardíos(45). Pese a esto, existen algunos individuos que durante fases tempranas de la infección presentan sintomatología inespecífica como fiebre intermitente, tos, diarrea, anorexia, debilidad, e inflamación de los linfonodos. Si bien la presentación aguda de la enfermedad es muy poco frecuente, se han observado casos en los que la infección evoluciona muy rápido causando incluso la muerte del animal(51).

Aquellos animales que resisten la infección inicial prosiguen hacia la fase crónica de la enfermedad, la cual puede perdurar durante años. En esta etapa los animales infectados comienzan a manifestar una serie de signos clínicos que se desarrollan de forma paulatina, pero que con el transcurso del cuadro infeccioso tienden a ser más severos. Algunos de estos signos son la emaciación de los animales afectados con condiciones corporales menor o igual a 2 (de una escala de 1 a 5), depresión general, neumonía y disnea, sumado al conjunto de lesiones tuberculosas en pulmones y otros órganos, las cuales no son detectadas a simple vista. La etapa final de la bTB culmina generalmente con la muerte del animal(52). En el examen *post mortem* de los animales contagiados es frecuente encontrar lesiones granulomatosas caseosas o clasificadas, o una combinación de ambas

en linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos y traqueobronquiales. Estas lesiones también afectan a órganos como el pulmón (la zona caudo-dorsal o ápex es la más afectada), estómago, hígado, bazo, intestino, riñones, glándula mamaria, entre otros. La presentación extra-pulmonar de los granulomas se debe a la diseminación de la bacteria en todo el organismo, siendo comunes en los casos más severos y avanzados de la infección(53).

1.5 Principales Factores de Virulencia de *M. bovis*

Los factores de virulencia son moléculas expresadas por la bacteria que median su internalización y permiten su sobrevivencia al interior de la célula hospedadora. La ausencia de alguno de ellos atenúa al microrganismo reduciendo su capacidad de generar la enfermedad(54). Dentro de los principales factores de virulencia de *M. bovis* se encuentran:

ESAT 6 (Rv3875): Es una proteína secretada en fases iniciales de la infección con *M. bovis* y es descrita como el principal factor de virulencia de la bacteria(55). La proteína se secreta a través de un sistema de secreción especial denominado ESX, el cual permite exportar proteínas pequeñas homólogas a ESAT-6 sin péptido señal hacia el espacio extracelular(56). ESAT-6 tiene un peso molecular de 6 kDa y está constituida de 95 residuos de aminoácidos, los que son conservados en un 100% con los de *M. tuberculosis*(57). ESAT-6 es codificada en conjunto con la chaperona CFP-10 por los genes *esxA* y *esxB* respectivamente, que se encuentran en la región RD1 del genoma de la bacteria, la cual está ausente en la cepa atenuada *M. bovis* BCG(58). Como principal factor de virulencia, ESAT-6 cumple diversas funciones dentro de las que destacan ***i)*** permeabilización del fagosoma, permitiendo que la bacteria salga al citoplasma y eluda la vía de presentación mediada por el MHC II al linfocito T $CD4^+$, ***ii)*** la inducción de la sobreexpresión de la enzima caspasa 3 y la acumulación de radicales libres generando la apoptosis de la célula hospedadora por estrés oxidativo, ***iii)*** la inhibición de la expresión del transactivador del MHC II,

interfiriendo en la correcta presentación de los antígenos de *M. bovis*, ***iv)*** la inhibición de la expresión del MHC I en la superficie celular a través del secuestramiento de β2 microglobina(59).

Antígeno Ag85 (Rv1886c): Corresponde a un complejo formado por tres proteínas homólogas Ag85a, Ag85b y Ag85c, secretado al medio extracelular en fases tempranas de la infección con *M. bovis* a través de su sistema conservado de secreción o SEC(56,60,61). Las proteínas son codificadas por los genes *fbpA*, *fbpB*, and *fbpC* y los pesos moleculares de cada una de ellas son 31, 30, 32 kDa respectivamente (Wiker y col., 1992). Ag85 es el complejo proteico secretado más abundante de *M. bovis*, representando aproximadamente el 60% del total de las proteínas exportadas hacia el medio extracelular, sin embargo, se encuentra en una baja proporción en la pared celular(61). Este complejo es un importante factor de virulencia de *M. bovis* que posee actividad micoliltransferasa, mediando la síntesis de los glicolípidos trehalosa 6,6′-dimicolato (TDM o factor cordón) y trehalosa 6-monomicolato (TMM), que posteriormente se unirán al ácido micólico y arabinogalactano de la superficie celular, dando lugar a la estructura hidrofóbica característica de la pared bacteriana. Por otra parte, cada proteína del complejo tiene un motivo de unión a fibronectina, favoreciendo la adhesión y la entrada de la bacteria al macrófago para posteriormente alojarse al interior del fagosoma. También se cree que este antígeno en conjunto con otras proteínas de secreción evita la maduración del fagosoma, impidiendo la formación del fagolisosoma(62).

Acr1 o *alpha-crystallin protein* (*Rv2031c)*: Corresponde a una proteína que cumple el rol de ser un importante factor de virulencia durante la fase de latencia de la bacteria. Esta proteína de 16 kDa es codificada por el gen *Rv2031c* el cual es regulado por el factor de transcripción regulón DosR ampliamente caracterizado debido a que co-regula la expresión de diversos genes asociados a la etapa de dormancia del patógeno(63,64). Acr1 conocida también como HspX o proteína de estrés, es sobreexpresada durante la etapa no replicativa o de

latencia de la bacteria debido a que inhibe su crecimiento(65,66). La expresión de Acr1 es inducida durante la fase de latencia en dónde existen condiciones de escasez de nutrientes, bajo pH y estrés oxidativo generado por bajas concentraciones de oxígeno y alta concentración de radicales libres en el sitio del granuloma (67,68)También se ha descrito que esta proteína con potentes propiedades antigénicas puede ser expresada en fases activas de la enfermedad, pero en menor proporción. Acr1 funciona como chaperona durante el estadio de dormancia de la enfermedad previniendo el plegamiento incorrecto y la desnaturalización de las proteínas bacterianas como consecuencia del estrés térmico, confiriéndole termorresistencia al patógeno(69,70). Además, Acr ha sido implicada en la protección de la bacteria contra los radicales libres y especies reactivas de nitrógeno altamente tóxicos y prevalentes dentro del granuloma(64,69,71). Esta proteína permite la adaptación y la viabilidad de la bacteria, es así como se ha visto que la reducción de la expresión de Acr1 resulta en una menor capacidad de tolerancia por parte de la bacteria a condiciones de anaerobiosis(64) .

Rv2660c: Corresponde a una proteína ´´hipotética´´ recientemente descubierta. El gen que codifica para esta proteína es sobreexpresada en condiciones de escases de nutrientes y de oxígeno durante el estado de latencia de la bacteria al interior del granuloma(72). A diferencia de los otros factores de virulencia de *M.bovis*, aún no se conoce con certeza la proteína a la cual codifica el gen *Rv2660c*, ni tampoco la función que esta cumple durante el estadio de latencia de la enfermedad, sin embargo, se ha evidenciado que en cultivos no replicativos y carentes de nutrientes la micobacteria aumenta la expresión del ARN mensajero (que codifica para RV2660C) entre 100-300 veces(73). Además, existen distintos estudios que han evaluado la capacidad inmunogénica de esta proteína utilizándola en ensayos de inmunización en conjunto con otros antígenos del patógeno demostrando ser un potente inductor de linfocitos T(74)**.**

1.6 Respuesta Inmune inducida por *M. bovis*

1.6.1 Inmunidad Innata

La respuesta inmune innata es la primera respuesta gatillada en el huésped en presencia de un microrganismo patógeno y se caracteriza fundamentalmente por ser una respuesta de tipo inespecífica mediada principalmente por células fagocíticas, células presentadoras de antígenos, y el sistema del complemento(75). Es así como en bovinos contagiados con *M. bovis*, esta respuesta se desarrolla aproximadamente desde las 24 horas post-infección. Usualmente el primer sitio de infección de la bacteria son los pulmones, donde esta entra en contacto con los macrófagos alveolares los cuales corresponden a las células del hospedador preferidas por el microrganismo y las que cumplen un rol efector importante durante la infección(76)**.** *M. bovis* es reconocido por receptores de superficie de los macrófagos y de acuerdo con el receptor con el que interacciona, puede ser o no fagocitada. El proceso de fagocitosis de la bacteria puede ocurrir a través de opsoninas (ej: colectinas, anticuerpos, y C3) que se adhirieren a componentes de la pared celular de *M. bovis* como los polisacáridos, para posteriormente ser reconocidos por receptores del complemento de los macrófagos (CR1 o CD35) y así mediar la fagocitosis. Por otra parte, la fagocitosis puede ocurrir sin opsonización, donde los receptores de manosa y receptores *scavenger* del macrófago reconocen directamente al ManLAM y el LAM de la pared celular de la bacteria, internalizándola(77,78) . Una vez que la bacteria es fagocitada, esta se aloja dentro de una vesícula conocida como fagosoma, la que puede fusionarse con el lisosoma para dar lugar al fagolisosoma. Cuando la bacteria es degradada en el fagolisosoma a través de enzimas como las hidrolasas y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, los productos de la bacteria destruida son descargados hacia el citosol del macrófago, activando la quinasa IRAK asociada a IL1-R. Esta vía a su vez activa al factor de transcripción NF-kB para que se inicie la expresión de citoquinas como IL-12, IL-18, TNF-α e lL-1β(76). Cada una de estas moléculas es secretada

al medio extracelular para la activación de los linfocitos T y el reclutamiento de nuevas células del sistema inmune hacia el sitio de infección, tales como células *Natural Killer* (NK), células dendríticas (CDs), neutrófilos y monocitos que ayudan en la destrucción de la bacteria o en la destrucción de las células infectadas(79). Por otro lado, los macrófagos pueden presentar diferentes antígenos de la bacteria procesada a los linfocitos T $CD4^+$ mediante moléculas de superficie de histocompatibilidad Clase II (MHC II), de manera tal que estos proliferen y produzcan citoquinas proinflamatorias que permitan la activación de otras células del sistema inmunes especializadas en la eliminación de la bacteria del organismo(80).

Por otra parte, en la superficie de los macrófagos existen otro tipo de receptores conocidos como receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*, TLRs) que reconocen patrones asociados a *M. bovis* (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), activando vías de señalización al interior del macrófago sin fagocitar la bacteria. Los TLR2 y TLR4 pueden reconocer al LAM y a lipoproteínas de la pared bacteriana desencadenado la activación de una vía de señalización para la expresión de la proteína de diferenciación mieloide 88 (MyD 88)(81). MyD88 integra la señal enviada por los TLR con la quinasa IRAK activando al factor NF-κB para su translocación hacia el núcleo de la célula y mediar la transcripción de citoquinas proinflamatorias que activen a otros tipos celulares(82).

Adicionalmente, en los últimos años se ha descubierto que los neutrófilos también cumplen un rol durante la respuesta inmune innata en individuos con infecciones pulmonares activas causada por *M. tuberculosis*. Específicamente se ha descrito una subpoblación de neutrófilos conocidos como granulocitos de baja densidad de sus siglas en inglés *LDGs,* los cuales poseen una actividad microbicida no descrita anteriormente(83). Esta actividad microbicida se basa en la capacidad de estos neutrófilos de inducir su muerte celular o netosis (independiente de caspasas), en respuesta a la activación de estas frente a una infección con *M.*

tuberculosis(84). Cuando los LDGs a través de sus receptores de superficie TLR2/4 entran en contacto con la micobacteria (mediante patrones moleculares asociados al patógeno), se gatillan una serie de mecanismos al interior de la célula. Dentro de estos participa la enzima NADPH que cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno o ROS, los cuales median la netosis de los neutrófilos(84). Por otro lado, la elastasa del citoplasma celular se transloca hasta el núcleo generando la descondensación de la cromatina. Todos estos fenómenos provocan que los neutrófilos viertan su contenido intranuclear al citoplasma y luego la mezcla sea difundida hacia el medio extracelular, culminando con la muerte de la célula(85). Este contenido intracelular da lugar a la formación de NETs (*neutrophil extracelular traps*), el cual está conformado por cromatina descondensada (ADN e histonas), péptidos microbicidas y proteasas granulares como la elastasa. Los NETs pueden ejercer su actividad microbicida mediante su habilidad de secuestrar al patógeno y a través de las proteasas con capacidad de degradar antígenos de la bacteria. Sin embargo, se ha demostrado que los neutrófilos y los NETs no son suficientes por si solos de eliminar a *M. tuberculosis*, sino que más bien actúan asistiendo la defensa y la contención de la infección en conjunto con otros grupos celulares como los macrófagos. Es así, como se ha descrito que los macrófagos pueden unirse a los NETs e ingerir la elastasa de los neutrófilos, lo que induce una mayor liberación de citocinas proinflamatorias en el sitio de infección(86).

De acuerdo con esto, es que la respuesta inmune innata contra *M. bovis* cumple un papel fundamental en la correcta activación de los macrófagos, neutrófilos y los linfocitos T, para que desarrollen una respuesta celular tipo Th1 y respuesta de memoria eficiente contra futuras reinfecciones(87)

1.6.2 Inmunidad Adaptativa

1.6.2.1 Respuesta humoral

La inmunidad humoral es un tipo de respuesta inmune específica frente a un patógeno, y es mediada por los linfocitos B e inmunoglobulinas secretadas y expresadas en la superficie de estas células, las cuales tienen capacidad de reconocer moléculas antigénicas.

En general, en animales contagiados con *M. bovis* y en el caso de otras enfermedades causadas por bacterias intracelulares, se ha descrito que la respuesta inmune humoral no cumple un rol fundamental en el control de la infección(87). Sin embargo, estudios recientes en distintas especies bacterianas intracelulares, han demostrado que cuando la bacteria transita de forma breve por el medio extracelular en algún momento de su ciclo de vida, los anticuerpos circulantes son capaces de reconocer a sus antígenos, quedando el patógeno expuesto a la acción de las inmunoglobulinas. No obstante, no se ha comprobado que la respuesta mediada por anticuerpos tenga un rol protector directo o neutralizante contra *M. bovis*(88). Más bien, se ha descrito que el papel de la respuesta humoral está relacionado con su potencial de modular la respuesta inmune celular, a través de ***i)*** la presentación de antígenos bacterianos mediante MHC II a los linfocitos T CD4+, ***ii)*** la secreción de anticuerpos que de forma directa reconocen al patógeno, ***iii)*** y a la producción de citoquinas que activan a células efectoras encargadas de matar al microrganismo y a células infectadas(89). A pesar de que la respuesta celular ha sido descrita como la principal en generar protección contra *M. bovis*, para ser efectiva necesita de la acción sinérgica otorgada por la respuesta humoral. Por otra parte, se ha evidenciado que las células B participan en la regulación de la proliferación de linfocitos T y en el posterior desarrollo de la respuesta T de memoria contra patógenos intracelulares(90,91)**.**

Estudios realizados en tuberculosis bovina y humana han mostrado que la respuesta humoral contra ambas micobacterias usualmente se desarrolla tardíamente y ha coincidido con periodos de alta carga bacteriana(92). Se han identificado anticuerpos específicos dirigidos principalmente contra componentes de la pared celular como lípidos y moléculas proteicas, así como también hacia proteínas secretadas en diferentes etapas de la infección(93):

i) El LAM ha sido descrito como uno de los componentes lipídicos de la pared celular de *M. bovis* capaz de inducir respuesta humoral, detectándose anticuerpos contra esta molécula cerca de los 40 días post-infección(93).

ii) MPB83 es una glicoproteína identificada como uno de los mayores componentes antigénicos de *M. bovis*, que se encuentra presente tanto en la pared celular como en el medio extracelular, con capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos tipo IgM breve y temprana a las 4 semanas post-infección(94,95).

iii) MPB70, ESAT-6 y CFP-10 son proteínas secretadas principalmente en etapas tempranas de la enfermedad, que actúan como importantes factores de virulencia de *M. bovis*, e inducen una potente respuesta de anticuerpos en animales infectados vía intranasal con dosis cercanas a 10^7 UFC(95,96). Otras proteínas secretadas como MPB59, MPB64 y MPB51 también han sido descritas en su rol de inducir respuesta humoral en animales infectados con *M.* bovis(96).

Por otro lado, también se han identificado proteínas intracelulares altamente seroreactivas, tales como los antígenos Acr y el recientemente descubierto Rv2660c, expresados durante la fase de latencia de la bacteria(97)**.**

A pesar de que existe una detallada caracterización del potencial inductor de respuesta de anticuerpos de estos antígenos, se ha observado en algunos estudios que la cinética de anticuerpos contra estas proteínas puede variar

significativamente entre animales. Es así como en investigaciones donde se han realizado análisis serológicos en animales previamente infectados con *M bovis*, no se ha logrado detectar anticuerpos específicos contra ESAT6, CFP10 y Acr sino hasta después de un año desde la inoculación, mientras que en otros animales la respuesta es percibida a las pocas semanas desde el contagio. De esta manera estos trabajos explicarían que esta diferencia podría estar asociada a múltiples factores tales como: el individuo, la vía de infección, dosis infectiva, y a la inmunodominancia de estas proteínas en diferentes estadios de la infección, entre otros(96).

1.6.2.2 Respuesta celular

La inmunidad adquirida mediada por células, al igual que la inmunidad humoral, es un tipo de respuesta adaptativa específica frente a un patógeno que se desarrolla a partir de la presentación de antígenos por medio de células presentadoras de antígenos (*Antigen presenting cell* - APC) como macrófagos y células B a linfocitos T CD4+ y células dendríticas (CDs) a linfocitos T CD4+ vírgenes. Este primer contacto entre el antígeno y el linfocito T permite su activación, proliferación y diferenciación a células T efectoras (cuando la presentación es mediada por CDs) capaces de responder rápidamente para eliminar al microrganismo.

A diferencia de la respuesta humoral, la inmunidad celular cumple un rol fundamental impidiendo en algunos casos la progresión de la enfermedad y generando protección contra *M. bovis.* Además, se ha observado que esta respuesta puede gatillarse tempranamente a las dos semanas post-infección (Fig. 1)(98,99).

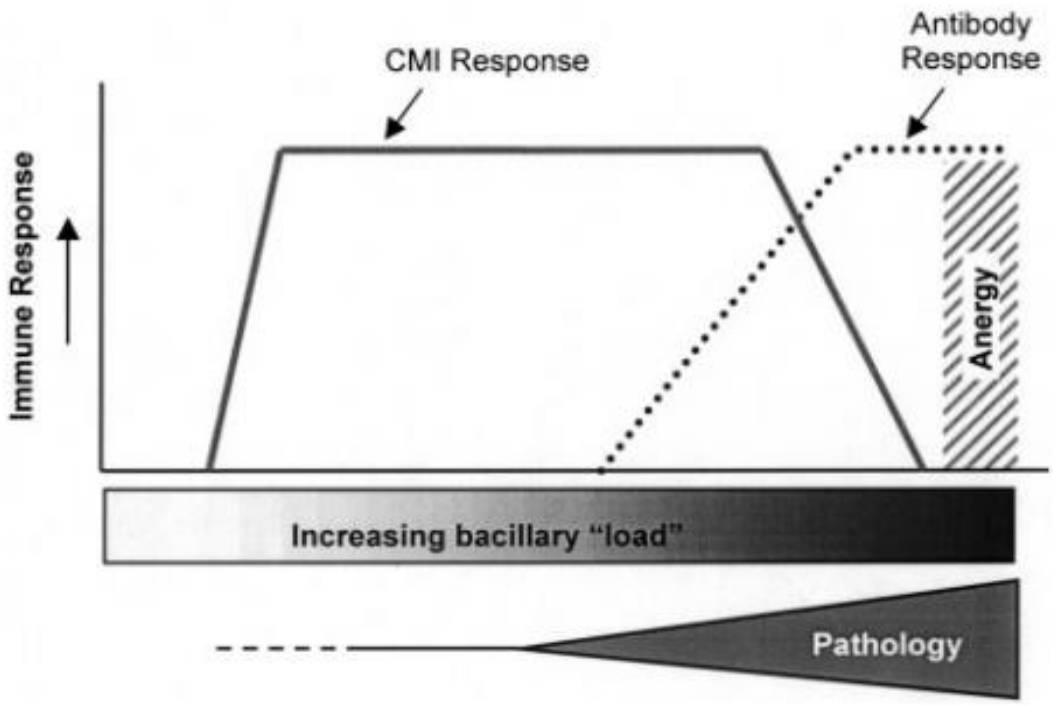


Figura 1. Representación gráfica de la respuesta inmune inducida por M. bovis en bovinos. Respuesta inmune celular (CMI) desarrollada en fases iniciales de la infección e inmunidad humoral detectable a medida que aumenta la carga bacteriana (desde izquierda a derecha). Un estado de ´´anergia´´ ocurre en estados avanzados de la enfermedad, donde no se detecta respuesta CMI. El inicio de cambios patológicos está asociado a la aparición de la inmunidad CMI y la patología aumenta mientras la enfermedad progresa (desde izquierda a derecha)(98).

La respuesta celular adaptativa contra *M. bovis* es el resultado de una serie de eventos que involucran células especializadas como los linfocitos colaboradores T $CD4^+$, linfocitos T citotóxicos $CD8^+$, linfocitos T γδ, células NK y macrófagos, citoquinas (IFNγ, TNFα, IL-1, 2, 12, 17, 21, 22 y 23) y mecanismos efectores

citotóxicos. La adecuada interrelación entre estos elementos inmunológicos es primordial para generar protección en animales con tuberculosis bovina (76,100).

Después de que la bacteria es fagocitada y procesada al interior de los fagolisosomas, los antígenos obtenidos son liberados hacia el citoplasma de la célula, desencadenando la activación de vías de señalización que activan al factor NF-κB para la transcripción de IL-12 y otros factores proinflamatorios. Al mismo tiempo, estos antígenos son acoplados a las moléculas de MHC clase I y II si son de origen proteico, o a moléculas CD1 cuando son derivados lipídicos, y son expuestos en la superficie celular. Por un lado, MHC clase II presentan antígenos a linfocitos T $CD4^+$, mientras que MHC clase I a linfocitos T $CD8^+$ y CD1 a células NKT. La presentación antigénica sumada a la presencia de factores proinflamatorios, activan a los linfocitos T(76).

Durante la infección con *M. bovis,* los linfocitos T $CD4^+$ son los principales mediadores de la respuesta adaptativa celular. Corresponden a una de las primeras células en activarse siendo detectadas entre las 4-6 semanas post-infección(94). Estos linfocitos son esenciales para contener la enfermedad pues se ha evidenciado que la depleción experimental de estas células genera un descontrol de la infección(101). Una vez que los linfocitos T $CD4^+$ tipo Th1 son activados, estos tienen por función principal producir una mayor cantidad de IFN-γ para que actúe sobre otras células como los macrófagos, potenciando su actividad bactericida(76). Los macrófagos activados por acción del IFN-γ secretan IL-1β e IL-2, que favorecen la proliferación de linfocitos T $CD4^+$ y su diferenciación en células efectoras caracterizadas por una respuesta tipo Th1, con capacidad de potenciar la actividad bactericida de las células infectadas **(111)**. Los linfocitos T $CD4^+$ también promueven la secreción de TNF-α por parte de los macrófagos infectados, el cual modula la apoptosis de estas células. La apoptosis extrínseca mediada por caspasas, inducida por TNF-α reduce los riesgos de diseminación de la bacteria hacia el espacio extracelular a través de la formación

de vesículas apoptóticas que contienen a bacterias que aún son viables(102). Por otra parte, frente a la infección con *M. bovis* los linfocitos T $CD4^+$ tienen la capacidad de diferenciarse en células de memoria centrales (*T central memory cells* - T_{cm}) que expresan los marcadores de superficie CD62L y CCR7, y en células de memoria efectoras o T_{em} (*T effector memory cell* - T_{em}) que carecen de CD62L y CCR7. Las células T_{cm} son altamente proliferativas y dan origen a las células T_{em}. Ambas células cumplen un rol fundamental en gatillar una respuesta rápida y eficiente contra nuevas infecciones con *M. bovis*(102). Por otro lado, se ha visto que los linfocitos T $CD4^+$ son los principales productores de IL-21, la cual está asociada a la estimulación de actividades citotóxicas como la expresión de perforinas en células T $CD8^+$ efectoras, y la inducción y mantención de la producción de IFN- γ en respuestas protectoras(99,103).

Los linfocitos T $CD8^+$ también participan en la respuesta celular adaptativa contra *M. bovis.* No obstante, estas células se activan más tarde que los T $CD4^+$, entre las semanas 8-10 post-infección(99) . Una vez que los T $CD8^+$ se activan, estos proliferan y se diferencian en células citotóxicas efectoras. La actividad citotóxica de estas células durante la infección se caracteriza por la producción de IFN-γ, el cual actúa sobre los macrófagos para inducir principalmente la expresión de la enzima óxido nítrico inducible (iNOS), la acidificación del fagosoma y la formación fagosoma-lisosoma. Por otro lado, los linfocitos T $CD8^+$ también sintetizan gránulos con proteínas en su interior como las perforinas, granzimas y granulicinas, las cuales son liberadas. Es así como las perforinas se unen a la superficie de la célula infectada generando un poro y la activación de la enzima caspasa provocando la apoptosis de la célula infectada. Las granzimas por su parte al interior del fagocito destruyen proteínas y las granulicinas ejercen una acción bactericida sobre *M. bovis*(104). Al igual que los linfocitos T $CD4^+$, los T $CD8^+$ también pueden diferenciarse en células T de memoria, principalmente T_{em}, y ejercer su actividad citotóxica más eficientemente frente a nuevas infecciones

con *M. bovis* o a su reactivación. Por otra parte, las células NK también tienen una potente acción citotóxica durante la tuberculosis bovina a través de la secreción de IFN- γ, y la producción de perforinas y granulicinas para destruir a las células infectadas y por consiguiente a la bacteria(104).

Otro tipo de células T implicadas en la respuesta frente a *M. bovis* son los linfocitos T γδ $WC1^{+}$. Estas células son las primeras en llegar al sitio de infección, por lo que ejercen su acción en etapas tempranas de la enfermedad(47). Se ha demostrado que estos linfocitos se activan durante la primera semana transcurrida la infección y su población incrementa considerablemente hacia la segunda semana post-infección(44) . Se postula además que estas células son las intermediarias entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en la tuberculosis bovina, debido a que participan en ambas respuestas. Los linfocitos T γδ tienen la capacidad de reconocer antígenos bacterianos independiente de MHC, su activación permite la secreción de IFN-γ para la activación de macrófagos con actividad bactericida, y tienen una importante función citotóxica sobre células infectadas(105,106). Por otro lado, estos linfocitos median el reclutamiento de nuevas células del sistema inmune hasta el sitio de infección, modelando de esta manera la formación temprana del granuloma para contener a la bacteria(44). Diferentes estudios han confirmado que la función de los linfocitos T γδ $WC1^{+}$ no es meramente controlar la infección con *M. bovis*, sino que establecer una respuesta inmune adecuada y efectiva en el hospedador(107). Esto último se ha evidenciado en ensayos en terneros con depleción de este tipo de células, los cuales han presentado un cambio fenotípico de la respuesta inmune, caracterizada por la reducción evidente de la producción de IFN-γ y disminución en general de citoquinas tipo Th1. A través de la acción de la IL-23 e IL-1β (las cuales son producidas por las células dendríticas en presencia de la bacteria), los linfocitos T γδ $WC1^{+}$ exhiben rasgos de una respuesta tipo Th17 durante fases iniciales de la enfermedad(108). Esta

respuesta estaría caracterizada por la secreción de IL-17 e IL-22, donde la IL-17 sería la principal responsable del establecimiento de los primeros eventos inflamatorios en la infección con *M. bovis* a través del reclutamiento de neutrófilos(104).

1.6.3 Antígenos de *M. bovis* inmunogénicos relacionados a la Inmunidad protectora

De acuerdo con diversos estudios, la generación de una respuesta protectora contra *M. bovis* está dada principalmente por la activación de los linfocitos colaboradores T $CD4^+$ capaces de inducir una respuesta inmune tipo Th1. Esta respuesta se caracteriza fundamentalmente por la secreción de IFN-γ cuyo rol es activar a macrófagos potenciando su actividad bactericida y a células citotóxicas para que destruyan a las células infectadas. Además, se ha descrito que la presencia de linfocitos T de memoria (T_{cm} y T_{em}) es un factor determinante en la protección contra *M. bovis.* Lo anterior radica en la capacidad de estas células de proliferar, vivir largo tiempo y responder de manera rápida y eficiente contra una nueva infección con la bacteria, confiriendo protección durante un tiempo prolongado(109). En el último tiempo también ha tomado gran relevancia el estudio del rol de la respuesta tipo Th17 en la inmunidad protectora contra la bacteria. Diferentes trabajos han demostrado que esta respuesta cumple una función esencial durante las etapas iniciales de la infección en el establecimiento del proceso inflamatorio(110)

Según lo precedido, distintos trabajos han identificado proteínas de *M. bovis* utilizadas como candidatos vacunales, que inducen protección en animales frente a un desafío con la bacteria(111). La proteína **Ag85b** corresponde a un antígeno inmunodominante de *M. bovis* y de otras micobacterias tal como *M. tuberculosis*, el cual es secretado en grandes cantidades a los 3 días post-infección(112). Este antígeno ha sido descrito como un potente inductor de respuesta celular Th1 mediada por la producción de IFN-γ, TNF-α e IL-2, y de respuesta citotóxica

mediada por linfocitos T $CD8^+$(54). Es así como estudios de mapeo de Ag85b realizados en humanos han identificado epítopes que estimulan específicamente a los linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$, sugiriendo que estas regiones antigénicas están involucradas en conferir inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*(113). Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente en modelos murinos y humanos que la fusión de Ag85b con otras proteínas inmunogénicas potencia la respuesta protectora en el organismo [126, 130, 131]. Asimismo, ratones y cobayos inmunizados con vacunas de ADN que expresan Ag85b han generado inmunidad protectora parcial contra la infección(111). Por último, formulaciones vacunales que incluyen este antígeno han demostrado conferir mayor protección que la vacuna BCG(114). Otra proteína que ha sido caracterizada como un potente inductor de respuesta de linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ cuando se administra como candidato vacunal en animales es **ESAT-6**(115,116). Se ha reportado que entre el 25-35% de la respuesta inmune mediada por linfocitos T durante la fase inicial de la infección va dirigida contra este antígeno. Estudios en ratones han demostrado que en la respuesta de memoria contra *M. tuberculosis*, ESAT-6 es el principal inductor de la producción de IFN-γ por los linfocitos T, confiriendo protección contra la bacteria(117,118). Por lo tanto, debido a las características antigénicas de ESAT-6, esta proteína ha sido utilizada en diferentes formulaciones vacunales. Por un lado, la inmunización de ratones y cobayos con una vacuna de ADN que expresa ESAT-6 ha demostrado inducir protección frente a un desafío con la bacteria, generando una respuesta Th1 y citotóxica que disminuye la infección pulmonar y la carga bacteriana(118,119) . Por otro lado, igualmente se ha descrito el uso de ESAT-6 fusionado al antígeno Ag85b en una vacuna recombinante de subunidades, donde otorga mayor protección que cuando es utilizado como antígeno único(119). En una investigación donde diferentes grupos de ratones fueron inmunizados con una cepa de *M. tuberculosis*, BCG recombinante que incluía la región RD1 (la cual codifica para ESAT-6) y BCG carente de la región RD1 (ΔRD1), se demostró que aquellos ratones que

recibieron la cepa de *M. tuberculosis* y BCG (RD1) desarrollaron una mejor respuesta protectora caracterizada por una potente respuesta tipo Th17, en comparación al grupo que recibió BCG (ΔRD1)(120).

La mayoría de los estudios avocados a evaluar respuesta inmune celular y protección contra la bacteria están dirigidos hacia proteínas secretadas durante la fase activa de la infección. Sin embargo, se ha demostrado que existen diversas proteínas que se expresan durante la etapa de latencia de la micobacteria, que generan una respuesta inmune de linfocitos T efectiva contra el microrganismo(121). Un ejemplo de estas proteínas de latencia es el Acr1 (*Alpha crystallin protein*), la cual es una proteína expresada bajo condiciones de hipoxia. Estudios han descrito que la inmunización de cobayos con una vacuna de ADN que codifica para la proteína **Acr1** genera una respuesta inmune tipo Th1 con altos niveles de IFN-γ, otorgando protección en un desafío contra una cepa virulenta de *M. tuberculosis* **(137)**. Otro estudio realizado en ratones demostró que la vacunación con la proteína Acr1 fusionada a Ag85, generó una potente respuesta de linfocitos T, anticuerpos IgG y una elevada producción de IFN-γ(119).

1.7 Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune de *M. bovis*

En general, las micobacterias patógenas como *M. bovis* y *M. tuberculosis* emplean los mismos mecanismos para evadir la respuesta del sistema inmune y poder sobrevivir al interior de la célula hospedadora(122).

1.7.1 Inhibición de metabolitos reactivos del nitrógeno y óxido nítrico

En los macrófagos infectados con la micobacteria, gracias a la acción del IFN-γ y otras citoquinas proinflamatorias producidas por los linfocitos T, se activa la enzima NADPH oxidasa para la producción de anión superóxido y la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Esta última cataliza la conversión de arginina en citrulina generando óxido nítrico (NO), el cual a su vez reacciona con

ión superóxido para producir peroxinitrito $ONOO^-$ (123,124). Este compuesto tiene una potente actividad oxidativa, siendo altamente tóxico para la bacteria alojada en el fagosoma debido a que actúa sobre su material genético o proteínas, alterando la funcionalidad de la bacteria y causando su muerte(125). No obstante, el microrganismo utiliza diferentes estrategias para eludir a estos metabolitos oxidantes, como por ejemplo la expresión del gen *noxR1* que codifica la proteína NoxR1, la que le otorga resistencia a la bacteria frente a la acción de los radicales libres(126). Otro mecanismo que utiliza la bacteria es bloquear la acción de la iNOS, impidiendo su ingreso hacia el interior del fagosoma. Es así como la vesícula que contiene a la bacteria no retiene la proteína EBP50, la cual normalmente se encuentra asociada a la actina del citoesqueleto de la célula permitiendo la movilización de proteínas en el citoplasma y por lo tanto media el ingreso de la iNOS hasta el fagosoma para provocar la muerte del patógeno. Por otro lado, la bacteria durante la infección utiliza vías de secreción tales como ESX1, Sec y SecA2 para la producción de proteínas que permiten su sobrevivencia al interior de la célula(127). El sistema de secreción SecA permite la síntesis de las enzimas superóxido dismutasa (SodA) y catalasa peroxidasa (KatG), las cuales metabolizan el peróxido de hidrógeno convirtiéndolo en agua y oxígeno para así prevenir la formación de radicales libres por la iNOS(128). También se ha observado que el sistema SecA inhibe la vía de expresión de citoquinas tipo Th1, favoreciendo la sobrevivencia de la micobacteria al interior del macrófago(129).

1.7.2 Inhibición de la maduración del fagosoma y fusión fagosoma-lisosoma

La bacteria ingresa al macrófago a través del proceso de fagocitosis y se alberga en una vesícula formada a partir de la membrana plasmática de la célula, la cual se invagina dando lugar al fagosoma(130). Una vez que la bacteria está en el interior del fagosoma este normalmente madura a través de un pH ácido entre

4.5-5, por la presencia de enzimas hidrolíticas y metabolitos de nitrógeno y oxígeno, permitiendo la destrucción de la bacteria. Sin embargo, el microrganismo logra impedir la maduración del fagosoma manteniéndolo en un estado de fagosoma temprano(131). El fagosoma inmaduro recluta de forma transitoria a la enzima Rab5 (GTPasa) desde la membrana plasmática o desde el citoplasma, con el objetivo de atraer a la enzima Rab7, la cual es necesaria para la maduración del fagosoma y la unión fagolisosoma(132). Es así como el patógeno evita la maduración del fagosoma, reteniendo a la enzima Rab5 por un período de tiempo mayor al normal, impidiendo que esta última reclute a la enzima Rab7. Además, se ha observado que el ManLAM de la pared bacteriana interfiere con la vía de señalización que utiliza la Rab5 conocida como PI-3K en el reclutamiento de Rab7 al interior del fagosoma inmaduro(133). El ManLAM además inhibe el tráfico de factores tales como la enzima catepsina D (hidrolasa lisosomal) desde el aparato de Golgi hasta el fagosoma inmaduro, la cual es necesaria para la maduración y formación fagosoma-lisosoma(134). Por otro lado, se descubrió que la mayoría de los fagosomas con la bacteria retienen a la proteína P57 o TACO (*tryptophane aspartate-containing coat protein*) encargada de conectar las señales enviadas desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática con el interior de la célula(135,136). La proteína TACO también participa en la fusión fagosoma-lisosoma regulando mecanismos de señalización Ca^{++} dependientes. Para que la fusión de ambas vesículas ocurra se necesita de la calcineurina, la cual es activada por la acción del Ca++, por ende, si la proteína TACO está secuestrada en los fagosomas y no está disponible en el citoplasma se impide el proceso de fusión(137).

1.7.3 Interferencia en la presentación antigénica mediante MHC clase II

La bacteria infecta al macrófago a través del proceso de fagocitosis y allí se alberga en el fagosoma(45). Para que la bacteria sea correctamente presentada a los linfocitos T CD4+, esta debe ser procesada al interior del fagosoma tardío

por diferentes enzimas aportadas por el lisosoma. Una vez que la micobacteria es degradada, los péptidos obtenidos están listos para ser cargados al MHC II. El MHC II se produce en el retículo endoplásmico y en su surco de unión al antígeno procesado posee una molécula peptídica llamada CLIP. Para que el péptido se acople al MHC II, el surco de unión debe perder el CLIP. Posteriormente, el complejo MHC II-péptido está listo para ser exportado hasta la superficie celular mediante el proceso de exocitosis y posteriormente presentar el péptido antigénico al linfocito T CD4+(138). Sin embargo, dentro del fagosoma la bacteria desarrolla mecanismos que le permiten eludir su presentación mediante el MHC II. Una de ellas consiste en el transporte de la bacteria desde el fagosoma hasta el citoplasma, evitando ser procesada al interior del fagosoma y al mismo tiempo impidiendo la fusión fagolisosomal para su posterior presentación en la MHC II(139). Esto ha sido relacionado a la acción de las proteínas de secreción ESAT-6 y CFP-10 que produce el microrganismo en fases tempranas, y al lipopolisacárido ManLAM, los cuales polarizan la membrana del fagosoma permitiendo la salida de la micobacteria. Asimismo, se ha demostrado que el ManLAM inhibe la acción del IFN-γ en activar a los factores de transcripción del MHC II, provocando la disminución de la expresión de la molécula en la célula afectada(140,141). Por otra parte, el microrganismo interfiere con el proceso de co-localización del MHC II en el fagosoma tardío mediante la interrupción del correcto ensamblaje del complejo MHC II impidiendo su transporte hasta la vesícula y unirse con el antígeno procesado(142). Se ha observado también que el patógeno interviene en la correcta unión del péptido con la molécula para luego ser exhibido en la superficie celular, esto ocurre a través del bloqueo de la liberación del CLIPP del MHC II o bloqueando que el péptido se una al MHC II(143). Por último, se ha demostrado que el microrganismo impide el transporte del endosoma con el péptido degradado y adherido al MHC II hasta la membrana plasmática(142).

1.7.4 Persistencia de M. bovis a través de la fase de latencia

La micobacteria evade el ataque de las células del sistema inmune (macrófagos, NK, y linfocitos T) entrando en una fase de latencia, donde disminuye al máximo su metabolismo suprimiendo también su capacidad de replicación al interior del granuloma [52]. Este granuloma se genera en respuesta a la infección causada por la bacteria, el cual está conformado por células inmunitarias que rodean a aquellas infectadas tratando impedir la diseminación del patógeno hacia otros sitios del organismo(144). Dentro del granuloma, el patógeno está sometido a condiciones de estrés, como baja concentración de oxígeno, baja cantidad de nutrientes y alto contenido de óxido nítrico, no obstante, la micobacteria tiene la capacidad de adaptarse frente dichas condiciones a través de la modificación de la expresión de genes. Durante la etapa de latencia ocurre la supresión de los genes relacionados al metabolismo aerobio y al anabolismo de la bacteria(145). Por otro lado, existen alrededor de 50 genes que son activados y expresados durante periodos de hipoxia a través del factor de transcripción conocido como regulón DosR, el cual co-regula la expresión de estos genes(146). Debido a esto la bacteria adquiere la característica de ser microaerófilo, por lo tanto, cambia de forma provisoria su respiración aeróbica por una que le permite subsistir con concentraciones bajas de oxígeno quedando en una forma de persistencia no replicativa. Los factores DosS y DosT permiten la activación del regulón DosR, permitiéndole a la bacteria supervisar la concentración de oxígeno, monóxido de carbono y óxido nítrico en la célula hospedadora(147). De esta manera la expresión de los genes Rv2027c (DevT) y Rv3132c (DevS) es co-regulada por los factores DosS y DosT para posteriormente sintetizar dos proteínas de membrana llamadas DosS y DosT respectivamente. La proteína DosS es un sensor de las condiciones oxido-reductivas de la célula, mientras que la DosT actúa como sensor de la tensión de oxígeno(148).En conjunto, ambas proteínas permiten “fiscalizar” la concentración de O_2, CO y de NO en la célula hospedadora, de manera de entregar la señal al regulón DosR para que se active

y comience la transcripción de los genes de resistencia para estas condiciones(147).

El regulón DosR también co-regula la transcripción de genes divergentes tal como HspX-Rv2031c, el cual codifica para la proteína Acr(149). La proteína Acr es transcrita bajo condiciones de hipoxia y altas concentraciones de NO, la cual actúa como una chaperona cuya principal función es proteger a las proteínas bacterianas de la desnaturalización producto del calor. Es debido a esto mismo, que esta proteína es también conocida como HspX o proteína de shock térmico. Además, se ha descrito que Acr podría proteger a la bacteria de los radicales libres y las especies reactivas de nitrógeno altamente prevalentes dentro del granuloma(69).

Por otro lado, durante la fase de latencia en el microrganismo también se expresan factores de transcripción sigma como por ejemplo RpoV, sigB, sigE y sigH los cuales se asocian a la enzima RNA polimerasa y permiten la expresión de genes que le otorgan resistencia a la bacteria frente a condiciones de shock térmico y a condiciones oxidativas (150,151). Se ha demostrado que estos factores sigma pueden otorgar virulencia a cepas bacterianas de *M. bovis* atenuadas permitiendo su sobrevivencia.

1.8 Vacunas

Se entiende por vacuna cualquier preparación que puede estar constituida de un microrganismo atenuado o muerto, o de algún componente de este, que induce inmunidad protectora contra la infección provocada por el agente virulento(152).

1.8.1 Vacunas Convencionales

Las vacunas de primera generación están compuestas del microorganismo completo, el cual es tratado de diferentes maneras con el objetivo de atenuarlo o inactivarlo. Un ejemplo de ellas son las **vacunas vivas atenuadas,** en donde el patógeno es sometido a repetidos pasajes en cultivo celular o a la eliminación o

mutación de algún gen mediante la tecnología del ADN recombinante, generando una cepa mutante carente de virulencia. En general este tipo de vacunas son muy efectivas, pues dosis únicas inducen respuesta inmune innata y adaptativa de forma similar al patógeno virulento. Sin embargo, la mayor problemática asociada al uso de vacunas atenuadas está en el riesgo de reversión a su forma patogénica y de generar enfermedad en los individuos tratados. Las vacunas contra la tuberculosis humana (BCG), la poliomielitis, sarampión y la fiebre amarilla son algunos tipos de vacunas vivas atenuadas utilizadas en la actualidad(153,154). Por otro lado, también están las **vacunas muertas inactivadas** que a través de procesos físicos (calor) o químicos (formalina) destruyen la capacidad de replicación de la bacteria, manteniendo intacta sus propiedades inmunogénicas para que aún sea reconocida por el sistema inmune(155). Estas vacunas se caracterizan por inducir menos protección que las vivas atenuadas, donde la respuesta inmune provocada tiene una menor duración, siendo necesario aplicar más de una dosis (*booster*) o coadministrar junto a un potente adyuvante para obtener la respuesta inmune deseada. Un ejemplo clásico de vacuna muerta corresponde a una de las que actualmente se utilizan contra el virus de la influenza(156). Por último, se encuentran las **vacunas tipo toxoide**, que corresponden a un tipo de vacuna inactivada, desarrollas a partir de toxinas producidas por diferentes microorganismos bacterianos. Las toxinas secretadas por el patógeno son las responsables de generar la enfermedad clínica en individuos no inmunocompetentes. Es así, como la administración de estas vacunas tiene la capacidad de generar inmunidad específica contra los antígenos presentes en las toxinas. Dos ejemplos de este conjunto de vacunas son las actualmente utilizadas contra el tétano y la difteria(157).

1.8.2 Vacunas de nueva generación

La generación de nuevos tipos de vacunas surge como una alternativa ventajosa frente a los inconvenientes que presentan las vacunas tradicionales vivas atenuadas y muertas inactivadas. Dentro de las vacunas de segunda generación se encuentran las de subunidades recombinantes, bacterias vivas como transportador, vacunas de ADN y vacunas conjugadas.

Vacunas de Subunidades/ Recombinantes: Estas vacunas se producen a través de la tecnología del ADN recombinante, permitiendo desarrollar vacunas inocuas destinadas al control de diversas enfermedades(158). Las vacunas de subunidades recombinantes se componen de moléculas antigénicas tales como proteínas o péptidos producidos en un hospedador heterólogo. Este tipo de vacunas se basan en el potencial de uno o más antígenos de generar inmunidad contra el agente infeccioso(159,160). Las principales ventajas que presentan las vacunas de subunidades recombinantes en comparación a las vacunas tradicionales: ***i)*** no representan un riesgo de reversión a la forma patogénica debido a que están elaboradas en base a diferentes antígenos y no al organismo completo, por lo tanto, no presentan riesgo de transmisión, ***ii)*** tienen una composición definida, pues se conocen los antígenos que son incluidos en la formulación, ***iii)*** reduce la presencia de contaminantes indeseados en la preparación**.** A pesar de los grandes beneficios que conlleva el uso de estas vacunas, su principal desventaja radica en que generalmente se requieren múltiples dosis de administración para alcanzar la respuesta inmune deseada y del uso conjunto de algún adyuvante potenciando la inmunogenicidad de la vacuna, además de prolongar la respuesta de memoria inducida por la misma (158,160,161). La primera vacuna de subunidades recombinante desarrollada en el mundo corresponde a la del virus de la hepatitis B. Esta vacuna se elabora a partir del antígeno de superficie más inmunodominante del virus (HBsAg) expresado en células de levadura(162). Desde entonces se han desarrollado

múltiples vacunas recombinantes, como por ejemplo contra el virus de papiloma humano (HPVs), pseudorabia porcina, diarrea viral bovina, influenza aviar, entre otras(163,164).

Para el desarrollo de una vacuna de subunidades recombinante proteica se requiere en primer lugar clonar el gen codificante del antígeno de interés dentro de un vector de expresión específico para el sistema de expresión que será empleado. Este sistema de expresión se escoge en base a las características fisicoquímicas de la proteína que se va a producir y la presencia de modificaciones postraduccionales(165). Dentro de los sistemas de expresión más comúnmente utilizados se encuentran: ***i)*** levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris),* ***ii)*** bacteria (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium)*, ***iii)*** células de insectos (sistema de Baculovirus), ***iv)*** células de mamíferos (Células de ovario de hámster chino, CHO), ***v)*** células vegetales(166). Los sistemas de levaduras en comparación a los bacterianos poseen la ventaja de producir proteínas en el medio extracelular, además de permitir realizar modificaciones postraduccionales como fosforilación y glicosilación a la proteína expresada(167). Los sistemas de expresión bacterianos son ampliamente utilizados debido a que permiten obtener altos niveles de expresión del antígeno, son simples de manejar y son adecuados para proteínas que no requieren modificaciones postraduccionales(168). Por otro lado, los sistemas de expresión en células de insectos permiten producir proteínas de manera eficiente con modificaciones postraduccionales, no obstante, la principal desventaja de estos sistemas es su mayor costo. Por su parte, la gran ventaja que tienen los sistemas de expresión en células de mamíferos en comparación al resto de los sistemas es que admiten modificaciones postraduccionales, sin embargo, dentro de sus desventajas destacan su fácil riesgo de contaminación con patógenos, alto costo de producción posee un escalado de producción limitado, etc(169). Por último, las células vegetales como sistemas de expresión incorporan distintas ventajas,

dentro de las que se encuentran principalmente: la ausencia de riesgo de contaminación con patógenos animales, bajo costo de producción, alto rendimiento de la proteína expresada y la posibilidad de generar vacunas comestibles como método de vacunación masiva, entre otras. Su principal desventaja radica en el largo tiempo de producción a gran escala de la proteína deseada(170).

Vacunas de bacteria viva atenuada como transportador: Se fundamentan en el uso de vectores recombinantes vivos atenuados, a través de pasajes seriados en cultivo o mediante la inserción de mutaciones en su genoma. Estos vectores son capaces de presentar antígenos heterólogos a través de la introducción de genes que codifican para esas moléculas. De esta manera se aprovecha la capacidad infectiva del vector (generalmente bacterias o adenovirus) para inducir una respuesta inmune contra sus propias proteínas y también contra los antígenos heterólogos(171,172). Este tipo de vacunas han demostrado ser muy eficaces como inmunógenos, sin embargo, tienen el riesgo de revertir a la forma patogénica y demandan mayores costos económicos que las vacunas recombinantes de proteínas. La cepa BCG de *M. bovis* ha sido también utilizada como vector de proteínas heterólogas del virus del VIH, lehismania, malaria e incluso de *M. tuberculosis*. Un ejemplo de esta estrategia es la modificación genética de la cepa BCG, permitiendo que esta exprese el antígeno Ag85 de *M. tuberculosis*, con el fin de aumentar la eficacia de la cepa BCG(173).

Vacunas de ADN: Consisten en un plásmido desnudo (genes de interés más promotor) que codifica la expresión de un antígeno particular en las células hospedadoras. Es así como el hospedador desarrollará una respuesta inmune contra este antígeno en particular(174). Para mejorar la respuesta inmune inducida por este tipo de vacunas se han diseñado sistemas que además expresan citoquinas coestimuladoras. Este tipo de vacunas se ha utilizado para expresar antígenos del virus de la influenza, virus VIH, y *M. tuberculosis*(175).

Algunas de las ventajas principales de esta vacuna es su bajo costo de producción, fácil manejo, estabilidad a temperatura ambiente e induce respuesta inmune humoral y celular. Sin embargo, estas vacunas tienen el potencial riesgo de que el plásmido utilizado se integre al material genético del hospedador, que genere una respuesta inmune indeseada contra el propio ADN y además que induzca tolerancia inmunogénica frente a antígenos endógenos, entre otras(174).

Vacunas Conjugadas: Este tipo de vacunas se desarrollan contra aquellas bacterias que poseen una cápsula rica en polisacáridos que las protege de la fagocitosis por parte de células del sistema inmune. En diversas especies bacterianas los polisacáridos capsulares se caracterizan por no ser altamente inmunogénicos, por lo que las vacunas conjugadas surgen a partir de la fusión de un polisacárido con una proteína altamente inmunoreactiva. Esta proteína permite que el sistema inmune del hospedador la reconozca y también gatille una respuesta en contra del polisacárido. Un ejemplo de esta vacuna es la que actualmente se utiliza para *Streptococcus pneumoniae*(176).

1.9 Adyuvantes inmunológicos

Los adyuvantes inmunológicos corresponden a sustancias o preparados químicos con acción inmunomoduladora que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, mejoran la efectividad de la respuesta inmune. Es así, como se ha descrito que los adyuvantes potencian la magnitud y la durabilidad de la inmunidad otorgada por una vacuna(177).

Actualmente, los adyuvantes pueden encontrarse en diferentes categorías dentro de las cuales destacan: ***i)*** sales minerales (ej: fosfato de aluminio), donde antígenos de origen bacteriano o viral son absorbidos en sales, ***ii)*** emulsiones de agua en aceite (ej: Montanide ISA-51), corresponden a una mezcla de aceite de origen vegetal con un tensioactivo de la familia de monooleato de manida ***iii)*** partículas (ej: liposomas), en dónde los antígenos son incorporados al interior o en la superficie de las partículas, ***iv)*** derivados microbianos (ej: lipoproteínas

bacterianas) y ***v)*** citoquinas (IFN-α2), que actúan como adyuvantes moleculares(177).

A pesar de que se ha demostrado que las vacunas recombinantes son capaces de inducir una potente respuesta inmune contra un determinado patógeno, se ha observado en diversos casos que debido a que este tipo de vacunas son elaboradas en base a la expresión de uno o más antígenos inmunoprotectivos y no al microrganismo completo, se requiere de la administración conjunta con co-estimuladores que potencien la eficacia otorgada por la vacuna(178) En virtud de esto, existen diversas citoquinas que se utilizan y que funcionan como adyuvantes moleculares debido a su habilidad de modular el tipo y la duración de la respuesta inmune generada frente a una inmunización. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y el interferón alfa 2 (IFN-α2) son dos ejemplos de importantes adyuvantes moleculares(179).

1.9.1 Adyuvantes inmunológicos moleculares.

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α): Corresponde a una citoquina proinflamatoria secretada por macrófagos/monocitos, linfocitos y las células NK. Durante una infección bacteriana, viral o parasitaria, el TNF-α tiene una acción inmunomoduladora permitiendo la resistencia del individuo contra el patógeno. Es así, como se ha observado que, en infecciones experimentales de animales con leishmaniosis, la insuficiencia de TNF-α ha estado asociada a la progresión de la enfermedad y a la posterior muerte del individuo. TNF-α despliega su acción a través de dos receptores localizados en la superficie de las células objetivo, TNFR1 y TNFR2, los que pueden ser proteolizados para encontrarse de forma soluble. Cuando TNF-α se une al receptor TNFR1 se activan las principales vías de señalización relacionadas a su actividad biológica en la muerte y sobrevivencia celular, en contraste con su unión a TNFR2 donde predominan las vías que señalizan para la sobrevivencia celular(180). Durante la infección con *M. bovis* TNF-α es producido por los macrófagos infectados, el cual en

combinación con IFN-γ promueven la activación de otras células del sistema inmune para inducir la expresión de moléculas bactericidas tales como el óxido nítrico y metabolitos de nitrógeno. Además, el TNF-α participa activamente en la formación del granuloma durante la tuberculosis bovina, a través del reclutamiento de células fagocíticas capaces de ingerir a la micobacteria y mediar la posterior apoptosis de estas células en el sitio de infección. Sin embargo, se ha evidenciado que en la mayoría de los casos de infección con *M.bovis* la expresión del receptor TNFR1 en la superficie de los macrófagos y linfocitos T es reducida lo cual interfiere en el correcto mecanismo de acción del TNF-α contra el patógeno(181).

Existen distintos trabajos de investigación que han demostrado la capacidad del TNF-α de coadyuvar y mejorar la respuesta inmune otorgada por vacunas recombinantes contra diversas patologías, debido a que tiene un rol modulador en la respuesta inmune adaptativa, en la estimulación de células dendríticas (CDs), de células B y linfocitos T(182). Por ejemplo, un estudio utilizó una variante mutada de TNF-α (mTNF-K90R) como adyuvante molecular de una vacuna recombinante de baculovirus que expresa la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la influenza para realizar la inmunización vía intranasal de ratones. Este trabajo demostró que la administración conjunta de mTNF-K90R con el antígeno HA en ratones, indujo una potente respuesta humoral en el sitio de infección caracterizada por una mayor producción de IgG e IgA anti-HA en el suero y saliva, en comparación con aquellos ratones que fueron inmunizados solo con HA. Estos resultados comprobaron que mTNFK90R administrado intranasal es un adyuvante eficaz que marca precedentes en el uso de nuevas estrategias de vacunación contra infecciones virales(183). Otro estudio evaluó el potencial de un TNF-α producido por vía recombinante, utilizado como adyuvante molecular en una vacuna de ADN contra el virus de la fiebre aftosa en modelo de ratones. Este estudio demostró que el TNF-α mejoró considerablemente la respuesta

inmune humoral y celular inducida por la formulación vacunal conformada por el plásmido pcD-VP1 que codifica la proteína FMDV VP1 del virus de la fiebre aftosa. Es así como se observó que la co-inmunización de ratones con pcD-VP1 más el TNF-α recombinante indujo la producción de un mayor nivel de anticuerpos tipo IgG y mayor ratio de IgG2a/IgG1. TNF-α estimuló una mayor proliferación de linfocitos T citotóxicos y mayor producción de IFN-γ por parte de los linfocitos $TCD4^+$ y $TCD8^+$. Esta respuesta celular potenciada por la acción del adyuvante permitió inhibir la replicación del virus al interior de las células infectadas. En este trabajo también se demostró que el uso de TNF-α potencia significativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias y de moléculas MHC II en células dendríticas (CDs), favoreciendo la maduración de las CDs, la presentación antigénica, y por lo mediando la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa(184).

Interferón alfa (IFN-α): Corresponde a un grupo de citoquinas pertenecientes a la superfamilia de los interferones tipo I (IFN**-**α; IFN-β; IFN-ε, IFN-κ, y IFN-ω)**.** Existen múltiples subtipos de interferón alfa (IFN- α1; IFN- α2: IFN- α4; IFN- α5; IFN- α6; IFN- α7; IFN- α8; IFN- α10; IFN- α13; IFN- α16; IFN- α17 y IFN- α21). Todos estos subtipos de interferón alfa tienen estructuras muy similares, pues sus secuencias proteicas son altamente conservadas entre sí. Además, todas se unen al mismo receptor (IFNAR), pero con distinta afinidad. En general, todos los subtipos de IFN alfa son secretados por leucocitos principalmente durante infecciones virales cumpliendo un rol antiviral. Sin embargo, también desempeñan actividad anti proliferativa, antitumorales e inmunomoduladora. Estos tipos de interferón ejercen su acción sobre otras células a través de la unión a su receptor IFNAR activando las vías de señalización JAK y STAT las que posteriormente permitirán la transcripción de diversos genes. Los genes transcritos cumplirán la función de: ***i)*** inhibir la replicación viral reduciendo la carga infecciosa, ***ii)*** mejorar la respuesta inmune innata y adaptativa a través de

la activación de las células NK, ***iii)*** regulación de proteínas que participan de la presentación antigénica, ***iv)*** maduración de las CDs, y ***v)*** el aumento en la proliferación de los linfocitos $TCD8^{+}$ citotóxicos y de células B.

Particularmente, el IFN-α2 ha sido descrito como uno de los que tiene mayor actividad antiviral dentro de su grupo, es un potente inductor de quimiocinas tales como, CCL8 y CXCL10 y de la migración de linfocitos T en diferentes infecciones. Además, es un fuerte inductor de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en células dendríticas y posee una alta actividad inmunomoduladora. Debido, a las características principales de este subtipo de interferón alfa, es que, actualmente se produce por vía recombinante y es utilizado como biofármaco para el tratamiento de diversas enfermedades. Por otro lado, se ha comprobado que, la administración exógena o la inducción endógena de esta molécula mejora la respuesta inmune inducida por vacunas(185,186).

En un estudio donde se evaluó la eficacia de un candidato vacunal (E2his-LC) contra el virus de la peste porcina clásica, se utilizó IFN-α2 recombinante como adyuvante. Es así, como a través de un ensayo de inmunización con la formulación E2his-LC/Montanide 888/ rIFN- α2 y un ensayo de desafío en cerdos se estudió la capacidad de esta citoquina de potenciar los mecanismos inmunológicos humorales y celulares inducidos por la vacuna. Los resultados de esta investigación sugirieron que la coadministración del rIFN- α2 con el candidato vacunal induce protección en los cerdos desafiados con el virus(186).

1.10 Vacunas contra Tuberculosis bovina

Actualmente a nivel mundial no existen vacunas licenciadas por la OIE contra la tuberculosis bovina. En el caso de la tuberculosis humana se emplea la vacuna Bacillus Calmette-Guérin o BCG, correspondiente a una vacuna viva atenuada de *M. bovis* la cual está autorizada por la OMS y forma parte de los programas de vacunación obligatorios de muchos países del mundo. A pesar de que ambas patologías están estrechamente relacionadas debido a la alta homología de sus

agentes etiológicos y a la similitud de ambos cuadros clínicos, existe restricción en el uso de BCG y de otras vacunas en el ganado bovino. Estas restricciones radican en la falta de protección contra las diferentes formas de presentación de la bTB y a la respuesta cruzada o interferencia que genera la BCG con el diagnóstico *in vivo* de los animales, impidiendo diferenciar entre individuos expuestos a cepas virulentas de *M. bovis* de aquellos que han sido inmunizados **(14,** (187). Debido a que la bTB es una enfermedad que afecta duramente a la industria ganadera mundial y a la salud pública, ha surgido un gran interés el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales que no posean restricciones en su uso y que formen parte de los distintos programas de Control y erradicación de la enfermedad(188–190).

En los últimos 15 años se ha comenzado a trabajar en tres nuevas estrategias de vacunación contra tuberculosis bovina: ***i)*** vacunas atenuadas basadas en la cepa BCG genéticamente modificada, ***ii)*** vacunas de ADN que codifican para antígenos de *M. bovis*, y ***iii)*** nuevos esquemas de inmunización que contemplan una primera vacunación con la cepa BCG original y una reestimulación con antígenos proteicos de *M. bovis*. Muchos de estos esquemas de vacunación ya han sido testeados en bovinos, induciendo protección de forma variable en los animales(190–192)**.**

La modificación genética de BCG ha contemplado estrategias como la sobreexpresión de antígenos de *M. bovis* en la superficie de BCG, como la proteína Ag85B. Esta alternativa vacunal redujo el grado de lesiones a nivel pulmonar en los animales después a un desafío con *M. bovis*, a diferencia de aquellos individuos inmunizados con la cepa original de BCG(193). Adicionalmente, se ha evaluado una cepa de BCG a la cual se le eliminó el gen *zmp1* el cual está asociado a inhibir la fusión fagolisosoma. Este candidato indujo una respuesta de linfocitos T superior a la observada con la BCG normal(194). También se han empleado cepas atenuadas de BCG a las cuales se les eliminó

el gen que regula la producción de leucina ΔleuD (axótrofa para leucina), en ensayos de inmunización en terneros, evidenciándose menos lesiones durante la inspección histopatológica y una reducida carga bacteriana, en comparación con animales que no fueron tratados con la cepa no modificada de BCG(195). Por otro lado, se ha demostrado que cepas de BCG atenuadas mediante radiación UV otorgan protección en terneros contra un desafío con *M. bovis* y previamente sensibilidados con micobacterias ambientales, dónde BCG no fue efectiva(196).

También se han desarrollado y evaluado vacunas de ADN contra tuberculosis bovina. Una de ellas corresponde a una vacuna que contiene ADN codificante para el antígeno ESAT-6, la cual fue administrada en conjunto con los adyuvantes moleculares CD80 y CD86, otorgando una mejor protección en animales desafiados con aerosoles *M. bovis*, en comparación a los animales que no recibieron las moléculas co-estimuladoras(197). Además, terneros inmunizados con vacunas de ADN que codifican para proteínas expresadas en la etapa de latencia de la micobacteria (Hsp65 y Hsp70) o la fase inicial de la enfermedad (ESAT-6 y CFP-10), y reestimulados con BCG antes de ser desafiados con *M. bovis* virulento, evidenciaron altos niveles de IFN-γ y menor grado de lesiones en linfonodos y pulmones, en comparación con aquellos animales que solo fueron vacunados con BCG(197,198).

Vacunas de proteínas ensayadas en bovinos las cuales han sido utilizadas en combinación con BCG demostraron otorgar protección efectiva contra la enfermedad(199,200).

1.10.1 Parámetros inmunológicos que debe inducir una vacuna protectora contra Tuberculosis bovina

Los problemas que hoy existen en torno al desarrollo y uso de vacunas en el ganado contra bTB se deben principalmente a: ***i)*** BCG y algunas de las nuevas formulaciones han demostrado ser protectora contra la enfermedad en ciertos

animales, sin embargo, en otros la protección ha sido baja o nula obteniéndose resultados variables entre los individuos ensayados, y ***ii)*** la respuesta cruzada con el diagnóstico de tuberculina impidiendo diferenciar entre animales vacunados y enfermos(8,201,202). Debido a lo anterior, la vacuna ideal contra *M. bovis* debe ser capaz no solo de prevenir la transmisión de la enfermedad a otros bovinos, sino que también de evitar el establecimiento de la infección, y además no debe interferir con la prueba de tuberculina.

Para determinar la eficacia de una vacuna contra bTB ha sido necesario establecer una serie de marcadores inmunológicos (parámetros o mecanismos) predictores y correlativos de la respuesta protectora que otorga la formulación. Gracias a diversos estudios realizados en tuberculosis bovina y humana se han logrado definir marcadores esenciales en la protección de los animales contra cepas virulentas de la micobacteria. Es así como una vacuna protectora contra *M. bovis* debe dirigir respuestas específicas hacia las células dendríticas y macrófagos de manera de estimular una respuesta innata apropiada y una respuesta adaptativa temprana mediada por linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ contra el patógeno, los cuales deben tener actividad efectora capaz de matar a células infectadas con la micobacteria(201). La respuesta adaptativa mediada por los linfocitos $TCD4^+$ debe ser del tipo Th1, caracterizada por la expresión de citoquinas proinflamatorias como IFN-γ, TNF-α e IL-2. La vacuna debe ser capaz de inducir la producción de altos niveles de IFN-γ por linfocitos T de memoria y linfocitos T efectores frente a una reinfección o a la reactivación de la enfermedad. Estos se pueden determinar a nivel experimental mediante un ensayo de ELISPOT, donde se mide el número de células T de memoria secretoras de IFN-γ, las cuales son inducidas en cultivos estimulados con antígenos específicos de *M. bovis*(203,204). Otro parámetro que debe estimular una vacuna eficaz contra *M. bovis* es la producción de células T polifuncionales (expresan en su superficie marcadores $CD44^{hi}$, $CD45RO^+$, $CD62L^{lo}$) con

capacidad de co-secretar las citoquinas IFN-γ, TNF-α e IL-2(192). Por otra parte, se ha demostrado también que durante la respuesta inmune protectora contra bTB se desarrolla una respuesta tipo Th17, coordinada por las IL-17, IL-21 e IL-22, la cual ha demostrado ser específica contra algunos antígenos de *M. bovis* (ej: Ag85) y se correlaciona negativamente con el desarrollo de la patología y positivamente con la protección frente a la enfermedad. Por último, los parámetros que tienen relación con el desarrollo de la patología, tales como la colonización bacteriana y el nivel de lesiones en linfonodos, tejidos y órganos durante el hallazgo *post-mortem* deben también estar reducidas gracias a la administración de la vacuna con capacidad protectora(205).

1.11 Diagnóstico de Tuberculosis bovina

Debido a que la tuberculosis bovina corresponde a una enfermedad de presentación subclínica, es decir, la mayoría de los animales no presentan sintomatología visible sino hasta etapas avanzadas de la enfermedad, el diagnóstico rutinario se realiza principalmente a través de técnicas de laboratorio que permiten identificar al microrganismo, medir respuesta de anticuerpos o inmunidad celular, y a la prueba de campo de hipersensibilidad retardada conocida como tuberculina.

1.11.1 Diagnóstico de laboratorio

Baciloscopia: Permite visualizar en el microscopio la presencia de *M. bovis* a partir de una muestra obtenidas por histopatología. Para realizarla se pueden utilizar dos tipos de tinciones: ***i)*** **Tinción de Ziehl-Neelsen** que consiste en teñir la muestra con un colorante básico conocido como fucsina en donde la micobacteria se teñirá de rojo y posteriormente se adiciona un ácido (alcohol clorhídrico) para decolorar, sin embargo, el microrganismo no cambiará de color(206,207). Todo esto se realiza sobre un fondo de contraste que usualmente es azul de metileno y luego se observa en el microscopio. ***ii)*** **Tinción con fluorocromos**, el cual consiste en teñir la muestra con el colorante auramina-

rodamina donde la bacteria emitirá una luz fluorescente y posteriormente se adiciona alcohol clorhídrico, el cual no interferirá en el color fluorescente del microrganismo. Finalmente, la muestra se observa bajo un microscopio de fluorescencia(208,209).

Cultivo bacteriológico: Permite aislar a *M. bovis* desde muestras de leche, secreción nasal, etc., a través de medios de cultivos enriquecidos. Las muestras son sometidas a una fase de descontaminación que permite también homogenizar y concentrar la muestra (proceso de DHC) utilizando N-acetil-cisteína-hidróxido sódico (NALC-NaOH) para eliminar bacterias contaminantes, luego la muestra es concentrada mediante rondas de centrifugación y cultivada a 37ºC durante aproximadamente 8 semanas en medios en base a agar enriquecidos con sangre como por Middlebrook 7H10 y 7H11 o en base a huevo enriquecidos con piruvato Stonebrink y Löwenstein – Jensen(210). Dependiendo del medio utilizado, la detección de la bacteria se realiza por visualización macroscópica cuando se cultiva en medio líquido o a través del microscopio cuando la micobacteria es cultivada en agar. A los crecimientos sospechosos se les realizan pruebas bioquímicas tales como producción de niacina, prueba de catalasa y nitrato para la confirmación(211).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Permite la identificación de *M. bovis* a partir de diversos tipos de muestras que pueden incluir secreciones como leche, esputo, saliva y tejidos como pulmón y linfonodos, entre otros(212). Hoy en día existen diversas variaciones de la técnica de PCR para la identificación de micobacterias siendo las más utilizadas aquellas que se basan en la detección de regiones hipervariables las cuales son características de cada especie(196). Para realizar el PCR primero las muestras deben ser sometidas a procesos de descontaminación (DHC) y luego ser cultivadas en medios enriquecidos. El ADN de estas muestras puede ser aislado mediante la utilización de kits comerciales o a través de métodos tradicionales como phenol-cloroformo(213). Luego el ADN

aislado es sometido a la reacción de PCR, utilizando partidores para amplificar la subunidad ribosómica 16S, regiones intergénica 16S-23S RNA, regiones que codifican para proteínas específicas como MPB70 y regiones de inserción como IS6110(214).

Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): El ensayo ELISA de IDEXX, corresponde a la actual prueba de oro en la detección de anticuerpos contra *M. bovis*. Este ensayo incluye antígenos específicos de *M. bovis (*MPB70 y MPB83) y permite identificar a animales en estadios avanzados de la enfermedad (aproximadamente a los 4 meses post-infectcción). Se ha descrito que la sensibilidad de esta prueba es del 63% y su especificidad del 98%. ELISA IDEXX se utiliza como método complementario a la prueba de campo o tuberculina en los programas de control y erradicación implementados en diversos países del mundo, para realizar la confirmación de animales reactores, y también identificar a aquellos individuos que no fueron detectados mediante la prueba de campo.

Ensayo de Interferón Gamma (IGRA): El kit comercial BOVIGAM de Prionics, corresponde a la prueba de liberación de IFN-γ más utilizado en el diagnóstico de tuberculosis bovina. En un formato de ELISA, este ensayo permite detectar la producción de IFN-γ en linfocitos T de sangre reestimuladas con los preparados proteicos utilizados en la prueba de tuberculina simple (PPD bovino o bPPD) y comparada (PPD aviar o aPPD)(212). Animales infectados con *M. bovis* pueden ser detectados tempranamente (aprox. 2 semanas post-infeccción). Este ensayo es un correlativo de la respuesta celular (CMI) inducida en animales contagiados con *M. bovis* y es utilizado como prueba complementaria al diagnóstico obtenido mediante tuberculina. Se utiliza además como método de diagnóstico diferencial entre individuos positivos a tuberculosis bovina *(M. bovis)* y paratuberculosis *(M. avium. Sbsp. paratuberculosis)*(214).

1.11.2 Diagnóstico de Campo

Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH): La prueba de tuberculina corresponde al método estándar utilizado para el diagnóstico in vivo de tuberculosis bovina en animales(17). Esta prueba consiste en inocular de forma intradérmica un preparado proteico purificado o bPPD proveniente de M. bovis. En el sitio de inoculación se desarrolla una respuesta de hipersensibilidad retardada o tipo IV la cual corresponde a una respuesta celular mediada por citocinas y quimiocinas a través de las cuales ocurre el reclutamiento de células del sistema inmune previamente activadas por el contacto con la bacteria(212). Existen principalmente dos tipos de pruebas de tuberculina, la simple y la comparada. La prueba simple conocida como PAC o PCS consiste en la inoculación de bPPD en la zona de la base de la cola o en la zona de la tabla del cuello del animal. La comprada o PCC consiste en la inoculación de bPPD y aPPD en dos zonas equidistantes de la tabla del cuello del animal. Se administran ambos PPD para poder discriminar infecciones causada por M. bovis de aquellas generadas por micobacterias ambientales, tales como M. avium sbsp. paratuberculosis(215). Es decir, esta prueba de campo es utilizada también como método de diagnóstico diferencial entre tuberculosis bovina y paratuberculosis.

Los resultados de esta prueba son observados a las 72 hrs post-administración y son interpretados de acuerdo con el grosor de la lesión inflamatoria que se originó en el sitio de inyección mediante el uso de un pie de metro o cutímetro. Es así como se pueden obtener dos tipos de resultados: i) Animales negativos, cuando no se observa ni tampoco se palpa algún cambio en el sitio de la inoculación, ii) Animales reactores, cuando se visualiza y/o se palpa engrosamiento o edema, que puede ir acompañado de rubor, calor y dolor en el sitio de la inyección. Los resultados obtenidos en esta prueba son confirmados mediante técnicas de laboratorio(216).

El derivado de proteínas purificadas a partir de *M. bovis* (PPD) utilizado en la prueba de tuberculina se obtiene mediante un proceso de inactivación por calor de la cepa AN5, la cual es cultivada en medio enriquecido para posteriormente ser sometida a una esterilización por filtración y la concentración de las proteínas mediante ultrafiltración o precipitación con amonio. La cepa AN5 de *M. bovis* fue originalmente aislada en Inglaterra y hoy es la cepa estándar utilizada a nivel mundial para la preparación de la tuberculina bovina debido a su alto rendimiento en medios con glicerol(217). Con respecto a la composición del bPPD, no existen muchos estudios que describan la totalidad de las proteínas que lo conforman, sin embargo, existen algunos trabajos los cuales mediante espectrometría de masa han descubierto algunas de las proteínas que estarían en mayor abundancia(218). Dentro de ellas se describe la proteína tipo ESAT-6 EsxB, antígeno objetivo secretado tempranamente ESAT-6, proteína de secreción MPB70, chaperona GroES, proteína de superficie MPB83, proteína tipo ESAT-6 EsxL, proteína tipo ESAT-6-like EsxN, proteína hipotética MPB63 y proteína Alpha-crystallin (Acr)(201). Por otro lado, se ha determinado que la composición proteica del bPPD varía de acuerdo con el método utilizado en su preparación(4). Si bien existe una variedad de proteínas que se comparten entre las distintas preparaciones, también hay discrepancias en cuanto a la abundancia y presentación de algunas de ellas en los distintos PPDs. De esta manera, en estudios donde se han comparado PPDs provenientes de Brasil y Reino Unido (UK), los cuales han sido preparados por un lado mediante cultivo en medio Dorset y Henley, inactivación realizada con autoclave y precipitación de las proteínas a través de sulfato de amonio, mientras que, en la otra preparación la micobacteria fue cultivada en medio con glicerol, inactivada mediante calor a 95ºC y las proteínas precipitadas en 1% de ácido tricloroacético respectivamente, se demostró que algunas proteínas se encontraban en mayor abundancia en un bPPD en comparación al otro(4,219). En el bPPD de Brasil se obtuvo que las proteínas más abundantes fueron el factor de elongación EF-Tu (Rv0685) y la

proteína Rv0865 (Proteína de síntesis de molibdopterin Mog), mientras tanto en bPPD de UK la proteína EsxB (proteína tipo ESAT-6 Rv3874) y la chaperona de 10kDa (Rv3418c) fueron encontradas en mayor proporción. EF-Tu (Rv0685). Por su parte las proteínas DnaK (proteína de estrés térmico Rv0440), Mpt83 (Rv2873) y la proteína acyl-transportadora (Rv2244) fueron abundantes en ambas preparaciones. Este mismo estudio descubrió que algunas proteínas que estaban presente en el bPPD de Brasil no estaban en el bPPD UK(4).

1.12 Control y Prevención de Tuberculosis bovina

En diversos países de la Unión Europea, Norteamérica, Asia, y Oceanía donde la tuberculosis bovina está presente, se han puesto en marcha programas sanitarios para el control y erradicación de la enfermedad(220,221). Dentro de las principales medidas que contemplan estos programas está la detección de los animales enfermos a través de la prueba de tuberculina y su posterior confirmación mediante técnicas de laboratorio, y la eliminación (*Stamping out*) de los animales positivos desde los predios(209). Esto además se combina con vigilancia epidemiológica en plantas faenadoras, manejos de saneamiento en los planteles a través del uso de productos desinfectantes como glutaraldehidos o formaldehidos, restricción de movimiento de animales entre predios, y otros(212). Pese a que en muchos países desarrollados estos programas han sido exitosos y han permitido reducir e incluso erradicar la enfermedad en los animales domésticos, la presencia de reservorios silvestres de *M. bovis* advierte un latente riesgo de infección y posterior diseminación de la bacteria en los animales(220).

En Chile por su parte, la tuberculosis bovina se aborda mediante el programa de control y erradicación implementado por el SAG en el año 2011, cuyo eje principal es el diagnóstico de animales infectados mediante prueba de tuberculina, su eliminación, y control de su movimiento entre predios El diagnóstico al igual que en gran parte del mundo se realiza a través de la prueba de campo de tuberculina y la confirmación de animales positivos mediante PCR y cultivo bacteriano. Una

vez que se ha determinado el estatus sanitario de los predios, entra en marcha un plan de saneamiento donde se cuarentena los predios positivos, y los animales reaccionantes son beneficiados en mataderos autorizados por la entidad gubernamental. En virtud del programa de control y erradicación el territorio nacional fue dividido en dos zonas epidemiológicas de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad. La Zona de Control, que contempla desde la región del Bío-bio (exceptuando la provincia de Arauco) hasta la región de Arica y la Zona de Erradicación que integra desde la región de la Araucanía hasta la región de Magallanes. La zonificación del territorio nacional tiene el objetivo de erradicar la enfermedad para la Zona de Erradicación y disminuir la prevalencia predial de bTB en la Zona de Control(222).

Una importante estrategia en el control de la enfermedad es el uso de una vacuna efectiva que proteja a los animales de una infección con la bacteria, sin embargo, la vacunación del ganado con BCG o con cualquier otra vacuna está prohibida en Chile y en gran parte del mundo debido a su incompatibilidad con los programas de erradicación de bTB. Esto último se basa fundamentalmente en que se demostró que la vacuna BCG genera una respuesta cruzada con el diagnóstico realizado en bovinos mediante la prueba de tuberculina, por lo tanto, imposibilita diferenciar entre aquellos animales vacunados de aquellos infectados con una cepa virulenta de *M.bovis*. Esta interferencia entre BCG y las posibles vacunas contra bTB, radica en que tanto la preparación del bPPD como BCG comparten diferentes antígenos lo cual perjudica el nivel de especificidad otorgado por el diagnóstico. Por otro lado, hasta ahora no existe una vacuna que confiera completa protección contra la enfermedad. A pesar de que, en países como Nueva Zelandia, Reino Unido y Estados Unidos se realiza el diagnóstico y luego la eliminación de los animales positivos a bTB, la enfermedad persiste debido a los reservorios silvestres que continúan diseminando la bacteria(220). Debido a esto surge la necesidad de buscar estrategias alternativas como un

sistema de diagnóstico DIVA (*Differentiating infected from vaccinated animals*) o una vacuna que no interfiera con la prueba de diagnóstico de campo que se complementen con las medidas implementadas en los programas y permitan erradicar definitivamente la enfermedad. Estudios recientes han descrito diversas proteínas de *M. bovis* que no forman parte de la vacuna BCG debido a que la región que las codifica fue eliminada durante su proceso de atenuación. Por otro lado, se han realizado trabajos abocados a estudiar la composición del bPPD utilizado en la tuberculina, lo cual posibilitaría identificar diversas proteínas que pudiesen funcionar como antígenos para la construcción de una nueva vacuna contra bTB que no interfiera con el diagnóstico(223).

2 HIPÓTESIS

Los antígenos AcR, Rv2660c, Ag85b y ESAT-6 de *M. bovis,* producidos por vía recombinante y combinados con un adyuvante molecular en una formulación vacunal, inducen una respuesta inmune protectora en bovinos que no interfiere con la prueba de tuberculina.

3 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar una vacuna de subunidades recombinante contra *M. bovis*, con capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en bovinos, y que no interfiera con la prueba de tuberculina.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Diseñar, expresar y purificar antígenos de *M. bovis.***

Diseñar dos moléculas quiméricas que contienen los antígenos AcR y Rv2660c (qTbA-16MRA), y los antígenos Ag85b y ESAT-6 (qTbA-85ESAT).

- **Establecer el proceso de producción de los antígenos quiméricos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT en *E. coli.***

Implementar el proceso de purificación de los antígenos quiméricos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT.

- **Caracterizar la respuesta inmune inducida por la formulación basada en los antígenos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT en modelo caprino y bovino.**

Evaluar en modelo caprino la respuesta inmune serológica y nivel de interferencia con el diagnóstico de la tuberculina.

Evaluar en modelo bovino la respuesta inmune serológica y celular, y el nivel de interferencia con la prueba de tuberculina.

- **Evaluar la capacidad protectora de la formulación vacunal en modelo bovino.**

Realizar ensayo de desafío en bovinos con una cepa de *M. bovis* atenuada.

5 MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES UTILIZADOS

5.1.1 ANIMALES[1]

- Bovinos: terneros de la raza Holstein de 6 meses de edad obtenidos desde la empresa MANUKA, Chile.
- Caprinos: cabras criollas de 2 a 3 años obtenidas desde predio de la región del Ñuble, Chile.

5.1.2 ANTIBIÓTICOS DE USO EN CULTIVOS BACTERIANOS Y CELULARES

- Ampicilina (United States Biological, EE.UU): antibiótico betalactámico adicionado en los medios de cultivos a 100 µg/ml para la selección de bacterias que tienen el gen de resistencia a ampicilina.
- Cloranfenicol (Merck, Alemania): antibiótico del grupo de los anfenicoles adicionado en los medios de cultivos a 50 µg/ml para la selección de bacterias que tengas el gen de resistencia al cloranfenicol como *E.coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL.*
- Estreptomicina (United States Biological, EE.UU): antibiótico aminoglucósido adicionado en los medios de cultivos de células a 50 µg/ml para evitar el crecimiento de bacterias susceptibles a la estreptomicina que contaminen los cultivos.
- Neomicina (SIGMA, EE.UU): antibiótico aminoglucósido adicionado en los medios de cultivos de células a 50 µg/ml para evitar el crecimiento de bacterias susceptibles a la estreptomicina que contaminen los cultivos.

5.1.3 CEPAS BACTERIANAS

- *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* (Stratagene, EE.UU): cepa bacteriana de *E. coli* empleada para la expresión de proteínas heterólogas. Posee dentro

[1] ***Considerando que los animales son seres vivos sintientes se decidió mencionarlos en la sección de materiales utilizados en este trabajo con el único objetivo de mantener la organización del escrito.***

de su genoma el gen codificante para la T7 ARN polimerasa, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor lac inducible por IPTG.

5.1.4 KITS COMERCIALES

- Kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, EE.UU): kit utilizado para purificar ADN plasmidial a partir de cultivos bacterianos mediante mini columnas HiBind®.

- Kit Dneasy blood & amp; tissue kit (250), Rca, (Qiagen, EE.UU): kit utilizado para purificar ADN genómico a partir de diversas muestras de tejido, secreciones y bacterias mediante spin-column y lisis con proteinasa K.

- MILLIPLEX® Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1 (Merck, Alemania): kit utilizado para cuantificar de manera simultánea marcadores de citocinas y quimiocina en muestras de suero, plasma y cultivos celulares bovinos.

- Kit QuantiFast SYBR® Green (Merck, Alemania): kit utilizado para la amplificación de distintos genes de interés de manera rápida y más precisa.

- Kit de lisis CK14 (Bertín Technologies, EE.UU): kit utilizado para homogenizar muestras de tejido a través de perlas de circonio que disrumpen el tejido cuando son operadas en un equipo Precellys 24 Tissue Homogenizer.

5.1.5 MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

- *Luria Bertani* (LB): medio de cultivo para bacterias preparado en base a triptona (10 g/L); extracto de levadura (5 g/L); NaCl (10 g/L).
- Medio de Autoinducción (TBAI): medio de cultivo para bacterias preparado en base a triptona (12 g/L); extracto de levadura (24 g/L); (NH4)2SO4 (3.3

g/L); KH2PO4 (6.8 g/L); Na2HPO4 (8.9 g/L); glucosa (0.5 g/L); lactosa (2.1 g/L); MgSO4 (0.6 g/L).

- *Terrific broth* (TB): medio de cultivo para bacterias preparado en base a extracto de levadura (12 g/L); Triptona (24 g/L); KH2PO4 (0.17 M); K2HPO4 (0.72 M); glicerol (4 mL/L).

5.1.6 MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS

- RPMI: medio para cultivo de células eucarióticas preparado en base a RPMI 1640 (Thermo Fisher), 10% de SFB, bicarbonato sódico 2 g/L, glutamina 2mM, piruvato 1mM, neomicina 50µg/ml, pH 7.

5.1.7 PROTEÍNAS

5.1.7.1 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

- *BgIII (New England Biolabs, Reino Unido):* endonucleasa utilizada para digerir los vectores plasmídicos *pET AcR-Rv2660c* y *pETqAg85-ESAT6* cuyo sitio de corte es A/GATCT.
- *PvuII (New England Biolabs, Reino Unido):* endonucleasa utilizada para digerir los vectores plasmídicos *pETAcR-Rv2660c* y *pETqAg85-ESAT6* cuyo sitio de corte es CAG/CTG.

5.1.7.2 PROTEÍNAS COMERCIALES

- Tuberculina PPD bovina o bPPD (Drag pharma®, Chile): derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* cepa AN5 utilizado en la prueba de la tuberculina.
- Interferón alfa (Sigma-Aldrich, Alemania): interferón alfa 2b humano *European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard.*

5.1.8 ANTICUERPOS

- *Purified Anti-His* (Biolegend, EE.UU): anticuerpo IgG monoclonal producido en ratón que reconoce al tag de histidina incorporado en las secuencias quiméricas.

- *Anti-bovine* IgG (H+L) (Jackson Inmunoresearch, EE.UU): anticuerpo policlonal Anti-bovino hecho en cabra.
- *Anti-goat* IgG (H+L) (Jackson Inmunoresearch, EE.UU): anticuerpo Anti-cabra conjugado a Alexa fluor®790 y producido en burro.
- *Anti-bovine* IgG HRP (Bio-Rad, EE.UU): anticuerpo policlonal Anti-bovino hecho en conejo conjugado a la enzima peroxidasa del rábano picante.
- *Anti-bovine* CD44 (Bio-Rad, EE.UU): anticuerpo monoclonal Anti-CD44 bovino hecho en ratón conjugado a FITC.
- *Anti-bovine* CD4 (Bio-Rad, EE.UU): anticuerpo monoclonal Anti-CD4 bovino hecho en ratón.
- *Anti-bovine* CD8 (Bio-Rad, EE.UU): anticuerpo monoclonal Anti-CD8 bovino hecho en ratón.
- *Anti-mouse* Alexa fluor (Abcam, UK): anticuerpo Anti-mouse hecho en burro conjugado a Alexa fluor 647.

5.1.9 SECUENCIAS PARTIDORES

- MPB70-*Forward*
  CTC AAT CCG CAA GTA AAC CTG GTG

- MPB70-*Reverse*
  GTC AGC AGT GAC GAA TTG GTC TTG

5.1.10 SECUENCIAS PROTEICAS

Nombre Proteína	Gen Codificante	Secuencia aa	Tamaño kDa
Alpha- crystallin AcR	*Rv2031c*	MGWSDQRHPFPSIRRHQMATTLPV QRHPRSLFPEFSELFAAFPSFAGLR PTFDTRLMRLEDEMKEGRYEVRAEL PGVDPDKDVDIMVRDGQLTIKAERT EQKDFDGRSEFAYGSFVRTVSLPVG ADEDDIKATYDKGILTVSVAVSEGKP TEKHIQIRSTN	16

Proteína no caracterizada	*Rv2660c*	MRVARSARRAGLRVRAGAGLWTGR GARRASRRSSGHLSPPVTLNDRLQP FAEGERGGDQLRQLGCAGAACLGE FGGRDNSVIAGVDQALAATGQASQR AAGASGGVTVGVGVGTEQRNLSVV APSQFTFSSRSPDFVDETAGQSWC AILGLNQ	7.5
Mycolyltransferasas Ag85b	*Rv1886c*	MTDVSRKIRAWGRRLMIGTAAAVVL PGLVGLAGGAATAGAFSRPGLPVEY LQVPSPSMGRDIKVQFQSGGNNSP AVYLLDGLRAQDDYNGWDINTPAFW YYQSGLSIVMPVGGQSSFYSDWYS PACGKAGCQTYKWETFLTSKLPQW LSANRAVKPTGSAAIGLMAGSSAMIL AAYHPQ FIYAGSLSALLDPSQGMGP SLIGLAMGDAGGYKAADMWGPSSD PAWERNDPTQQIPKLVANNTRLWVY CGNGTPNELGGANIPAEFLENFVRS SNLKFQDAYNAAGGHNAVFNFPPN GTHSWEYWGAQLNAMKGDLQSS LGAG	30
6 kDa early secretory antigenic target ESAT6	*Rv3875*	MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSI HSLLDEGKQSLTKLAAAWGGSGSEA YQGAQQKWDATATELN NALQNLARTI SEAGQAMAST EGNVTGMFA	6

Tabla 1. Secuencias de proteínas de M. bovis obtenidas desde la base de datos del Centro Nacional de información biotecnológica o NCBI. Fuente: Elaboración propia.

5.1.11 SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE ADN

Soluciones :

- Tampón TAE 5x (Merck, Alemania)
- Tampón de carga ADN 6x (New England Biolabs)

Reactivos:

- Agarosa (Calbiochem, Inglaterra)

- Bromuro de etídio (Merck, Alemania Millipore)
- Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs)

5.1.12 SOLUCIONES Y REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES REDUCTORAS Y WESTERN BLOT

Soluciones:

- Acrilamida/bisacrilamida 30%/ 0.8% (Sigma, EE.UU)
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Calbiochem, Inglaterra)
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Calbiochem, Inglaterra)
- 20 % (p/v) SDS (Calbiochem, Inglaterra)
- Tampón de corrida: 25 mM Tris (Calbiochem, Inglaterra), 192 mM Glicina (Calbiochem, Inglaterra), 1% SDS (Calbiochem, Inglaterra)
- Tampón de carga proteína 4x reductor: 0.25 M Tris-HCl (Calbiochem, Inglaterra) pH 6.8, 4% SDS (Calbiochem, Inglaterra), 40% Glicerol (ISN Scientific Corporation), 0.4% Azul de bromofenol (Merck, Alemania), 1.2 M β-mercaptoetanol (Sigma, EE.UU)
- Solución de tinción: Azul de Coomassie 0.5 g/l (Merck, Alemania), Metanol 10 %, (TCL, Chile)
- Solución de destinción: 5 % Ácido acético (Merck, Alemania)
- Solución de bloqueo: leche descremada 50 g/L (Merck, Alemania), diluida en tampón PBS.
- Solución de Rojo Ponceau: Ponceau S 20 g/L (SIGMA, EE.UU); ácido tricloroacético (TCA) 300 g/L (SIGMA, EE.UU.), ácido sulfosalicílico 300 g/L (Merck, Alemania)

- Tampón de transferencia: 48 mM Tris base (Merck, Alemania), 39 mM Glicina (Calbiochem, Inglaterra), 20% Metanol (Merck, Alemania), 1.3 mM SDS (Merck, Alemania)

Reactivos:

- Patrón de peso molecular, Protein Ladder 10-180 kDa (MaestroGen, EE.UU)
- PSA (Calbiochem, Inglaterra)

5.1.13 SOLUCIONES, MEDIO DE CULTIVO Y REACTIVOS PARA CULTIVO DE CÉLULAS SUPERIORES.

- PBS: Tampón fosfato-salino, NaCl 8 g/L (Merck, Alemania), KCl 0.2 g/L (Merck, Alemania), Na2HPO4 1.09 g/L (Merck, Alemania), pH 7.2
- Medio de congelación: RPMI 50%, dimetilsulfóxido 10% (SIGMA, EE.UU), SFB 40%.
- Azul de Tripán: Colorante para el conteo de células, azul de tripán 5 g/L (SIGMA, EE.UU), NaCl 8.5 g/L (Merck, Alemania).
- Solución de lisis de eritrocitos: NH4Cl 0.8 g/ml, NaHCO3 bicarbonato de sodio 0.84 g/ml; EDTA 3.7 g/ml.

5.1.14 SOLUCIONES PARA EL DESARROLLO DE ENSAYOS ELISA

- Tampón de recubrimiento de placas de ELISA: Na2CO3 1. 52g/L; NaHCO3 2. 93g/L; pH 9.6
- Tampón de bloqueo: PBS, leche descremada al 3%.
- Tampón de lavado: PBS, Tween 0.1%.
- Soluciones de revelado: 5 µl H202, 5 mg OPD, 12.5 ml citrato trisódico; pH 4.5.
- Solución de detención: 2M H_2SO_4

5.1.15 SOLUCIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE LOS ANTÍGENOS QUIMÉRICOS

- Tampón de ruptura de la quimera *qTbA-16MRA*: TrisHCl 50mM; PMSF 0.3 mM; pH 8.86.
- Tampón de ruptura de la quimera *qTbA-85ESAT*: Fosfato 50 mM; PMSF 0.3 mM; pH 5.95.
- Tampón de lavado antígeno *qTbA-16MRA*: Tris 50mM; PMSF 0.3 mM; urea 1M; tween 20 al 0.2%; timerosal 50 µg/mL; pH 8.86.
- Tampón de lavado antígeno *qTbA-85ESAT*: Fosfato 50 mM; PMSF 0.3 mM, urea 1M, tween 20 al 0.2%, timerosal 50 µg/mL (Merck, Alemania).; pH 5.95.
- Tampón de resuspensión final de quimeras: PBS estéril (Na2PO4 3.6 g/L; KCl 0.2 g/L; KH2PO4 0.24 g/L; NaCl 8 g/L; pH 7.4), timerosal 50 µg/mL (Merck, Alemania).

- Soluciones Tinción Inversa:
  Imidazol: 0.2M de imidazol
  $ZnCl_2$: 0.3M de ZnCl2

5.1.16 VACUNAS COMERCIALES

- BCG (Serum Institute of India, India): vacuna viva atenuada de Mycobacterium bovis cepa *Bacillus Calmette-Guérin* Danish 1331 utilizada contra la tuberculosis humana causada por *Mycobacterium tuberculosis.*

5.1.17 VECTORES DE EXPRESIÓN

- pET-22b (+) (Novagen, EE.UU): vector de expresión bacteriano que contiene el promotor T7 de la enzima ARN polimerasa, sitio de clonamiento múltiple entre Nco I y Xho I, y una secuencia que codifica para un tag de histidina.

5.2 METODOLOGÍA GENERAL

5.2.1 TÉCNICAS PARA ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE ADN.

5.2.1.1 Purificación de ADN plasmídico.

El aislamiento de ADN plasmidial se realizó a partir de *E. coli* mediante el kit E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II (OMEGA Bio-tek) siguiendo las instrucciones de la empresa fabricante. Se inoculó dos colonias de la cepa *E. coli* top 10 transformada cada una con los plásmidos pET22b-Ag85-ESAT6 y pET22b-AcR-Rv2660c en un cultivo de 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina. Para esto los pellets bacterianos recuperados de los cultivos se resuspendieron en 250 µL de solución I con ARNasa, se dio vórtex durante 15 segundos para asegurar la resuspensión completa. Se adicionó 250 µL de solución II, los tubos se voltearon cuidadosamente 10 veces para homogenizar y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Luego, se adicionó la solución III, los tubos fueron volteados para mezclar hasta la formación de un flóculo blanquecino. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante el cual fue adicionado en HiBind® DNA Mini Column. Los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 1 minuto. Se adicionaron 500 µL de solución HBC a las columnas. Se repitió el paso de centrifugación con las mismas condiciones del anterior. Se eliminó el filtrado y se adicionó 700 µL de solución de lavado. Se volvió a centrifugar dos veces luego del lavado. Se transfirieron las columnas a tubos de colección de 1.5 mL limpios y luego se adicionó 25 µL de solución de elución. Se dejó en incubación durante 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó para recuperar el eluído que contiene el ADN plasmidial.

5.2.1.2 Purificación de ADN genómico.

Se utilizó el Kit Dneasy blood & amp; tissue kit (250), Rca, (Qiagen, EE.UU) para aislar ADN genómico desde la vacuna BCG Danish 1331 y para preparar una

curva estándar de cuantificación. Además, con el mismo kit se aisló ADN genómico a partir de las muestras de tejido linfoide previamente homogenizado obtenido de los terneros desafiados. A cada muestra de 250 µl se le adicionó 180 µl de buffer ATL y 20 µl de proteinasa K Se dio vórtex a las mezclas y se incubaron a 56°C por 20 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 10000 *g* durante 1 minuto, se les añadió 8 µl (20 mg/ml) de RNasa, se les dio vórtex, y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de incubación, se les adicionó la solución de lavado AL en una relación 1:1 y se mezcló con vórtex. Las mezclas se traspasaron a *DNeasy Mini Spin Columns* y se centrifugaron a 13000 g durante 1 minuto. Posteriormente, se les añadió 500 µl de buffer AW1 y se centrifugaron a 6000 *g* por 1 minuto. Después, se les agregó 500 µl de buffer AW2, y se centrifugaron a una mayor velocidad de 13000 *g* durante1 minuto. Se traspasaron los *DNeasy Mini Spin Columns* a nuevos tubos colectores*,* se les adicionó 50 µl de buffer AE y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron a 13000 *g* por 1 minuto y se recuperó el eluído que contiene el material genómico.

5.2.1.3 Preparación Curva Estándar de BCG.

Desde la base de datos del NCBI se obtuvo el tamaño del genoma de la cepa *M.bovis* BCG Danish 1330, el cual corresponde aproximadamente a 4.3 Mbp. Luego, se calculó la masa del genoma en pg utilizando la siguiente fórmula recomendada en el protocolo "*Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR*" de Applied Biosystems.

$$\boldsymbol{m = [n] \times \left[1.096e^{-21}\ \frac{g}{bp}\right] = 4.3\ pg}$$

Donde:

m = masa

n = tamaño del genoma (bp)

e-21 = x10-21

Posteriormente, la masa genómica obtenida se dividió por el número de copias del gen a detectar mediante qPCR, que en este caso fue el gen de la proteína MPB70 de *M. bovis*. De esta manera, 4.3 pg de ADN genómico de *M. bovis* contiene 1 copia del gen MPB70. Para calcular la masa del ADN genómico necesaria para obtener desde $1x10^0$ hasta $1x10^5$ copias se multiplicó el número de copias por la masa de genoma 4.3 pg. Por otra parte, luego se determinó la concentración final requerida para la obtención del número de copias a detectar del gen MPB70, por lo que se dividió por el volumen a adicionar en la reacción de qPCR, que fueron 5 µl.

Número de copias del gen MPB70	**x 4.3 pg**	**Masa de ADN genómico de *M. bovis* requerida (pg)**	**÷ 5 ul**	**Concentración final ($pg/\mu l$) de ADN genómico**
1		4.3		0.86
10		43		8.6
100		430		86
1000		4300		860
10000		43000		8600
100000		430000		86000

Tabla 2. Obtención de la concentración de ADN genómico requerido para la elaboración de la curva estándar. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, se realizaron diluciones seriadas del ADN genómico en un volumen de 100 µl utilizando la fórmula de volumetría:

$$c1 * v1 = c2 * v2$$

5.2.1.4 Preparación de bacterias *E.coli* quimiocompetentes y transformación por *shock térmico*.

Se creció un precultivo en medio LB de la cepa bacteriana a transformar durante 12 horas en agitación a 37°C. Se tomaron 3 ml del precultivo crecido y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado celular 2 veces con 100 µl de CaCl2 100 mM. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 100 µl de CaCl2 100 mM. Se adicionó el plásmido a transformar (5 - 20 ng) a la suspensión bacteriana y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se dio un golpe de calor a 42°C durante 2 minutos, y se volvió a incubar en hielo durante 10 minutos. Después, se adicionó lentamente 600 µl de medio LB sin antibiótico, y se incubó a 37°C durante 50 minutos. Se sembraron 100 µl de las bacterias transformadas en placas de agar LB suplementado con el antibiótico de selección. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 hora.

5.2.1.5 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción.

Para la digestión enzimática se utilizó como material de partida ADN plasmídico a una concentración final entre 50 y 100 ng/µl, y se emplearon enzimas de restricción a razón de 1 Ul por µg de ADN. Las soluciones tampón, la temperatura de reacción, así como otros requerimientos adicionales fueron específicos para cada tipo de enzima según las recomendaciones del fabricante. Para cada reacción se añadieron de forma secuencial el ADN, la solución tampón específica, el agua estéril hasta completar el volumen final de la reacción, y finalmente se agregó la enzima respectiva. Luego de 3 horas de incubación a 37°C, la digestión se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v).

5.2.2 TÉCNICAS PARA ANÁLISIS Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

5.2.2.1 Precipitación de proteínas.

Para cada muestra de proteína, se adicionó 0.1 volumen de deoxicolato de sodio 15 mg/ml, se dio vórtex a la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se adicionó 0,1 volúmenes de TCA 72 % y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1 volumen de acetona fría, y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al aire durante 30 segundos. Finalmente, el precipitado resultante se resuspendió en agua de biología molecular.

5.2.2.2 Electroforesis de proteínas en condiciones reductoras y denaturantes .

La electroforesis se realizó en una cámara vertical Mini Protean II (Bio-Rad, EE.UU) y el gel se preparó según se indica en la Tabla N°3. La muestra se mezcló en una proporción 4:1 con tampón de carga 4x, se calentaron a 100 °C por 5 minutos y posteriormente se cargaron en gel de poliacrilamida al 12%. La electroforesis se realizó en tampón de corrida, a 120 V dentro del gel concentrador, y 150 V una vez que el frente de corrida entró en el gel separador (fuente de poder para electroforesis Consort EV202). El revelado del gel se realizó con solución de tinción durante 30 minutos en agitación lenta. Posteriormente, los geles se destiñeron en solución de destinción durante toda la noche en agitación constante. El nivel de pureza de las muestras se determinó mediante densitometría óptica utilizando un escáner de imágenes ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences) y el programa ImageJ.

5.2.2.3 Inmunoidentificación mediante *Western blotting.*

La inmovilización de proteínas separadas mediante SDS-PAGE se realizó sobre una membrana de PDVF Immobilon-P (Merck Millipore, Alemania) en un equipo de transferencia semi seca (Bio-Rad, EE.UU) a 5.5 mA/cm2 durante 30

minutos en tampón de transferencia.

Se comprobó la efectividad de la transferencia de proteínas tiñendo la membrana con la solución de Rojo Ponceau durante 2-5 minutos. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % y posteriormente se lavaron 3 veces con TBS-T, durante 5 minutos. El tiempo de incubación para cada anticuerpo fue de 1.5 horas con agitación a 25°C. Las diluciones utilizadas variaron en dependencia de la calidad y especificidad de los anticuerpos. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T, durante10 minutos.

Reactivo	Gel separador 6%	Gel Concentrador 15%
H_2O	2.6 ml	1.4 ml
Acrilamida 30% / Bisacrilamida 1%	1 ml	3ml
0.5 M Tris-HCl pH6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8 /	-	1.5 ml
SDS 10%	50 µl	60µl
PSA 10%	50 µl	60 µl
Temed	10 µl	12 µl

Tabla 3. Protocolo para la preparación de gel de poliacrilamida al 15 %. Fuente: Elaboración propia.

Los anticuerpos primarios no conjugados se identificaron en un segundo paso con anticuerpos αIgG específicos, conjugados a una sonda fluorescente, incubando la membrana durante 1 hora en agitación a 25°C. Los lavados se repitieron 3 veces. El revelado de la membrana se realizó empleando el equipo Odyssey® CLx (LI-COR Bioscience, EE.UU).

5.2.2.4 Tinción Inversa de Proteínas.

Se prepararon 300 µl de cada quimera con Tampón reductor de proteínas 4x y se calentaron en una placa termo regulada a 100 °C durante 8 minutos. Luego, en un gel preparado con un solo carril se cargaron las muestras completas por separado y se corrieron en condiciones reductoras y denaturantes. Al finalizar la electroforesis el gel se desmontó y se lavó con agua destilada durante 15 minutos en un agitador orbital. Después, el gel se incubó por 15 minutos con solución 0.2 M de imidazol, se desechó el imidazol residual y el gel se volvió a incubar por 15 minutos con 0.3 M $ZnCl_2$. El gel fue observado sobre un fondo oscuro y se realizó la extracción de la banda correspondiente a la proteína de interés. Finalmente, las banda obtenida se lavó con tampón de corrida de proteínas para eliminar el $ZnCl_2$.

5.2.2.5 Electroelución de Proteínas.

La banda de la proteína extraída en el protocolo de tinción inversa fue dispuesta en una membrana de diálisis de 1kDa (*Dialysis tubing, benzoylated*, Sigma-Aldrich). Esta membrana fue previamente activada, incubándola durante 10 minutos en solución EDTA a 50 °C. Posteriormente, se adicionó a la membrana 5 ml de Tampón de corrida de proteínas y fue sellada con pinzas de diálisis. Luego, la membrana se dispuso en una cámara de ADN (Horizontal Electroforesis system, Bio-Rad) en sentido perpendicular, y la cámara se rellenó con 500 ml de Tampón de corrida de proteínas. Finalmente, la electroelución se corrió a voltaje constante de 100V durante 1 hora y 45 minutos a 4°C.

5.2.2.6 Detección de citocinas/quimiocinas en MILLIPLEX®

Se reconstituyó el concentrado de la curva estándar con 250 µl de agua destilada provista en el kit y se mezcló bien con vórtex durante 20 segundos. A partir de esta muestra concentrada, se realizaron seis diluciones seriadas de 1/4 también en agua destilada. Se añadió 200 µl de tampón de lavado en cada pocillo de la placa. Luego, se selló la placa y se mezcló en un agitador durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el tampón de lavado y se eliminó el residual de todos los pocillos invirtiendo la placa sobre toallas absorbentes varias veces. Se adicionó 25 µl de cada estándar o control en los pocillos correspondientes. El tampón de ensayo se usó como estándar de fondo de 0 pg. Posteriormente, se adicionó 25 µL de tampón de ensayo a los pocillos de las muestras, pocillos que contienen el estándar de fondo, curva estándar y controles. Se añadieron 25 µl de las muestras de cultivo diluidas 1/5 y 25 µl de las microesferas premezcladas en cada pocillo, la placa se selló y cubrió con papel de aluminio, y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación. Luego, se retiró el contenido de los pocillos cuidadosamente y se lavó la placa 3 veces. Se añadieron 25 µL de los anticuerpos de detección en cada pocillo, se selló la placa y se cubrió nuevamente con papel metálico para incubarla en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se adicionó 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo y se incubó la placa en las mismas condiciones anteriores, pero durante 30 minutos. Después, se agregó 150 µL de Sheath Fluid PLUS a todos los pocillos. Finalmente, la placa se leyó en Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D®, instrumento MAGPIX® con software xPONENT.

5.2.3 TÉCNICAS PARA CULTIVO DE CÉLULAS

5.2.3.1 Aislamiento de PBMC.

Bajo un flujo laminar, muestras de sangre de 25 ml colectadas con EDTA fueron diluidas en relación 1:2 con PBS estéril y centrifugadas a 1000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó 35 ml de solución de lisis de eritrocitos con la que se resuspendió el pellet evitando

formar burbujas. Luego, se incubó el pellet con la solución de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Después, se eliminó el sobrenadante que contenía a los eritrocitos y las PBMCs se lavaron 3 veces con tampón PBS.

5.2.3.2 Congelación.

El medio de congelación fue previamente refrigerado para mantenerlo a temperatura entre los 2-4 °C. Las células se resuspendieron en el medio de congelación frío a una concentración de $3x10^6$ células/ml. La suspensión celular se dispensó en criotubos (Nalgene, EE.UU), los cuales se incubaron a -20 ºC durante 3 horas, para luego pasarlas a -80 ºC y finalmente almacenarlas en un tanque de nitrógeno líquido.

5.2.3.3 Descongelación.

El proceso se realizó de forma rápida, descongelando el ámpula que contenía las células en un baño a 37°C. El contenido se llevó a un tubo de 15 ml y se le adicionaron 5 ml de medio RPMI, se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado celular se resuspendió en medio RPMI suplementado con suero. Las células se sembraron placas de cultivo de 100 mm (Costar, EE.UU) y se incubaron a 37°C, en presencia de CO2 al 5% y con una humedad relativa (HR) del 95%.

5.2.3.4 Conteo de células.

Se preparó una dilución 1:2 de la suspensión celular a analizar en solución de azul de tripán. Se aplicó en la cámara de Neubauer una cantidad suficiente para cubrir la superficie cuadriculada de la misma, y se contaron sólo las células negativas al azul de tripán situadas en los 4 cuadrantes de la cámara, mediante observación al microscopio óptico. La concentración de células se obtuvo a partir de la siguiente formula:

$$\frac{Células}{mL} = \frac{(N° \, Celulas \, \times dilución \, \times 10'000)}{4}$$

5.2.4 PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS QUIMÉRICOS *qTBA-16MRA* Y *qTBA-85ESAT*

5.2.4.1 Diseño y clonamiento de los genes que codifican para los antígenos quiméricos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*.

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las proteínas AcR, Rv2660c, Ag85b y ESAT6 de *Mycobacterium bovis* desde la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI. A partir de estas secuencias, se diseñaron dos moléculas quiméricas denominadas *qTbA-16MRA* (AcR y Rv2660c) y *qTbA-85ESAT* (Ag85b y ESAT6), cada una conformada por dos de las proteínas anteriormente mencionadas. En el extremo N-terminal de cada quimera se adicionó el antígeno AcR y Ag85b separándolo del segundo antígeno Rv2660c y ESAT6 respectivamente, mediante un tándem de cuatro secuencias espaciadoras SGGGG. En el extremo C-terminal de las quimeras se añadió otro espaciador SGGGG repetido dos veces y una secuencia de seis histidinas para facilitar el proceso de purificación e inmunodetección de ambas proteínas quiméricas. Posteriormente, se diseñaron los genes codificantes de las dos quimeras, utilizando una optimización de codones para la expresión en *E. coli*. Finalmente, las secuencias codificantes fueron sintetizadas y clonadas en dos vectores de expresión pET-22b(+) de Novagen, en los sitios de restricción flanqueados por las enzimas *Nde*I y *Xho*I. La síntesis y clonamiento de ambos genes lo realizó la empresa Genscript®.

5.2.4.2 Análisis de restricción de los plásmidos sintetizados.

Los plásmidos que contienen los genes codificantes para las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* se transformaron mediante *shock térmico* en la cepa TOP10 de *E. coli*, y luego las transformaciones se sembraron en placas de medio

LB sólido suplementado con ampicilina. A partir de las colonias aisladas obtenidas de cada transformación, se inocularon cultivos de 20 mL de medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/mL, y se crecieron a 37ºC durante 12 horas. Se aisló el ADN plasmídico de cada cepa transformada con los plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas utilizando el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega). Los plásmidos obtenidos fueron cuantificados en un equipo SPECTROstar NANO (BMG LABTECH, Alemania) y luego digeridos con las enzimas de restricción *Pvu*II y *BglI*I durante 3 horas a 37ºC. Las digestiones fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

5.2.4.3 Expresión de los antígenos quiméricos.

Los plásmidos que contenían los genes codificantes para las proteínas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT se transformaron mediante shock térmico en la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL de E. coli, y las transformaciones se sembraron en placas con agar LB suplementado con ampicilina. Luego, se inoculó una colonia de cada transformación en dos inóculos de 500 ml de medio TB con las cepas BL21/pET-Ag85bESAT6 y BL21/ pET-AcrRv2660c y se incubaron durante 12 horas a 37°C en agitación. Al día siguiente, se midió la DO600nm de los precultivos y se emplearon para inocular un biorreactor (Labfors 5, INFORS HT) que contenía 5 L de medio TBAI a una DO600nm inicial de 0.1. El proceso de autoinducción se realizó durante 12 horas a 37°C y en agitación a 500 rpm. Finalmente, se realizó la cosecha de las biomasas bacterianas utilizando una centrífuga SORVALL RC 6+, a 10000 rpm durante 5 minutos.

5.2.4.4 Ruptura celular y extracción de los cuerpos de inclusión.

Las biomasas bacterianas recuperadas de las fermentaciones de ambas proteínas quiméricas se resuspendieron en una relación de 100 g/L en Tampón de Ruptura específico para cada una. En ambos casos se aseguró que la solución utilizada tuviese un pH equivalente al punto isoeléctrico de cada quimera (8.86 para *qTbA-16MRA* y 5.95 para *qTbA-85ESAT*). Esto último se realizó con el

propósito de asegurar que ambas proteínas quedaran en la fracción insoluble después de la ruptura celular. Posteriormente, ambas suspensiones celulares se sometieron a 8 pases de ruptura en un molino de perlas (KDL A, Dyno-Mill). Las fracciones solubles e insolubles obtenidas a partir de la ruptura de cada biomasa se separaron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos. Luego, se evaluó la expresión de ambos antígenos mediante SDS-PAGE en poliacrilamida al 15% y *Western blot* utilizando el anticuerpo *Anti-histidina.*

5.2.4.5 Lavado de los cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión que contienen a las proteínas quiméricas qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT se sometieron a 3 rondas de lavados con el propósito de "semi-purificar" ambas fracciones para eliminar contaminantes y obtener un alto porcentaje de recuperación de cada proteína al final del proceso. Los lavados y también la resuspensión final de los cuerpos de inclusión se realizó bajo condiciones estériles en un flujo laminar. Además, todas las soluciones se esterilizaron mediante microfiltración en filtros de 0,2 µm. Cada ronda de lavado consistió en 3 pasos: *1)* resuspensión de los cuerpos de inclusión en su respectivo Tampón de Lavado, *2)* homogenización de los cuerpos de inclusión resuspendidos utilizando un equipo Ultra-Turrax T25, a 25000 rpm durante 5 minutos, y *3)* centrifugación de los cuerpos de inclusión homogenizados a 12000 rpm por 15 minutos. Por último, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en Tampón de resuspensión final.

5.2.4.6 Cuantificación y determinación del nivel de pureza de las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA* y qTbA-85ESAT.

Se realizó la cuantificación de los cuerpos de inclusión de cada quimera mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% utilizando una curva estándar de la proteína comercial hIFNα con concentración conocida. Se prepararon cinco diluciones seriadas en base 2 del hIFNα: 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml; 75 µg/ml, 150 µg/ml. Luego, se realizó una dilución del antígeno *qTbA-16MRA*: 1/15

y del *qTbA-85ESAT*: 1/8. A todas las diluciones preparadas se les adicionó Tampón Reductor de Proteínas y después las muestras se calentaron en una placa térmica a 100 °C durante 5 minutos. Se cargaron 15 µL de cada dilución de la curva y de los antígenos, y se realizó la electroforesis. Consiguientemente, el gel se tiñó en agitación con Solución de Tinción por 30 minutos y se destiñó con Solución de Destinción durante la noche. Finalmente, el gel se escaneó en un equipo ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences) y se realizó un análisis densitométrico utilizando el software ImageJ para la cuantificación y determinación del nivel de pureza de ambas proteínas en forma de cuerpos de inclusión.

5.2.4.7 Purificación de las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* mediante electroelución.

Los cuerpos de inclusión que contienen a las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* se separaron mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras y denaturantes. Posteriormente, los geles se tiñeron mediante Tinción Inversa y se extrajeron las bandas correspondientes a las proteínas quiméricas. Luego, las bandas extraídas que contienen a cada antígeno quimérico se electroeluyeron con Tampón de Corrida de Proteínas en una membrana de diálisis de 1 kDa (Sigma Aldrich, Alemania) la que fue previamente activada. La electroelución se realizó a 150 V durante 12 horas a 4ºC. Finalmente, el producto de cada electroelución se analizó mediante SDS-PAGE y *Western blot.*

5.2.5 EXPERIMENTOS EN MODELOS ANIMALES.

El uso y manipulación de animales de experimentación se realizó mediante la previa aprobación y según las estrictas normas de bienestar animal establecidas por el Comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

5.2.5.1 Ensayo de inmunización en caprinos.

5.2.5.1.1 Conformación de grupos experimentales y preparación de formulaciones vacunales.

Se utilizó un total de 20 cabras criollas, provenientes de predios certificados libres de tuberculosis bovina de la región del Nuble, con las cuales se conformaron cuatro grupos experimentales con cinco animales cada uno. Los grupos se organizaron al azar en corrales independientes, se les mantuvo con régimen de alimentación en base a forraje/concentrado, y de agua fresca ad libitum. De manera semanal, a cada animal se le realizó un examen clínico general con registro de parámetros fisiológicos básicos (temperatura rectal, FC, FR) y de signos patológicos aparentes.

Se prepararon cuatro formulaciones vacunales diferentes para inmunizar a los animales de cada grupo experimental. Para esto se utilizó un equipo Ultra-Turrax T25, con el que se homogeneizaron las emulsiones a una velocidad de 24000 rpm durante 30 minutos en hielo. Todas las formulaciones se prepararon en una relación de 60% fase acuosa (Tampón PBS con o sin antígenos) y 40% fase oleosa (adyuvante Montanide ISA 763 A VG). A cada animal se le administró 2 ml de la formulación correspondiente.

De acuerdo con la formulación que se administró a las cabras, los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera:

G1: Formulación Placebo (preparado con proteínas contaminantes de E. coli)

G2: Formulación DIVA (50 µg qTbA-16MRA/ 50 µg qTbA-85ESAT)

G3: Formulación DIVA IFNα (50 µg qTbA-16MRA / 50 µg qTbA-85ESAT/ 20 µg IFNα)

G4: Formulación DIVA TNFα (50 µg qTbA-16MRA / 50 µg qTbA-85ESAT/ 20 µg TNFα)

El esquema de inmunización empleado en los animales se describe en la figura 2 a continuación:

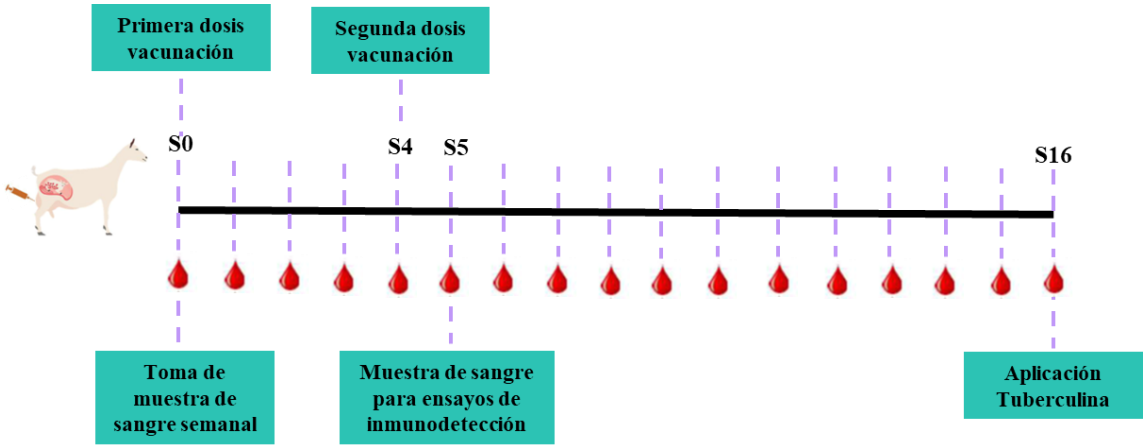


Figura 2. Esquema de inmunización en cabras. El ensayo de inmunización comenzó en la semana 0 donde a los grupos experimentales se les administró una dosis de la formulación correspondiente, por vía intramuscular en su miembro posterior izquierdo. En la semana 4 del experimento todos los animales recibieron un *booster* con la misma formulación. Aproximadamente, 3 meses después de la última vacunación (semana 16), se aplicó una prueba de tuberculina ano caudal a todos los grupos. Además, a cada cabra se le tomaron muestras de sangre en intervalos de 7 días desde el inicio hasta el término del ensayo. La colección de estas muestras se realizó con vacutainers con anticoagulante de heparina de litio, los que se centrifugaron en el laboratorio a 1000 rpm a temperatura ambiente para la obtención del plasma. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis mediante técnicas de inmunodetección (ELISA y *Western blot*). **Fuente: Elaboración propia.**

5.2.5.1.2 Evaluación de la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación en cabras.

La respuesta de anticuerpos generada por los animales inmunizados con las distintas formulaciones vacunales se evaluó mediante ELISA indirecto. Para esto, se utilizaron los plasmas obtenidos de las muestras de sangre colectadas entre la semana 0 y 5 del esquema de inmunización. A partir de ellas se estimaron los títulos de anticuerpos IgG totales inducidos por las formulaciones.

Con los antígenos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT solubilizados se recubrieron placas EIA/RIA de 96 pocillos (Corning®) con cada uno por separado a una concentración de 10 µg/ml en Tampón de Recubrimiento, y se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los pocillos recubiertos con los antígenos se bloquearon con 300 µL de Tampón de Bloqueo durante un tiempo de 2 horas a 37°C. A continuación, se adicionaron 100 µL/pocillo de los plasmas preparados en diluciones seriadas en base 5 en Tampón de Bloqueo y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, los pocillos se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 µL de un anticuerpo Anti-goat HRP preparado en una dilución 1/5000 en Tampón de Bloqueo. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 300 µL de Tampón de Lavado ELISA entre cada paso de incubación. Finalmente, los pocillos fueron revelados mediante la adición de 100 µL de sustrato OPD y se incubaron por 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de H2SO4 2.5 M y posteriormente las placas se leyeron en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Alemania) a una longitud de onda de 492 nm. Los títulos de anticuerpos por animal se definieron como la mayor dilución que cumpla con el criterio indicado en la siguiente formula:

$$[\boldsymbol{pDO_n} \geq \mathbf{2} \times \boldsymbol{pDO_i}]$$

Dónde:

pDO_n es el promedio de las densidades ópticas obtenidas de las muestras de plasma colectadas durante todo el ensayo de inmunización.

pDO_i es el promedio de las densidades ópticas obtenidas para las muestras de plasma colectadas en la semana 0 del ensayo de inmunización.

5.2.5.1.3 Evaluación de la interferencia de las formulaciones vacunales contra bPPD y la prueba de tuberculina.

En primer lugar, se evaluó si las formulaciones vacunales basadas en las quimeras qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT generaron anticuerpos que reconozcan a antígenos del bPPD aplicado en la prueba de tuberculina. Para esto, se separaron mediante SDS-PAGE el bPPD (100 µg/pocillo) y las proteínas (3 µg/pocillo).

Luego, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, y esta última se incubó durante 2 horas a 4°C con las muestras de plasma de la semana 0 y 5 del esquema de vacunación, preparadas en una dilución 1/200 en Tampón de Bloqueo. Culminado el tiempo de incubación, se adicionó el anticuerpo Anti-goat Alexa fluor 790 en dilución 1/5000 y se incubó por 1h a 4°C. Entre cada paso de incubación, las membranas se lavaron 3 veces en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó el revelado de las membranas en un equipo ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences). Además, se realizó también un Western blot sin muestras de plasma de ningún animal, con el propósito de verificar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos presentes en las muestras contra el bPPD y las quimeras. Por lo mismo, es que las membranas se incubaron con los anticuerpos goat Anti-bovino /Anti-goat Alexa 790 nm o solo con el secundario Anti-goat Alexa 790 nm.

Por otra parte, también se evaluó si la respuesta celular inducida por las formulaciones DIVA interfería o no con el diagnóstico de la tuberculina. Para ello,

se contó con la colaboración de un Médico Veterinario acreditado por el SAG, quien fue el responsable de realizar una prueba de tuberculina PAC a las cabras en la semana 16 del esquema de vacunación (Figura 2) y también de realizar la posterior lectura de la prueba. De forma específica, a cada animal se le inocularon 100 µl de bPPD de forma intradérmica en la zona del pliegue derecho de la base de la cola. Mediante inspección visual, se confirmó la correcta administración del bPPD con la aparición inmediata de una pequeña pápula en el sitio de inyección. Posteriormente, a las 72 horas después de la aplicación del bPPD, se procedió a realizar la lectura de la prueba utilizando un caliper digital que permite medir en milímetros el grosor de la región inoculada. La determinación de si un animal es reactor o no a la prueba de tuberculina se realizó comparando el grosor de la zona antes y después de la administración del bPPD:

$$\boldsymbol{Animal\ negativo} = \left[\boldsymbol{med_i} - \boldsymbol{med_f}\right] < \boldsymbol{3mm}$$

$$\boldsymbol{Animal\ reactor} = \left[\boldsymbol{med_i} - \boldsymbol{med_f}\right] \geq \boldsymbol{3mm}$$

Dónde:

med_i es el grosor de la piel previo a la inoculación del bPPD.

med_f es el grosor de la piel 72 horas posterior a la inoculación del bPPD.

Por lo tanto, si la diferencia entre cada medición fue menor a 3 mm el animal se considera negativo, y si fue mayor o igual a 3 mm se considera reactor.

5.2.5.2 Ensayo de inmunización y desafío en terneros.

5.2.5.2.1 Conformación de grupos experimentales y preparación de formulaciones vacunales.

Se conformaron 5 grupos experimentales, cada uno con 5 terneros de edad promedio entre 5 y 6 meses, provenientes de la empresa MANUKA de la región de Los Lagos. Los animales se organizaron al azar y se distribuyeron en corrales

independientes. De igual manera que en el ensayo en cabras, a todos los terneros se les realizó un seguimiento clínico con registro de parámetros fisiológicos y patológicos desde el inicio hasta el término del experimento. Para el ensayo de inmunización, se prepararon un total de cinco formulaciones vacunales (DIVA, DIVA IFNα, DIVA TNFα, Placebo y BCG). Para las tres primeras formulaciones se siguió el mismo protocolo implementado en el experimento con cabras. Se mantuvo una relación 60:40 de la fase acuosa y la fase oleosa, y a cada animal se le administró 2 ml. La quinta formulación se preparó en base a la vacuna comercial BCG diluida en Tampón PBS a una concentración final de 1x106 UFC/ml, de la cual se inoculó 0.5 ml por animal. A cada grupo se le administró una formulación en particular, por lo que los grupos establecidos fueron los siguientes:

***G1**: Formulación placebo (preparado con proteínas contaminantes de E. coli).*

***G2**: Formulación DIVA (100 µg qTbA-16MRA/ 100 µg qTbA-85ESAT).*

***G3**: Formulación DIVA IFNα (100 µg qTbA-16MRA/ 100 µg qTbA-85ESAT/ 20 µg IFNα).*

***G4**: Formulación DIVA TNFα (100 µg qTbA-16MRA/ 100 µg qTbA-85ESAT/ 20 µg TNFα).*

***G5**: Formulación BCG (5x10^5 UFC).*

El esquema de inmunización empleado en los terneros se describe en la figura 3 a continuación:

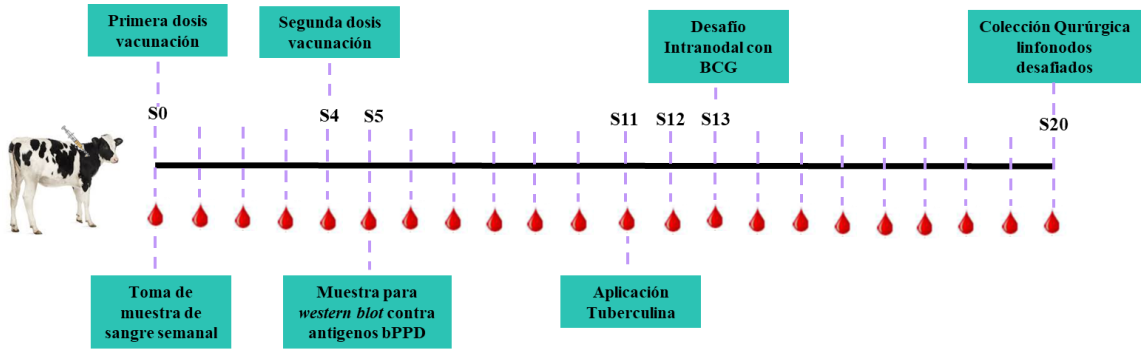


Figura 3. Esquema de inmunización y desafío en terneros. En la semana 0 del experimento se comenzó con la vacunación de todos los individuos. En los grupos Placebo y DIVAs se administraron 2 mL de las formulaciones por vía intramuscular en la zona de la tabla del cuello. Los animales del grupo BCG recibieron 0.5 mL de la formulación por vía subcutánea en la tabla cuello. En la semana 4 del esquema de inmunización, el grupo Placebo y todos los grupos DIVA recibieron un refuerzo con las mismas vacunas a igual dosis. No obstante, a los terneros del grupo BCG se les administró dosis única, sin revacunación. En la semana 11, a todos los individuos se les aplicó una prueba de tuberculina ano-caudal (PAC) con el propósito de evaluar interferencia de los antígenos quiméricos con el diagnóstico *in vivo* realizado en los animales. Por último, en la semana 13 los terneros se desafiaron intranodalmente con la misma cepa BCG utilizada en la inmunización, pero a dosis mayores, y a los dos meses posteriores se realizó la colección quirúrgica de los linfonodo retados. Cada 7 días se tomaron muestras de sangre para caracterización de la respuesta de anticuerpos inducida por las formulaciones vacunales. **Fuente: Elaboración propia.**

5.2.5.2.2 Preparación de BCG para desafío.

Se prepararon un total de 27 dosis de 0.5 ml de la vacuna BCG Danish 1331 para realizar el ensayo de desafío en terneros. Dos bulbos liofilizados de la vacuna BCG se resuspendieron bajo condiciones estériles en 1 ml de Tampón PBS, quedando a una concentración final de $1.5x10^9$ UFC/ml cada uno. Se juntaron los dos volúmenes de BCG reconstituidos (2 ml) y se diluyeron a un volumen final de 13.5 ml en Tampón PBS estéril. Finalmente, se prepararon dosis de 0.5 ml/animal, cada una con 2.2×10^8 UFC. Las formulaciones se mantuvieron a 4ºC hasta su administración en los animales.

5.2.5.2.3 Desafío intranodal en terneros.

El ensayo de reto de los terneros se realizó en la semana 13 del esquema de inmunización de los animales. Los terneros fueron derribados y contenidos en posición decúbito lateral derecho para localizar el linfonodo preescapular derecho, mediante palpación y con ayuda de un ecógrafo Mindray y transductor convexo de 3,5 MHz. Una vez localizado, con una jeringa de 2.5 ml y aguja de 23 G se instiló 0.5 ml del preparado de BCG (2.2×10^8 UFC) en el centro del linfonodo (figura 4). Los terneros no fueron anestesiados para realizar este procedimiento, por lo que, una vez realizado el procedimiento, estos fueron reincorporados y devueltos a sus respectivos corrales.

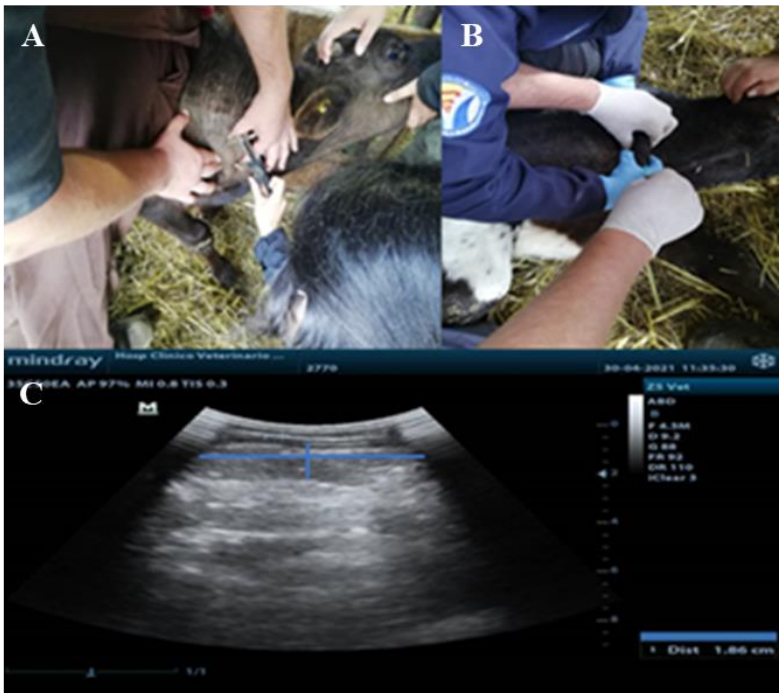


Figura 4. Imágenes del procedimiento del modelo de desafío. (A y B) Localización del linfonodo preescapular derecho mediante palpación y medición con un caliper digital. (C) Localización ecoguiada del linfonodo preescapular derecho para realizar la instilación de la cepa BCG directo en el centro del tejido. Cruz en azul demarca el largo y ancho del linfonodo preescapular, el que a la ecografía se distingue con baja y homogénea ecogenicidad propia de tejidos ganglionares normales. **Fuente: Elaboración propia.**

5.2.5.2.4 Colección quirúrgica de linfonodos desafiados.

Mediante un abordaje quirúrgico, en la semana 20 del ensayo de inmunización se realizó la extracción de los linfonodos preescapulares desafiados. Los animales fueron contenidos y derribados a través de la administración de Xilacina 2% (dosis de 0.1 mg/Kg de peso) y Ketamina 10% (dosis de 2.2 mg/kg de peso) por vía endovenosa en la vena yugular. Se obtuvo un plano anestésico grado II, el que se asoció con anestesia infiltrativa (10 ml de Vetacaina 2%) con alcance

subcutáneo e intramuscular en la zona del contorno del linfonodo preescapular derecho. Se esperó 5 minutos para que la anestesia lograra su efecto. A continuación, se realizó una incisión sobre la piel de la zona preescapular derecha siguiendo la línea de la fibra muscular. Se separaron las distintas capas cutáneas, fascias y músculo esternocleidomastoideo, para exponer de forma completa al linfonodo, eliminando tejido conectivo y grasa adherida a este. Luego, se buscaron los vasos sanguíneos (arteria y vena) que irrigan la zona para realizarles transfixión con sutura absorbible de monofilamento 2/0 y evitar alguna hemorragia durante el procedimiento. Una vez extraído el linfonodo, las capas musculares se cerraron con punto en X y candado de Ford. La piel se cerró con punto simple discontinuo utilizando sutura absorbible monofilamento Nº1 y grapado. Finalmente, a todos los terneros se les administró antibiótico oxitetraciclina en dosis de 20 mg/kg de peso y fenilbutazona 1 ml/27 kg.

5.2.5.2.5 Evaluación de la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación en bovinos.

La respuesta de anticuerpos IgG totales generada por los animales inmunizados con las formulaciones vacunales se evaluó mediante ELISA utilizando muestras de plasma sanguíneo obtenidas entre la semana 0 y 5 del esquema de inmunización. Con los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* solubilizados, se recubrieron placas EIA/RIA de 96 pocillos (Corning®) con ambas proteínas a una concentración de 10 µg/ml en Tampón de Recubrimiento, y se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, los pocillos se bloquearon con 300 µl de Tampón de bloqueo durante 2 horas a 37°C. Se prepararon pools con los plasmas de cada grupo experimental por separados y se les realizaron diluciones seriadas en base 4 en Tampón de Bloqueo. Se adicionaron 100 µl/ pocillo de cada dilución y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, los pocillos se incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 µl de un anticuerpo *Anti-bovino* HRP preparado en una dilución 1/10000 en Tampón de Bloqueo. Entre cada paso de incubación los pocillos se lavaron cuatro veces con 300 µl de Tampón de Lavado.

Finalmente, los pocillos se revelaron con 100 µl de sustrato OPD y se incubaron por 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de H_2SO_4 2.5 M y luego las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda 492 nm. El criterio para determinar los títulos de anticuerpos fue el mismo utilizado en los experimentos con cabras.

5.2.5.2.6 Evaluación de la interferencia de las formulaciones vacunales contra bPPD y la prueba de tuberculina.

Al igual que en los ensayos en cabras, en terneros también se evaluó si las formulaciones vacunales basadas en las quimeras qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT generaron anticuerpos que reconozcan a antígenos presentes en el bPPD. Para esto, mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida se cargaron 100 µg del bPPD y 5 µg de cada quimera. Luego, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa que se incubaron durante 2 horas a 4°C con Tampón de Bloqueo. Consiguientemente, las membranas se incubaron con muestras de plasma preparadas en una dilución 1/200 en Tampón de Bloqueo, las que se obtuvieron en la semana 0 y 5 del esquema de vacunación realizado en terneros. Culminado el tiempo de incubación, se adicionó el anticuerpo goat Anti-bovino en dilución 1/2000 y se incubó a 4°C por 2 horas. Después, se incubaron las membranas con el anticuerpo Anti-goat Alexa fluor 790 nm a una dilución de 1/5000 durante 1 hora a 4°C. Entre cada paso de incubación, las membranas se lavaron 3 veces en agitación, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó el revelado de las membranas en un equipo ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences).

Adicionalmente, se realizó una prueba de tuberculina a todos los terneros en la semana 11 del esquema de vacunación, con el objetivo de evaluar si la respuesta celular inducida por las formulaciones DIVA, interferían o no con el diagnóstico. La aplicación y posterior lectura de la prueba se realizó con la ayuda de un Médico Veterinario acreditado por el SAG. El procedimiento de administración de la tuberculina en terneros fue el mismo que se usó en cabras. Así, a cada animal

se le inoculó por vía intradérmica 0.1 ml del bPPD en la zona del pliegue derecho de la base de la cola. Posteriormente, a las 72 horas de aplicada la PAC se procedió a realizar la lectura de la prueba utilizando un caliper digital que permite medir en mm el grosor de la región inoculada. Se determinó si los animales fueron o no reactores a la tuberculina siguiendo el mismo criterio planteado en la fórmula descrita en el ensayo realizado en caprinos.

5.2.5.2.7 Evaluación de la respuesta celular inducida por la vacunación en terneros.

5.2.5.2.7.1 Detección de marcadores celulares mediante citometría de flujo.

Se aislaron PBMCs a partir de muestras de sangre colectadas con anticoagulante en la semana 5 del ensayo de inmunización realizado en terneros. Se sembraron placas con $5x10^5$ PBMC/pocillo en triplicados, y se estimularon durante 5 días a 37°C y 5% CO_2, con 10 µg de la mezcla de los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* purificados. Como control positivo de la estimulación se utilizó concanavalina A con concentración de 5 µg/ml. Terminado el tiempo de estimulación las células se recuperaron mediante un paso de centrifugación a 450 *g* durante 5 minutos. Las células se resuspendieron con BSA 3% y se marcaron con los anticuerpos mouse Anti-CD4 bovino y Anti-CD8 bovino en dilución 1/5 y 1/25, respectivamente durante 30 minutos a 4°C. Luego, a las mezclas se les añadió el anticuerpo secundario Alexa fluor 647 y se incubó durante 15 minutos a 4 °C. Transcurrida la incubación, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron con BSA 3%. Posteriormente, se añadió el anticuerpo Anti-CD44 bovino (FITC) preparado en una dilución de 1/500 y se incubó durante 15 minutos a 4°C. En cada paso de incubación con anticuerpos, los tubos se protegieron de la luz cubriéndolos con papel metálico. A las muestras se les realizó una resuspensión final con 1 ml de solución con BSA 1%. Finalmente, las muestras se analizaron en el equipo ATTUNE NxT Flow Cytometer donde primero se seleccionaron las poblaciones de linfocitos y las células individuales. Posteriormente, se seleccionaron los marcadores extracelulares Alexa fluor 647

y FITC con los que se tiñeron las células (figura 10). Los datos obtenidos desde la citometría se analizaron con el software FloJo V10.

5.2.5.2.7.2 Detección de citoquinas proinflamatorias mediante MILLIPLEX®.

Los medios de cultivos recuperados desde la estimulación de las PBMCs con los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* se utilizaron para detectar la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por la vacunación en terneros. Para esto, se utilizó el kit comercial MILLIPLEX® (*Bovine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 1*) con el que se identificaron las citoquinas IFNγ, TNFα, e IL-17A. Las muestras con los medios de cultivos se diluyeron 1/5 en medio RPMI para luego ser analizadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El ensayo se desarrolló de acuerdo con el protocolo establecido por la empresa fabricante del kit. Finalmente, las muestras se analizaron empleando el equipo MAGPIX® con el software xPONENT®.

5.2.5.2.8 Evaluación de la capacidad protectora de las formulaciones vacunales.

5.2.5.2.8.1 Cuantificación mediante qPCR de la carga bacteriana en linfonodos desafiados.

5.2.5.2.8.1.1 Preparación curva estándar.

Se preparó una curva estándar de cuantificación a partir del ADN genómico extraído de la vacuna BCG Danish 1331con el kit *Dneasy blood & amp; tissue kit (250), Rca,* (Qiagen). La curva se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por Applied Biosystems: "*Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR*".

5.2.5.2.8.1.2 Procesamiento del tejido linfoide y extracción de ADN total.

A partir de los linfonodos preescapulares desafiados con BCG de los terneros se desarrolló una PCR cuantitativa para evaluar la capacidad protectora inducida por la vacunación de los animales con las formulaciones que incluían a los antígenos *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT*. Los tejidos primero se diseccionaron

en fragmentos pequeños y se procesaron en condiciones estériles sumergiéndolos a razón de 1 mg/ml en Tampón PBS. Posteriormente, se realizó la homogenización de los tejidos utilizando el kit de lisis CK14 que incluye perlas de circonio de alta eficiencia. Para el proceso de homogenización se usó un equipo Precellys 24 Tissue Homogenizer el cual fue configurado para realizar 3 ciclos de ruptura de 20 segundos cada uno, a una velocidad de 6800 rpm. Una vez culminada la homogenización de todos los tejidos, se extrajo ADN total de todas las muestras con el kit *Dneasy blood & amp; tissue kit (250)*, Rca, (Qiagen). Finalmente, se cuantificó el ADN obtenido a partir de cada muestra de tejido en el equipo SYNERGY HTX, Multi Mode Reader, Biotek.

5.2.5.2.8.1.3 Ensayo de qPCR.

Se realizó una PCR cuantitativa con las muestras de ADN obtenidas a partir del procesamiento de los linfonodos desafiados con BCG y con la curva estándar preparada de la cepa BCG Danish 1331. El objetivo de este ensayo fue determinar el número de copias del gen MPB70 de M. bovis en cada muestra de tejido como indicador de protección. De este modo, con el kit QuantiFast SYBR® Green PCR y los partidores MPB70-Forward (CTC AAT CCG CAA GTA AAC CTG GTG) y MPB70-Reverse (GTC AGC AGT GAC GAA TTG GTC TTG) sintetizados por la empresa IDT se realizó el qPCR utilizando las siguientes condiciones:

Composición de la reacción	**Protocolo de la reacción**
Máster Mix: 1X (5 µl)	1) Hot Start: 95 ºC, 10 min
Partidores F+R: 10 µM (0.6 µl)	2) Denaturación: 95ºC, 15 seg
ADN: 50 ng	3) Alineamiento: 58ºC, 1 min
H_2O de biología molecular: 3.4 µl	4) Extensión: 72ºC, 30 seg
Volumen final: 10 µl	5) 30 repeticiones desde paso 2

Fuente: Elaboración propia.

5.2.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos en este trabajo de tesis doctoral se realizó mediante la versión para Windows del software GraphPad Prism V8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Se utilizó ANOVA de dos vías para comparar la respuesta de anticuerpos inducida por las formulaciones vacunales a diferentes tiempos de inmunización. Los resultados obtenidos en los ensayos in vitro (identificación de poblaciones celulares y la detección de citoquinas), se utilizó la prueba t-Student para muestras independientes y ANOVA de una vía para comparaciones múltiples. Los datos obtenidos en los experimentos para evaluar interferencia entre las formulaciones DIVA y la prueba de tuberculina se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher, mientras que los resultados de los ensayos de protección mediante ANOVA de una vía. Para todas las pruebas estadísticas utilizadas se utilizó un intervalo de confianza del 95%, por lo que, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. Por último, los gráficos presentados en este trabajo se construyeron con Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) y GraphPad Prism V8.0.1.

6 RESULTADOS

6.1 Secuencias génicas codificantes para las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT.*

A partir del diseño de las secuencias codificantes se obtuvieron dos quimeras, *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT*, cada una conformada por dos proteínas altamente inmunogénicas de *Mycobacterium bovis*, AcR-Rv2660c y Ag85b-ESAT6, respectivamente. Los antígenos que componen cada quimera se unieron a través de un espaciador conformado por residuos de serinas y glicinas. Además, al final de cada secuencia se observa una secuencia de seis histidinas que fue incorporado para facilitar su proceso de purificación (figura 5A y 6A). Como resultado del clonamiento de cada secuencia codificante en el sitio de restricción de las endonucleasas *Nde*I y *Xho*I del plásmido pET-22b(+), se obtuvieron dos vectores de expresión denominados *pET-AcRRv2669c* de 6419 bp y *pET-Ag85bESAT6* de 6737 bp (figura 5B y 6B).

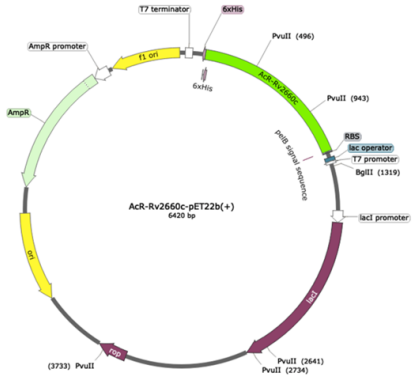
A ambos vectores se les realizó un chequeo de restricción con la finalidad de corroborar la identidad de las secuencias sintetizadas. Para esto, cada uno se digirió con las enzimas de restricción *Pvu*II y *Bgl*II y los productos de las digestiones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (figura 5C y 6C). El análisis predictivo de las bandas esperadas se realizó utilizando el software SnapGene. El resultado del análisis de restricción del vector *pET-AcRRv2660* con la enzima *Pvu*II arrojó cuatro bandas con tamaños aproximados de 3000, 1500, 1000 y 500 bp. La digestión de *pET-AcRRv2660* con *Bgl*II dio como resultado una banda de aproximadamente 6500 bp. Por otro lado, para el análisis de restricción de *pET-Ag85bESAT6* con la enzima *Pvu*II se obtuvieron tres bandas cercanas a los 3000, 2000 y 1000 bp. Por último, en la digestión de *pET-Ag85bESAT6* con *Bgl*II se observó una única banda con tamaño de alrededor de las 7000 bp. Es así como los chequeos de restricción realizados a los dos vectores permitieron identificar bandas con los tamaños

esperados concordantes con el diseño original de cada gen y según la simulación realizada con SnapGene.

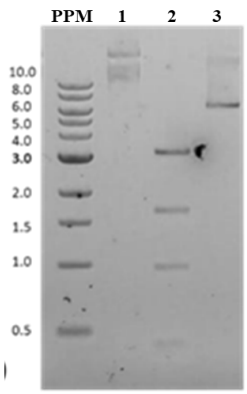
A

GWSDQRHPFP SIRRHQMATT LPVQRHPRSL FPEFSELFAA FPSFAGLRPT FDTRLMRLED EMKEGRYEVR AELPGVDPDK D
VDIMVRDGQ LTIKAERTEQ KDFDGRSEFA YGSFVRTVSL PVGADEDDIK ATYDKGILTV SVAVSEGKPT EKHIQIRSTN SG
GGGSGGGG SGGGGSGGGG MRVARSARRA GLRVRAGAGL WTGRGARRAS RRSSGHLSPP VTLNDRLQPF AEGERGGDQL RQL
GCAGAAC LGEFGGRDNS VIAGVDQALA ATGQASQRAA GASGGVTVGV GVGTEQRNLS VVAPSQFTFS SRSPDFVDET AGQS
WCAILG LNQSGGGGSG GGGHHHHHH

B



C



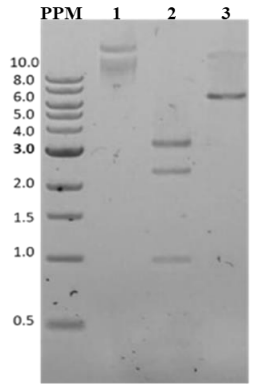
Muestra	Bandas esperadas
1) pET22b-AcRRv2660c	-
2) pET22b-AcRRV2660c PvuII	3183-1698-999-447-93 bp
3) pET22b-AcRRv2660c BglII	6420 bp

Figura 5. Diseño, clonamiento y chequeo de restricción de la quimera qTBA-16MRA. (A) Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica qTBA-16MRA diseñada. En color verde se destaca al antígeno Acr y en morado al antígeno Rv2660c. El color amarillo representa al espaciador añadido cuya función es conectar a ambas proteínas, darles libertad estérica, y exponer la secuencia de histidinas para facilitar su purificación a través de técnicas cromatográficas. (B) Vector de expresión pET-AcRRv2660c, que porta la secuencia codificante de los antígenos Acr y Rv2660c. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los chequeos de restricción efectuados al plásmido con las enzimas PvuII y BglII, y cuadro predictivo con los tamaños de bandas esperadas. Orden de los carriles: M (patrón de peso molecular), 1 (plásmido sin digerir), 2 (plásmido digerido con enzima PvuII) y 3 (plásmido digerido con enzima Bgl II). **Fuente: Elaboración propia.**

A

TDVSRKIRAW GRRLMIGTAA AVVLPGLVGL AGGAATAGAF SRPGLPVEYL QVPSPSMGRD IKVQFQSGGN NSPAVYLLDG
LRAQDDYNGW DINTPAFEWY YQSGLSIVMP VGGQSSFYSD WYSPACGKAG CQTYKWETFL TSKLPQWLSA NRAVKPTGSA
AIGLSMAGSS AMILAAYHPQ QFIYAGSLSA LLDPSQGMGP SLIGLAMGDA GGYKAADMWG PSSDPAWERN DPTQQIPKLV
ANNTRLWVYC GNGTPNELGG ANIPAEFLEN FVRSSNLKFQ DAYNAAGGHN AVFNFPPNGT HSWEYWGAQL NAMKGDLQSS
LGAGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGMTEQQW NFAGIEAAAS AIQGNVTSIH SLLDEGKQSL TKLAAAWGGS GSEAYQGAQQ
KWDATATELN NALQNLARTI SEAGQAMAST EGNVTGMFAS GGGGSGGGGH HHHHH

C



Muestra	Bandas esperadas
1) pET22b-Ag85bESAT6	-
2) pET22b-Ag85bESAT6 PvuII	3291-2333-999-93-22 bp
3) pET22b-Ag85bESAT6 BglII	6738 bp

Figura 6. Diseño, clonamiento y chequeo de restricción de la quimera qTBA-85ESAT. (A) Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica *qTbA-85ESAT* diseñada. En color verde se destaca al antígeno Ag85b y en morado al antígeno ESAT6. El color amarillo representa al espaciador añadido cuya función es conectar a ambas proteínas, darles libertad estérica, y exponer la secuencia de histidinas para facilitar su purificación a través de técnicas cromatográficas. (B) Vector de expresión pET-Ag85bESAT6, que porta la secuencia codificante de los antígenos Ag85b y ESAT6. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los chequeos de restricción efectuados al plásmido con las enzimas PvuII y BglII, y cuadro predictivo con los tamaños de bandas esperadas. Orden de los carriles: M (patrón de peso molecular), 1 (plásmido sin digerir), 2 (plásmido digerido con enzima PvuII) y 3 (plásmido digerido con enzima BglII). **Fuente: Elaboración propia.**

6.2 Proteínas quiméricas *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT* producidas como cuerpos de inclusión en *E. coli.*

La producción de las quimeras *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT,* se realizó en un biorreactor de 5 L de medio TBAI. De acuerdo con los resultados, al final del proceso fermentativo se obtuvo un rendimiento de 16 g biomasa/L y 24 g biomasa/L para el antígeno *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT* respectivamente. Por otra parte, el rendimiento específico por gramos de biomasa fue de 62.5 mg/g para *qTbA-16MRA* y de 24 mg/g para *qTbA-85ESAT.*

Posteriormente, las biomasas se resuspendieron en soluciones con pH equivalente a los puntos isoeléctricos de las proteínas y se sometieron a un proceso de ruptura mecánica. Consiguientemente, las fracciones solubles e insolubles se chequearon mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y *Western blot*, y se analizaron mediante densitometría. Los resultados indicaron que el antígeno *qTbA-16MRA* se expresó de forma mayoritaria en la fracción insoluble, hallándose cerca de un 90% de la proteína en dicha fracción (figura 7A). Asimismo, se observó que el antígeno *qTbA-85ESAT* se expresó en su totalidad en la fracción insoluble, lo que fue corroborado con el *Western blot* al no detectarse una banda inmunorreactiva con el tamaño esperado en la fracción soluble. Por otro lado, cada antígeno se produjo en la fracción insoluble con un nivel de pureza del 59% para *qTbA-16MRA* y del 48% para *qAg85b-ESAT-6* (figura 7B).

Luego de expresar cada antígeno como cuerpos de inclusión, estos se sometieron a un proceso de semi-purificación mediante lavados con Tampón de lavado específico para cada proteína. El objetivo de estos lavados fue eliminar contaminantes y mejorar la pureza de ambas quimeras, por lo que al final del proceso se estimó el nivel de pureza de los antígenos mediante análisis densitométrico. Además, se estimó la concentración de las proteínas con SDS-PAGE en gel de poliacrilamida utilizando una curva estándar de hIFNα (figura 7C). Para la proteína *qTbA-16MRA* se estimó un nivel de pureza aproximado del 66% y para *qTbA-85ESAT* de un 71% (Figura 7C). Con respecto a sus concentraciones, se obtuvo 6.2 mg/mL y 3.5 mg/mL para *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*, respectivamente. Estos antígenos expresados insolubles se utilizaron posteriormente para los ensayos de inmunización en modelos animales.

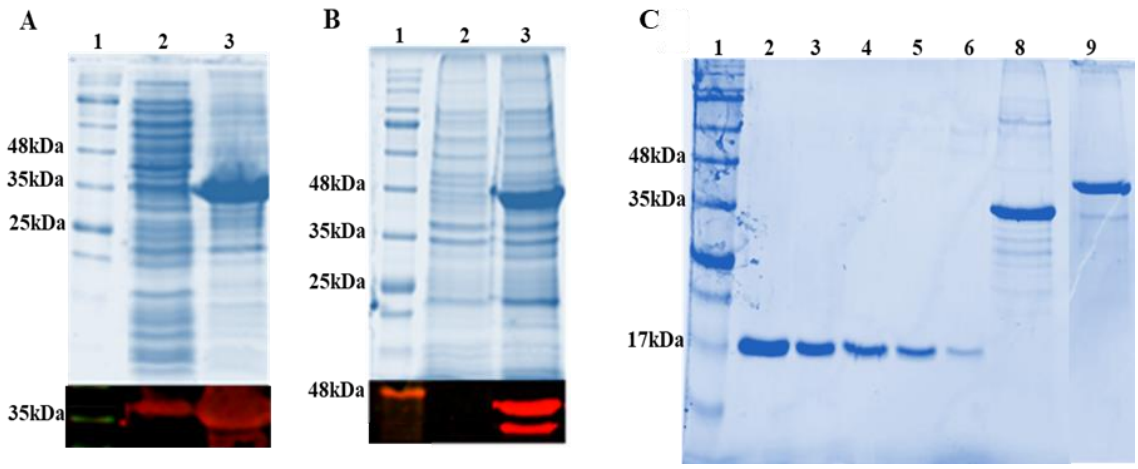


Figura 7. Evaluación del nivel de expresión, pureza y concentración de los antígenos qTBA-16MRA y qTBA-85ESAT. *(A) Chequeo de la expresión del antígeno qTbA-16MRA en la fracción soluble e insoluble mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y Western blot con anticuerpo anti histidina. Orden de carriles: 1 (Patrón de peso molecular de proteínas), 2 (fracción soluble), 3 (fracción insoluble). (B) Chequeo de la expresión del antígeno qTbA-85ESAT en la fracción soluble e insoluble mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al*

15% y Western blot con anticuerpo anti histidina. Orden de carriles: 1 (Patrón de peso molecular de proteínas), 2 (fracción soluble), 3 (fracción insoluble). (C) Estimación del nivel de pureza en ImageJ y cuantificación de los antígenos quiméricos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% utilizando una curva estándar de hIFNα. Orden de carriles: 1 (Patrón de peso molecular de proteínas), 2-6 (hIFNα curva estándar), 8 (qTbA-16MRA), y 9 (qTbA-85ESAT). ***Fuente: Elaboración propia****.*

6.3 Purificación de las quimeras *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT* mediante electroelución.

Ambos antígenos expresados en forma de cuerpos de inclusión se purificaron desde un gel de poliacrilamida debido a que no se logró optimizar las condiciones de purificación mediante técnicas cromatográficas. Es así como se implementó un proceso de electroelución con el propósito de obtener las proteínas puras para su empleo en los ensayos de estimulación *in vitro*.

Los resultados de las electroeluciones de ambas quimeras fueron analizados mediante densitometría, demostrando que cada proteína se obtuvo con un alto grado de pureza. De esta manera, *qTbA-16MRA* se logró obtener con una pureza del 93%, mientras que *qTbA-85ESAT* con un 96% (figura 8).

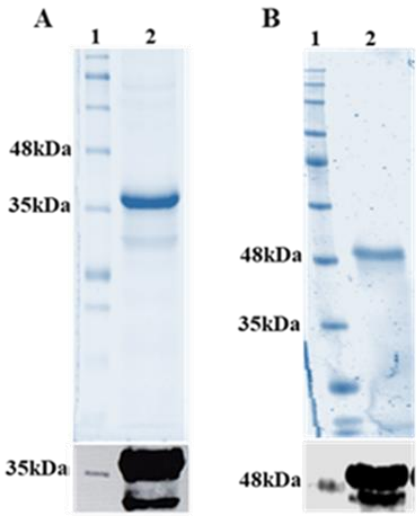


Figura 8. Purificación de los antígenos qTBA-16MRA y qTbA-85ESAT desde gel de poliacrilamida mediante electroelución. Imágenes de geles de poliacrilamida preparados al 15% y *Western blot* realizado con anticuerpo AntiHIS, obtenidas en *ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences)*. (A) Chequeo de la quimera *qTbA-16MRA* recuperada de la electroelución, con su respectivo *Western blot* donde se detectó una banda de tamaño aproximado a los 35 kDa correspondiente a la proteína. (B) Chequeo de la quimera *qTbA-85ESAT* recuperada de la electroelución, con su respectivo *Western blot* donde se identificó una banda cercana a los 48 kDa, correspondiente a la proteína. Orden de carriles: 1 (patrón de peso molecular), 2 (proteína electroeluída). **Fuente: Elaboración propia.**

6.4 Títulos de anticuerpos IgG específicos inducidos por la vacunación de modelos animales con las formulaciones basadas en las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*.

Se desarrollaron dos esquemas de inmunización independientes, uno en modelo caprino y el otro en bovinos para la caracterización de la respuesta de anticuerpos inducida por los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*. En términos generales, los ensayos realizados en ambas especies mostraron que a medida que transcurrió el tiempo de inmunización se generó un aumento en los niveles de anticuerpos detectados mediante ELISA contra los dos antígenos quiméricos. Lo anterior se observó para la mayoría de los grupos experimentales, con excepción del grupo placebo y BCG, en los cuales no se detectó respuesta de anticuerpos contra ninguno de los antígenos (figura 9). Tanto en cabras como en terneros se observó que la quimera con mayores títulos de anticuerpos fue *qTbA-16MRA*. En cabras *qTbA-16MRA* indujo títulos de anticuerpos de hasta 1/300000, mientras que *qTbA-85ESAT* de 1/158000 (figura 10A y 10B). Por su parte, en terneros *qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT* indujeron títulos máximos de 1/102400 y 1/6400, respectivamente (figura 9C y 9D). La diferencia entre la respuesta

generada por *qTbA-16MRA* sobre *qTbA-85ESAT* no fue estadísticamente significativa para ninguno de los grupos en caprinos.

En bovinos por su parte, se obtuvo diferencias significativas entre la respuesta inducida por ambos antígenos, siendo superior la generada por *qTbA-16MRA* en comparación con *qTbA-85ESAT.* El grupo DIVA IFNα fue el que obtuvo mayores títulos en el transcurso del esquema de vacunación, pues desde el día 14 hasta el día 42 se observó que los títulos de anticuerpos inducidos por la quimera *qTbA-16MRA* fueron estadísticamente superiores a los observados contra *qTbA-85ESAT* (ver significancias en la tabla 4). Por otra parte, los terneros vacunados con la formulación DIVA IFNα exhibieron mayores títulos de anticuerpos en comparación con el resto de los grupos DIVA contra ambas quimeras, no obstante, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

En cuanto a la cinética de producción de anticuerpos contra los antígenos, se obtuvo que tanto en cabras como en terneros se evidenció un notorio primer incremento de la respuesta humoral contra las dos quimeras en el día 14 del ensayo y luego un segundo aumento en el día 35. Hacia el día 42, los títulos inducidos por la proteína *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* solo se mantuvieron constantes en los terneros inmunizados con la formulación DIVA IFNα, a diferencia de lo que se vio en cabras, dónde la respuesta exhibida contra ambos antígenos tiende a disminuir en todos los grupos experimentales (figura 9). Los títulos de anticuerpos alcanzados por cada grupo experimental en cabras y terneros con sus respectivas significancias se resumen en la tabla 4.

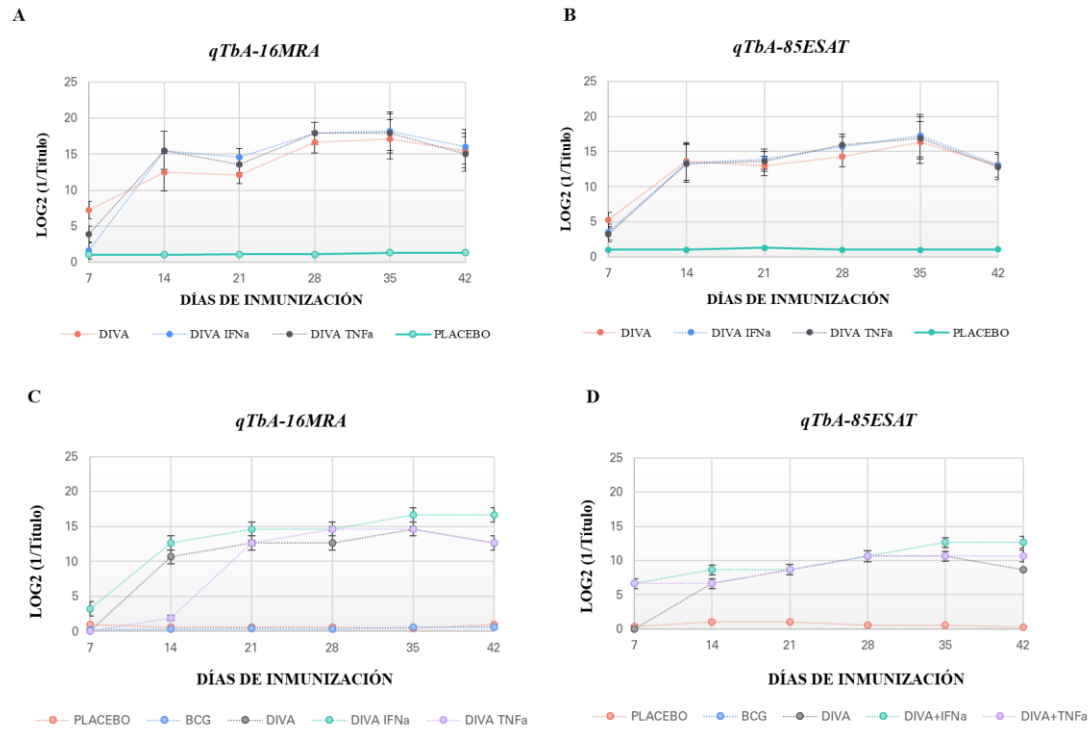


Figura 9. Cinética de los títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación en cabras (A y B) y en terneros (Cy D). Títulos de anticuerpos IgG contra las quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* detectados mediante ELISA a partir de muestras de plasma colectadas desde el día 0 hasta el 42 del esquema de inmunización en cabras (A y B). Títulos de anticuerpos IgG contra las quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* identificados en ELISA a partir de muestras de plasma colectadas desde el día 0 hasta el 42 del esquema de inmunización en terneros (C y D). Los datos se presentaron como el Log2 del promedio de los títulos obtenidos por día/grupo experimental +/- su desviación estándar. Los resultados se analizaron mediante la prueba de comparaciones múltiples ANOVAde dos vías y post-hoc de Tukey. **Fuente: Elaboración propia.**

Tabla 2. Títulos de anticuerpos inducidos por la vacunación en caprinos y bovinos con sus respectivas significancias utilizando la prueba ANOVA de dos vías * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y un post-hoc de Tukey. **Fuente: Elaboración propia.**

		ANTÍGENOS											
	Especie animal	***qTbA-16MRA***						***qTbA-85ESAT***					
		Día de Vacunación											
	Formulación vacunal	**7**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**7**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**
CAPRINOS	DIVA	150	4600	4600	102440	150000	50000	40	13000	8000	21000	81000	9000
	DIVA IFNα	4	4800	25600	235000	300000	60000	12	10500	16000	52000	150000	9000
	DIVA TNFα	14	4800	13000	235000	235000	35000	10	10500	13000	60000	125000	7500
	Placebo	2.12	2.12	2.16	2.16	2.53	2.53	2.1	2.1	2.53	2.1	2.1	2.16
BOVINOS	DIVA	2	1600*	6400*	6400	25600*	6400*	4	100	400	1600	1600	400
	DIVA IFNα	10	6400*	2560**	25600*	102400*	102400*	100*	400	400	1600	6400	6400
	DIVA TNFα	4	4	6400*	25600*	25600*	6400	100***	100*	400	1600	1600	1600
	BCG	1.2	1.25	1.3	1.25	1.5	1.5	1.3	1.25	1.5	1.3	1.25	1.25
	Placebo	2	1.5	1.5	1.5	1.3	2	1.3	2	2	1.5	1.5	1.25

6.5 Poblaciones de linfocitos T de memoria y perfil de citoquinas proinflamatorias inducidas por las formulaciones vacunales administradas en bovinos.

La respuesta inmune celular inducida en los terneros posterior a su inmunización con las distintas formulaciones, se analizó a través de la detección de los fenotipos celulares circulantes de linfocitos T de memoria $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$ en un citómetro ATTUNE NxT Flow Cytometer, y de las citoquinas proinflamatorias Th1 IFNγ y TNFα, y Th17 IL-17A utilizando la tecnología MILLIPLEX®.

Para la identificación de las subpoblaciones celulares $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$, se aislaron PBMCs de muestras de sangre obtenidas de los grupos de terneros inmunizados y se estimularon con las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* purificadas. Luego, las células se marcaron con anticuerpos específicos de reconocimiento de los receptores de linfocitos CD4, CD8 y CD44. Una vez teñidas las células con los distintos marcadores, se analizaron mediante citometría. En el citómetro primero se seleccionaron las poblaciones de linfocitos y las células individuales. Posteriormente, se seleccionaron los marcadores extracelulares Alexa fluor 647 y FITC con los que se tiñeron las células (figura 10)

Los resultados obtenidos a partir de la citometría mostraron que la estimulación conjunta de las células con los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*, indujo una respuesta caracterizada por subpoblaciones de linfocitos T de memoria $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$, la cual fue significativamente superior en comparación con las células sin estimular ($p < 0.0001$) (figura 11). Por otro lado, al contrastar la respuesta inducida en los diferentes grupos contra el placebo, se evidenció que los terneros inmunizados con BCG y DIVA IFNα exhibieron porcentajes de $CD4^+CD44^+$ estadísticamente mayores. Al comparar dentro de esta misma población de células a los grupos BCG y DIVA IFNα se obtuvo que

la respuesta de BCG fue significativamente superior a DIVA IFNα (*p < 0.05)*. A pesar de que el grupo DIVA IFNα mostró inducir un mayor porcentaje de linfocitos $CD4^+CD44^+$, no se detectaron diferencias estadísticas con los grupos DIVA y DIVA TNFα. Para la población $CD8^+CD44^+$ se obtuvo que ninguno de los grupos inmunizados mostró diferencias significativas contra el placebo, ni tampoco entre ellos mismos (tabla 5).

Por otro lado, se obtuvieron concentraciones medibles (pg/mL) de las citoquinas proinflamatorias tipo Th1 IFNγ, TNFα y Th17 IL-17A en los medios de cultivo recuperados a partir de las células estimuladas con las quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras provenientes de células estimuladas y las no estimuladas (*p < 0.001*) (figura 11). Asimismo, se observó que todos los grupos inmunizados obtuvieron concentraciones significativamente superiores de IFNγ a las del grupo placebo, donde los animales que recibieron la vacuna BCG y DIVA IFNα fueron quienes alcanzaron los valores más altos (tabla 6). Sin embargo, al contrastar la respuesta de IFNγ inducida por los grupos BCG y DIVA IFNα no se detectaron diferencias significativas. Además, al comparar a los terneros inmunizados con DIVA *versus* DIVA IFNα y DIVA TNFα se encontró que la respuesta de IFNγ inducida por la vacuna DIVA IFNα fue estadísticamente superior a DIVA (*p < 0.01)*. Con respecto a la citoquina TNFα, se comprobó que solo los terneros vacunados con BCG indujeron concentraciones significativamente mayores en comparación con el placebo. Se encontraron también diferencias estadísticas entre BCG y el resto de los grupos inmunizados, siendo muy superior la producción de TNFα en los animales vacunados con BCG (*p < 0.001).* La comparación del grupo DIVA con DIVA IFNα y DIVA TNFα no mostró significancias. Por otra parte, los grupos BCG y DIVA IFNα fueron los únicos que mostraron concentraciones de IL-17A significativamente superiores en relación con el grupo placebo (tabla 6). También, se detectaron diferencias estadísticas

entre los terneros vacunados con BCG y DIVA IFNα ($p < 0.05$). Por último, al comparar al grupo DIVA contra DIVA IFNα y DIVA TNFα, se encontró que DIVA IFNα produjo niveles de IL17A estadísticamente mayores que el grupo DIVA, sin embargo, DIVA TNFα no fue significativamente superior a los animales DIVA.

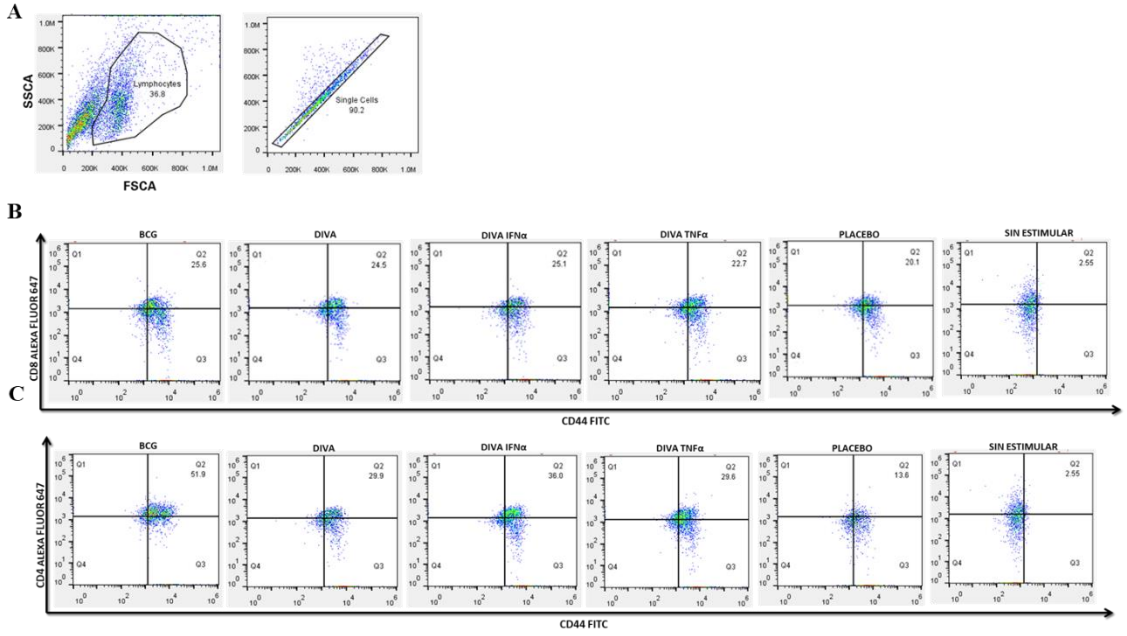


Figura 10. Estrategia de gating para la detección de poblaciones de linfocitos T de memoria CD8+CD44+ y CD4+CD44+. (A) A partir de PBMCs estimuladas durante 5 días con las quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* se seleccionaron las poblaciones celulares T $CD8^{+}CD44^{+}$ y $CD4^{+}CD44$ utilizando dos estrategias de *gating*. Gate 1, con las funciones *Side Scatter (SSCA)* y *Forward Scatter (FSCA)* se seleccionaron exclusivamente los linfocitos del total de eventos analizados en cada muestra. Gate 2, con los parámetros *Forward Scatter-Width* y *Forward Scatter-Height* se seleccionaron solo los eventos individuales excluyendo los dobletes de células detectados en el citómetro. (B) Gráficos de las poblaciones celulares previamente estimuladas con los antígenos

qTbA-16MRA y *qTbA-85ESAT* y sin estimular, teñidas con los marcadores extracelulares Anti-CD4 bovino Alexa fluor 647, Anti-CD8 bovino Alexa fluor 647 y Anti-CD44 FITC. ***Fuente: Elaboración propia.***

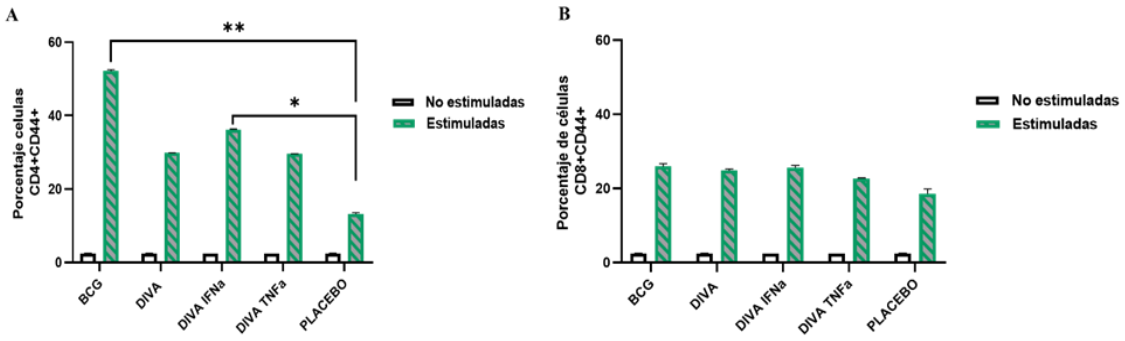


Figura 11. Frecuencia de linfocitos CD4+CD44+ y CD8+CD44+. Se detectaron en los diferentes grupos de terneros inmunizados dos poblaciones celulares mediante citometría de flujo luego de estimular PBMCs durante 5 días con las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*. Los datos se presentaron como el promedio de las réplicas de las mezclas realizadas por grupo experimental +/- su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó con la prueba *T-Student* donde se consideró los valores significativos * p < *0.05,* ** p < *0.01,* *** p < *0.001. Fuente: Elaboración propia.*

Tabla 3. Comparación de subpoblaciones celulares obtenidas en los diferentes grupos de terneros inmunizados y el grupo placebo.

Grupo[a]	**Población celular[b]**	**Promedio porcentajes con intervalo de confianza del 95%**				**Prueba *T-Student* (p-*value*)[c]**
		C	**CNoE**	**E**	**NoE**	**C vs E**
BCG	$CD8^{+}CD44^{+}$	18.6	2.50	25.6	2.42	0.325

	$CD4^+CD44^+$	13.2	2.41	51.9	2.48	< 0.01
DIVA	$CD8^+CD44^+$	18.6	2.45	24.5	2.42	0.348
	$CD4^+CD44^+$	13.2	2.45	29.9	2.50	0.239
DIVA IFNα	$CD8^+CD44^+$	18.6	2.47	25.1	2.43	0.328
	$CD4^+CD44^+$	13.2	2.43	36.0	2.47	< 0.05
DIVA	$CD8^+CD44^+$	18.6	2.43	22.7	2.43	0.486
TNFα	$CD4^+CD44^+$	13.2	2.52	29.6	2.48	0.236

Los datos se representaron como el promedio de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+CD44^+$ y T $CD8^+CD44^+$ obtenidos de la estimulación de PBMCs con ambas proteínas quiméricas y detectados mediante citometría de flujo. En el análisis estadístico se consideró diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Nomenclatura: **C** (promedio del porcentaje de células $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$ del grupo placebo estimulado con las quimeras); **CNoE** (promedio del porcentaje de células $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$ del grupo placebo); **E** (promedio del porcentaje de células $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$ de los diferentes grupos experimentales estimulados con antígenos quiméricos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT)*; **NoE:** (PBMCs sin estimular); **[a]** Grupos animales inmunizados; [b] Subpoblaciones detectadas; **[c]** Resultados prueba estadística *T-Student* comparación entre C y E. **Fuente: Elaboración propia.**

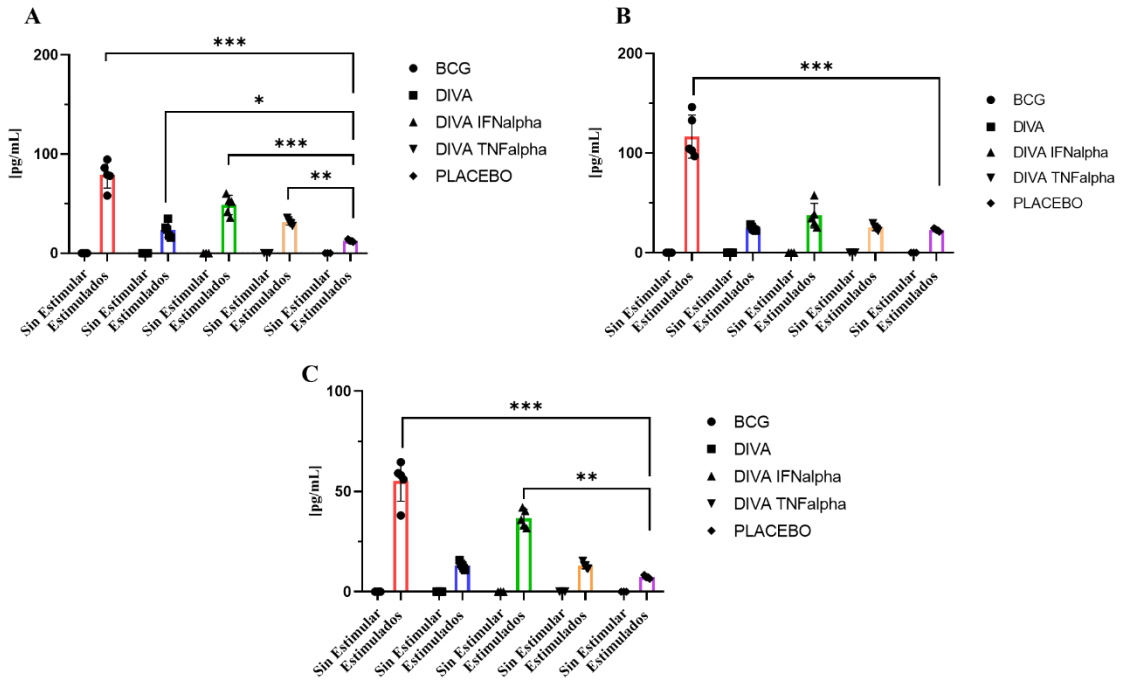


Figura 12. Detección de citocinas proinflamatorias identificadas en MILLIPLEX®. *(A, B y C) Concentraciones pg/ml de IFNγ, TNFα e IL-17A, respectivamente, detectadas desde el sobrenadante recuperado después de la estimulación de PBMCs con las quimeras qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT. Cada punto representa al promedio de las réplicas de cada muestra individual obtenida por animal. Los datos se analizaron comparando a cada grupo inmunizado con el grupo placebo utilizando la prueba de T-Student (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).* ***Fuente: Elaboración propia.***

Citoquina[a]	Grupo[b]	Promedio concentraciones (pg/mL) con intervalo de confianza del 95%				Prueba T-Student (p-value)[c]
		C	CNoE	E	NoE	C vs E
IFNγ	BCG	12.55	0.052	79.19	0.061	< 0.001
	DIVA	12.55	0.056	23.6	0.058	< 0.05
	DIVA IFNα	12.55	0.048	48.6	0.060	< 0.001
	DIVA TNFα	12.55	0.047	22.33	0.062	<0.01
TNFα	BCG	22.88	0.053	116.58	0.057	< 0.001
	DIVA	22.88	0.056	24.69	0.054	0.1891
	DIVA IFNα	22.88	0.051	37.22	0.056	0.0522
	DIVA TNFα	22.88	0.053	25.04	0.054	0.1722
IL-17A	BCG	7.35	0.049	55.19	0.051	< 0.001
	DIVA	7.35	0.049	12.84	0.053	0.0595
	DIVA IFNα	7.35	0.052	36.6	0.050	< 0.001
	DIVA TNFα	7.35	0.056	11.73	0.064	0.0755

Tabla 4. Comparación de citocinas proinflamatorias detectadas en los diferentes grupos de terneros inmunizados y el grupo placebo. **Fuente: Elaboración propia.**

Los datos están representados como el promedio de la respuesta de citoquinas (pg/ml) detectada con el kit MILLIPLEX® . Nomenclatura: **C** (promedio de la concentración de citoquinas obtenidas para PBMCs del grupo placebo estimuladas con *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT)*; **CNoE** (promedio de la concentración de citocinas obtenidas para PBMCs del grupo placebo sin estimular); **E** (PBMCs de los diferentes grupos experimentales estimuladas con antígenos quiméricos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT)*; **NoE** (PBMCs de los diferentes grupos experimentales no estimuladas con antígenos quiméricos). **[a]** Citoquinas detectadas en kit MILLIPLEX®; **[b]** Grupos animales inmunizados.; **[c]**

Resultados prueba estadística *T-Student* entre C y E. En el análisis estadístico se consideró diferencias significativas * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6.6 Respuesta de anticuerpos contra antígenos presentes en el bPPD.

Se evaluó mediante *Western blot* si los animales inmunizados (cabras y terneros) con las formulaciones DIVA, DIVA IFNα, DIVA TNFα, PLACEBO y BCG (esta última solo incluida en el ensayo en bovinos) generaban o no una respuesta de anticuerpos contra los antígenos presentes en el bPPD de la tuberculina. A partir de estos ensayos se demostró que en ninguna de las muestras de plasma obtenidas en el día 0 del esquema de vacunación en cabras y en terneros se detectaron anticuerpos que reconocieran al bPPD ni a las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* (figura 13). En cuanto a las muestras del día 35, en cabras se observó que los grupos vacunados con las formulaciones DIVA, DIVA IFNα y DIVA TNFα produjeron anticuerpos específicos contra *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT,* no así para el bPPD. Esta respuesta se identificó a través de la visualización de bandas inmunorreactivas a una altura aproximada de los 35 kDa para *qTbA-16MRA* y 48 kDa para *qTbA-85ESAT.* Adicionalmente, se detectó un patrón de bandas de mayor y menor tamaño para ambas quimeras. Las bandas mayores corrieron cerca de los 70 kDa (*qTbA-16MRA*) y 100 kDa (*qTbA-85ESAT*) duplicando en tamaño a ambas proteínas quiméricas. Las bandas de menor tamaño se detectaron entre los 35 y 25 kDa para *qTbA-16MRA*, y entre los 48 y 35 kDa contra *qTbA-85ESAT* (figura 14A). Por otra parte, en los plasmas obtenidos el día 35 de los grupos DIVA, DIVA IFNα y DIVA TNFα en terneros, se identificaron anticuerpos específicos únicamente contra el antígeno *qTbA-16MRA* (banda inmunoreactiva aproximada a los 35kDa). Al igual que en cabras, en terneros también se detectó una segunda banda inmunoreactiva de aproximadamente el doble del tamaño correspondiente a la quimera *qTbA-16MRA.* Contra *qTbA-85ESAT* se observó en general una nula respuesta de anticuerpos, por lo que no se detectaron bandas que reconocieran al antígeno en

ninguno de los grupos experimentales con excepción de DIVA IFNα. En este último se visualizó una banda inmunoreactiva contra el antígeno *qTbA-85ESAT* que fue de menor intensidad en comparación con la de *qTbA-16MRA.* Por último, los terneros inmunizados con BCG y la formulación placebo no levantaron respuesta de anticuerpos contra ninguna de las proteínas debido a que no se observaron las bandas inmunorreactivas respectivas (figura 13B). Por último, los resultados de los ensayos de *Western blots* presentados en la figura 13C, comprobaron que el patrón de bandas de mayor y menor tamaño detectado contra los antígenos quiméricos tanto en cabras como en terneros corresponden también a partes o conformaciones de ambas proteínas. Por lo tanto, los anticuerpos presentes en los plasmas de ambas especies animales fueron específicos contra *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT,* debido a que al incubar las membranas solo con los anticuerpos Anti-especie (conjugado y no conjugado), no se no se evidencio la presencia de bandas inmurreactivas (figura 13C).

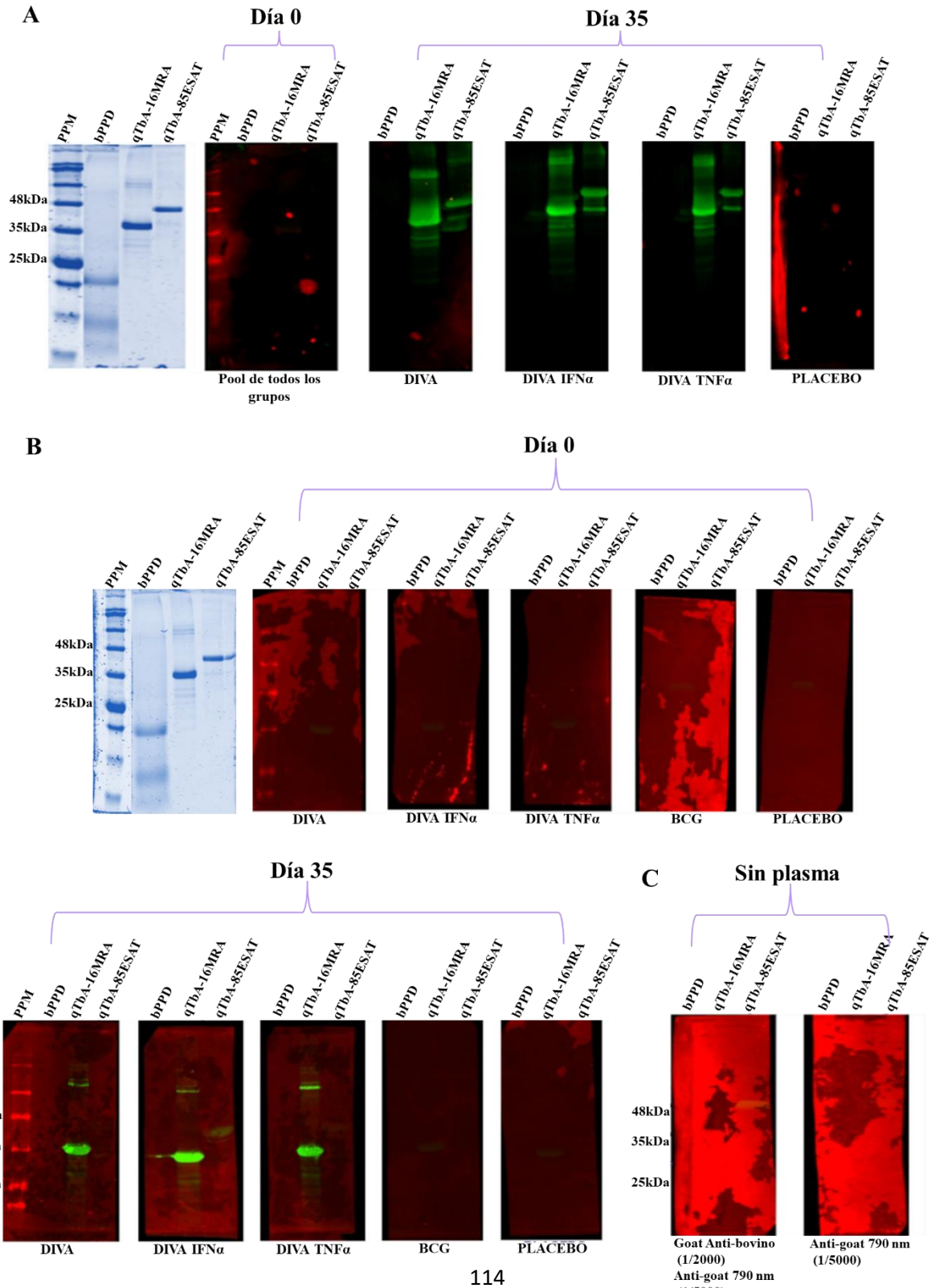

A
Día 0
Día 35
PPM
bPPD
qTbA-16MRA
qTbA-85ESAT
48kDa
35kDa
25kDa
Pool de todos los grupos
DIVA
DIVA IFNα
DIVA TNFα
PLACEBO
B
Día 0
BCG
Día 35
C
Sin plasma
Goat Anti-bovino (1/2000)
Anti-goat 790 nm (1/5000)

Figura 13. Detección de anticuerpos contra bPPD en el plasma de cabras y terneros. (A) Gel SDS-PAGE preparado al 15% dónde se cargaron cantidades determinadas de bPPD y de las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*, y *Western blots* con muestras de plasma obtenidas en el día 0 y 35 del esquema de vacunación realizado en caprinos. (B) Gel SDS-PAGE preparado al 15% dónde se cargaron el bPPD y las quimeras, e imágenes de los *Western blots* realizados con plasmas colectados en el día 0 y 35 del ensayo de inmunización en terneros. (C) *Western blot* realizado sin muestras de plasma, dónde las membranas solo se incubaron con los anticuerpos *goat Anti-bovino/Anti-goat* 790nm, y *Anti-goat* 790 nm. Los geles y *Western blots* se revelaron en ODYSSEY® CLx (LI-COR Biosciences). **Fuente: Elaboración propia.**

6.7 Respuesta celular inducida por la vacunación en cabras y terneros contra la prueba de tuberculina.

Con el objetivo de evaluar si las formulaciones administradas en los animales generaban o no una respuesta celular cruzada con la prueba de tuberculina, a todos los animales inmunizados se les realizó una PAC mediante la administración de una dosis intradérmica de bPPD en la base de la cola. En cabras esta se aplicó en la semana 16 y en terneros en la semana 11 del esquema de vacunación.

Los resultados obtenidos demostraron que ninguna de las formulaciones vacunales administradas en caprinos generó una reacción cruzada contra el bPPD de la tuberculina. Esto se tradujo en que ninguna de las cabras presentó un aumento del grosor de la zona inoculada ≥ 3mm. Por su parte, en los terneros se observó que cuatro de cinco animales del grupo BCG resultaron reaccionantes a la prueba de tuberculina y uno fue negativo. El aumento de grosor de la zona inoculada en los terneros reaccionantes del grupo BCG fueron 5.21 mm, 4.51

mm, 4.28 mm y 3.32 mm, respectivamente. En los grupos DIVA y DIVA IFNα se obtuvo que todos los animales fueron negativos al diagnóstico y que del grupo DIVA TNFα uno de los cinco terneros fue reaccionante al bPPD de la tuberculina. El ternero reaccionante del grupo DIVA TNFα mostró un aumento de grosor de la región inoculada con el bPPD de 3.36 mm. En los análisis estadísticos no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales de cabras, pero sí en los de terneros. En estos últimos se observó que al contrastar al grupo BCG con el DIVA, DIVA IFNα y Placebo se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la respuesta inducida contra el bPPD (figura 14).

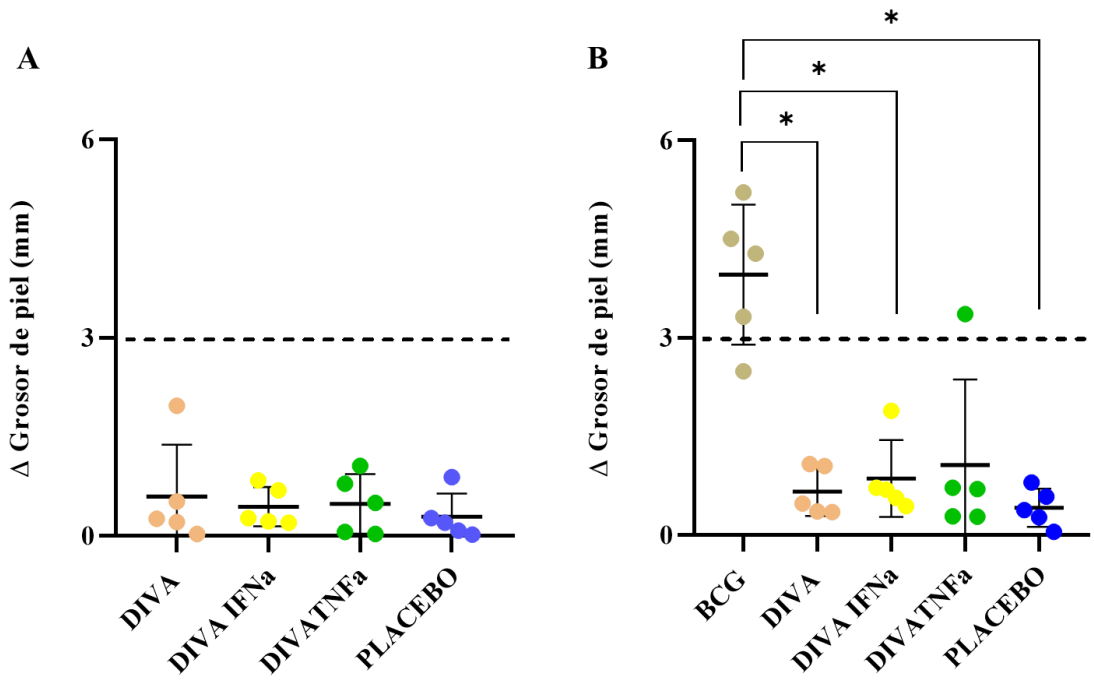


Figura 14. Respuesta contra el bPPD de la prueba de tuberculina aplicada en caprinos y bovinos previamente inmunizados*. Utilizando un caliper digital se realizó la lectura de la PAC, midiéndose el grosor de la piel de la base de la cola de cada animal donde la tuberculina fue administrada. Esta lectura se realizó a las 72 h posteriores a la inoculación de la tuberculina. (A) mediciones realizadas en cabras. (B) mediciones realizadas en terneros. Los resultados se expresaron como el delta o diferencia en mm entre la medición del grosor de la piel previo y posterior a la aplicación del antígeno bPPD de los animales individuales. La línea punteada a la altura de los 3 mm muestra en ambos gráficos el punto de corte o cut off utilizado para la lectura de la PAC. Diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta de los diferentes grupos se determinaron usando la prueba exacta de Fisher (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).* ***Fuente: Elaboración propia.***

6.8 Protección en terneros inoculados por vía intranodal con una cepa atenuada de *M. bovis*.

Para determinar el nivel de protección inducido por las formulaciones vacunales BCG, DIVA, DIVA IFNα, DIVA TNFα y Placebo administradas en los terneros, estos se desafiaron mediante la administración intranodal de una dosis de 2.2 x 10^8 UFC de la cepa atenuada de *M. bovis (BCG SSI Danish* 1331). Dos meses posteriores al reto, se realizó la extracción de todos los linfonodos inoculados con BCG, y a partir de estos se determinó el número de copias del gen MPB70 de *M. bovis* mediante qPCR.

Los resultados obtenidos en los ensayos de qPCR demostraron que se logró amplificar el gen MPB70 desde los tejidos linfoides en todos los grupos experimentales (figura 16). Los animales pertenecientes al grupo placebo fueron los que presentaron el mayor promedio de copias del gen MPB70 (98.2). Así, en cada ternero se detectaron 57.8, 106, 161, 41.2 y 125 copias del gen. Los terneros inmunizados con BCG registraron el promedio de copias más bajo (25.74), donde cada uno obtuvo 33.6, 5.33, 20.8, 40.2 y 28.8, respectivamente. Por su parte, el grupo DIVA IFNα fue el segundo en obtener el menor promedio de copias de MPB70 (27.24), identificándose por animal 10.8, 16, 50.4, 24.7 y 34.3. En los animales vacunados con la formulación DIVA se detectaron en promedio 66.28 copias de MPB70, cada uno con 79.2, 59.9, 62.9, 56.9, 72.5 copias del gen. Por último, los animales del grupo DIVA TNFα exhibieron un promedio de copias de MPB70 de 57.54, y cada uno 42.3, 54.5, 73, 79.2, 38.7, respectivamente. Los análisis estadísticos de estos resultados mostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Placebo y BCG ($p< 0.001$), y también entre el grupo Placebo y DIVA IFNα ($p< 0.001$). No se encontraron diferencias estadísticas entre la comparación del Placebo-DIVA y

Placebo-DIVA TNFα. Al contrastar la respuesta inducida entre las formulaciones DIVA no se detectaron diferencias significativas.

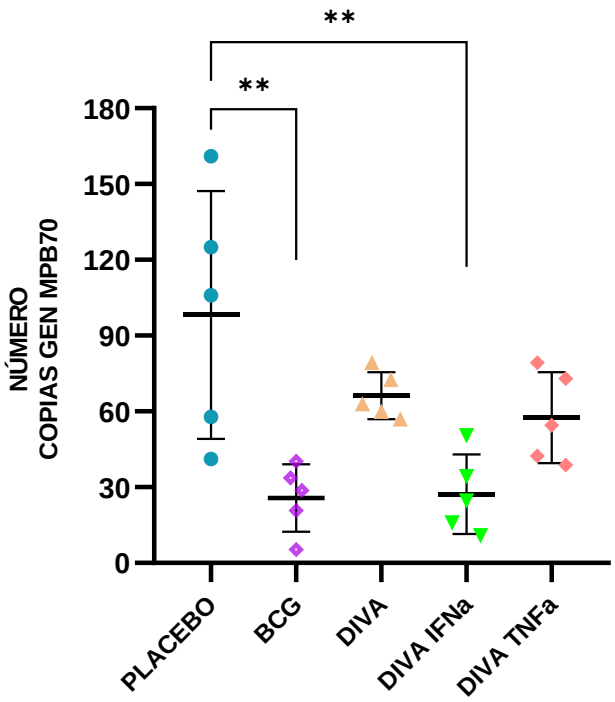


Figura 15. Determinación del número de copias del gen MPB70 de M. bovis mediante qPCR. Distintos grupos de terneros previamente inmunizados se retaron en la semana 13 del esquema de vacunación con la cepa BCG SSI Danish 1331 a través de su inoculación en los linfonodos preescapulares derechos. Dos meses posteriores al reto, se realizó la recuperación de los tejidos linfoides y se determinó mediante PCR cuantitativo el número de copias del gen MPB70 en los animales desafiados. Se evaluó el nivel de protección inducido por las distintas formulaciones frente a la cepa atenuada de M. bovis. Sobre la línea punteada se encuentran los animales no protegidos y bajo la línea los protegidos. Los datos se expresaron como la media de las réplicas de cada muestra en el

qPCR +/- su desviación estándar (SD), y se analizaron mediante ANOVA de una vía (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$) y post-hoc de Tukey. **Fuente: Elaboración propia.**

7 DISCUSIÓN

La tuberculosis bovina causada por M. bovis es una enfermedad de denuncia obligatoria, que afecta enormemente al ganado bovino de Chile y el mundo (224). Si bien, en diversos lugares la patología ha sido controlada, no así erradicada, continúa siendo un problema latente no solo en salud animal, sino también de salud pública debido a que se transmite a las personas (zoonosis) (225). En la actualidad, el diagnóstico de campo realizado mediante la prueba de tuberculina cumple un rol fundamental en el control de la diseminación de la enfermedad en el ganado. Sin embargo, la inmunización en animales está prohibida debido a que las vacunas vivas atenuadas generan una respuesta cruzada con el preparado proteico (bPPD) administrado en la prueba de tuberculina. Además, estas vacunas tienen el inconveniente de no conferir una completa protección frente a la infección con la bacteria (226–228). Producto de la necesidad de contar con una vacuna eficiente contra la enfermedad y que además no interfiera con el diagnóstico realizado en el ganado, es que este proyecto doctoral se propuso como desafío desarrollar y caracterizar una vacuna de subunidades recombinante contra *M. bovis*, con capacidad de proteger al ganado y no interferir con el diagnóstico.

7.1 Diseño y Expresión de los antígenos quiméricos qTbA-16MRA y qTbA-85ESAT.

Se seleccionaron los antígenos AcR, Rv2660c, Ag85b y ESAT6 para el diseño de las quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*, luego de una búsqueda bibliográfica sistemática que permitió identificar a estas proteínas de *M. bovis* como potenciales candidatos vacunales (229). Estas proteínas son características de la fase activa y de latencia de la bacteria, lo que permitiría su uso para el desarrollo de una vacuna “multifase” contra la tuberculosis bovina (189). Las cuatro proteínas han sido ampliamente descritas por su rol en conferir

protección en modelos animales frente a un reto con *Mycobacterium tuberculosis* (230–233). La bacteria *M. tuberculosis* posee una homología genómica del 99.95% con *M. bovis*, es decir, son patógenos estrechamente relacionados en términos de factores de virulencia, mecanismos de evasión de la respuesta inmune, y presentación de la enfermedad (23). Debido a esto, es que potenciales candidatos vacunales con efectividad comprobada contra la tuberculosis en humanos causada por *M. tuberculosis* comprenden modelos aplicables contra la tuberculosis bovina generada por *M. bovis*.

Como parte del diseño de ambas moléculas quiméricas, se consideró la adición de una secuencia espaciadora compuesta por residuos de serinas y glicinas entre los dominios proteicos adyacentes de los antígenos que conformaron a cada quimera. Estudios relacionados al diseño de proteínas de fusión sugieren que dos o más dominios proteicos deben unirse a través de una secuencia espaciadora flexible, rígida o escindible *in vivo*, para evitar una colisión estérica entre los dominios proteicos que afecte su estructura y posterior funcionalidad (188,234). Algunas investigaciones incluso han demostrado que la ausencia de una secuencia espaciadora que fusione dos o más dominios proteicos se asociaría a fallas en el replegamiento, niveles bajos de expresión y pérdida de actividad de la proteína diseñada (235,236). Por otra parte, también se ha observado que los espaciadores conformados por residuos de Ser y Gly tienden a ser más estables en solventes acuosos debido a que son residuos de tamaño pequeño que otorgan mayor flexibilidad y libertad de movimiento a las proteínas fusionadas (237).

Los resultados de la producción de los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* mostraron que ambos se expresaron insolubles en forma de cuerpos de inclusión en la cepa *E. coli* BL21 después de 12 horas de autoinducción en medio TBAI. Además, se obtuvo un rendimiento específico de 62.5 mg de proteína/g de biomasa y 24 mg/g de biomasa para *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*

respectivamente. El resultado de rendimiento específico obtenido para la quimera *qTbA-16MRA* fue muy superior al alcanzado en otras investigaciones. En un estudio se expresó la proteína neuraminidasa del virus de la influenza en cuerpos de inclusión con condiciones similares de temperatura y el mismo sistema de expresión en *E. coli* BL21 utilizado en nuestro trabajo. El rendimiento máximo alcanzado de la proteína fue de 28.84 mg/g, siendo similar al que se obtuvo con la quimera *qTbA-85ESAT*, no obstante, la inducción de la expresión de la neuraminidasa se realizó mediante la adición de IPTG (238). Las diferencias entre los niveles de expresión de una proteína u otra y por ende del rendimiento obtenido, se ha descrito que estaría sujeto a factores, tales como las características biofísicas de la proteína, ya sea, su peso molecular, hidrofobicidad, y la complejidad en su secuencia, así como también, a las condiciones utilizadas durante el proceso de expresión de las proteínas (239) . Dentro de estas últimas se encuentran el medio de cultivo y el método de inducción por adición de IPTG o autoinducción utilizados. Así lo demostró una investigación donde se expresaron tres proteínas distintas siendo cada una sometida a inducción con IPTG y a autoinducción en medio con glucosa y lactosa. Los resultados de este trabajo mostraron que, al comparar el nivel de expresión de cada proteína según el método utilizado, se observó que cuando los cultivos eran autoinducidos se obtenían mayores rendimientos de las proteínas en comparación a su inducción con IPTG (240).

Por otro lado, distintos estudios han reportado que la sobreexpresión de proteínas recombinantes como cuerpos de inclusión en bacteria ocurre a expensas del correcto plegamiento de estas, lo cual difiere de la expresión soluble de proteínas, donde se obtienen con un plegamiento adecuado, pero con un rendimiento generalmente inferior (241). El uso del vector pET22b con el promotor T7, las condiciones de expresión tales como la temperatura de

autoinducción a 37°C habrían favorecido la expresión de ambos antígenos como cuerpos de inclusión (242).

Debido a que los cuerpos de inclusión tienden a asociarse con proteínas de la misma naturaleza, y podrían también estar acompañados de proteínas de membrana de la bacteria y otros componentes celulares tales como ADN y ARN, estas deben someterse a un proceso de semi-purificación o lavados con el objetivo de reducir la presencia de dichos contaminantes (243). De esta manera, se realizó un protocolo de lavado a cada quimera con Tampón PBS-Tween 0.2% y Urea 1 M con pH equivalente al punto isoeléctrico de cada proteína (8.86 para *qTbA-16MRA* y 5.95 para *qTbA-85ESAT)* de manera tal de asegurar que ambos antígenos se mantuvieran como cuerpos de inclusión. El uso de detergentes en bajas concentraciones tales como el Tween y de agentes caotrópicos como la urea en el proceso de lavado de proteínas recombinantes expresadas como cuerpos de inclusión ha sido descrito en diversos estudios. El Tween y la urea en bajas concentraciones permiten la solubilización de algunas proteínas presentes en los agregados, por lo que, favorecerían la eliminación de ciertos contaminantes entre cada paso de lavado (244,245). De acuerdo con esto, se obtuvo cada quimera con un mayor grado de pureza al final del proceso de lavado.

7.2 Respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación con las proteínas quiméricas en caprinos y bovinos.

Los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* obtenidos como cuerpos de inclusión se utilizaron en esquemas de vacunación en cabras y terneros. De esta forma, un eje central de esta investigación fue el estudio de la respuesta humoral inducida por las distintas formulaciones vacunales administradas en caprinos y en bovinos a pesar de que durante mucho tiempo se ha subestimado el rol protector de los anticuerpos contra patógenos intracelulares.

Los resultados de la inmunización realizada en cabras y terneros demostraron que tanto *qTbA-16MRA* como *qTbA-85ESAT* indujeron respuesta de anticuerpos en todos los grupos vacunados con alguna de las formulaciones DIVA. Sin embargo, la quimera *qTbA-16MRA* generada a partir de la fusión de los antígenos Acr y Rv2660c, resultó ser la que indujo los mayores títulos en ambas especies animales, mientras que la quimera *qTbA-85ESAT* conformada por las proteínas de fusión Ag85b y ESAT6 mostró una respuesta humoral inferior. Otros grupos de investigación han demostrado la capacidad de las proteínas AcR, Rv2660c, Ag85b y ESAT6 en estimular una respuesta de anticuerpos en modelos animales inmunizados con vacunas de subunidades que incluyen a uno o más de los antígenos referenciados (246,247). Un estudio donde se diseñó una vacuna de subunidades denominada A1D4 con cinco antígenos del *Mycobacterium tuberculosis* fusionados, dentro de los que se encontraban Acr, Ag85b y Rv2660c, la cual se utilizó para inocular a ratones. La vacuna si bien generó títulos de anticuerpos IgG específicos en suero contra los antígenos, comparativamente estos fueron inferiores a los observados en nuestro estudio contra *qTbA-16MRA* (246). Por otra parte, la mayor inmunogenicidad exhibida por la quimera *qTbA-16MRA* en nuestros experimentos, podría ser atribuible al antígeno AcR, el que ha sido también reportado en otras investigaciones como altamente inmunogénico. Así lo reveló un estudio donde se evaluó la inmunogenicidad de AcR en ratones BALB/C inoculados con un candidato vacunal denominado mAcr-SBDtag, el cual contenía a la proteína AcR fusionada con micropartículas de almidón crudo utilizadas como '*antigen carrier*' por sus propiedades adyuvantes. Allí, se probó que la inmunización con esta vacuna indujo una respuesta humoral caracterizada por altos títulos de anticuerpos IgG específicos contra el antígeno AcR (248). (249). Otro grupo de investigación demostró que una vacuna de ADN la cual codificaba para la expresión de la

proteína ESTA6 y fue evaluada en modelo murino, estimuló una muy baja respuesta de anticuerpos IgG específicos contra ESAT6 (250).

Las vacunas de subunidades mencionadas en los estudios con los que se compararon nuestros resultados de títulos de anticuerpos incluían la forma soluble de las proteínas. No obstante, los títulos obtenidos en este trabajo en ambas especies animales se produjeron en respuesta a la vacunación con *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* en forma de cuerpos de inclusión. Esto podría sustentar los títulos superiores observados en este trabajo en comparación con otras investigaciones, puesto que se ha descrito que proteínas en forma de cuerpos de inclusión utilizados como inmunógenos tienen el potencial de inducir altas respuestas de anticuerpos IgG cuando son administradas por vía parenteral u oral (251). De hecho, se ha demostrado que la administración de una vacuna oral que contiene antígenos en forma de cuerpos de inclusión, podría ser una alternativa viable para prescindir de la utilización de adyuvantes. Además, los cuerpos de inclusión serían más resistentes a la degradación en el sistema digestivo debido a su conformación y se ha comprobado que son altamente inmunogénicos, por lo que estas características impulsarían su uso en vacunas (252). La alta inmunogenicidad de los cuerpos de inclusión se debería a que estos conforman estructuras altamente organizadas de hojas beta-plegadas que coexistirían con estructuras proteicas nativas originadas a partir del resto de la cadena polipeptídica de la misma proteína que se encuentra formando cuerpos de inclusión(253). Por lo tanto, existe evidencia de que las proteínas dentro de estos cuerpos de inclusión serían funcionales y tendrían actividad similar a cuando están solubles, manteniendo epítopos conformacionales con capacidad de ser reconocidos por anticuerpos e inducir respuesta humoral. Así también lo demostró una investigación dónde se produjo el antígeno Ag85b en forma de agregado insoluble y en su forma soluble para inmunizar ratones. Allí se comprobó que, al evaluar la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación

de los animales con ambas proteínas, tanto el antígeno Ag85b con su estructura nativa como Ag85b en forma de agregado fueron reconocidos con igual intensidad por anticuerpos IgG presentes en el suero de los ratones (252).

Por otra parte, los resultados obtenidos al comparar entre los títulos de anticuerpos inducidos en los grupos DIVA, DIVA IFNα y DIVA TNFα en caprinos no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Más bien, se evidencio una respuesta similar entre los grupos contra ambas proteínas quiméricas, lo que sugeriría que ninguna de las citoquinas habría coadyuvado mejorando la respuesta de anticuerpos inducida por los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* solos.

Por otra parte, en terneros se observó que el grupo vacunado con la formulación DIVA IFNα generó títulos de anticuerpos superiores contra el antígeno *qTbA-16MRA* en comparación con los DIVA y DIVA TNFα. Además, se observó que la respuesta de anticuerpos inducida en el grupo DIVA IFNα se mantuvo constante entre el día 35 y día 42, a diferencia de lo que se observó en los grupos experimentales restantes, donde posterior al día 35 la respuesta tendió a disminuir. Estos resultados sugerirían que la citocina IFNα mejoraría la respuesta inmune humoral inducida contra *qTbA-16MRA,* generando un aumento en los títulos de anticuerpos y que la intensidad de la respuesta tenga una mayor duración. La evidencia científica actual sustenta la participación del IFNα no solo en la inmunidad innata frente a infecciones virales y bacterianas, sino también su función moduladora de la respuesta adaptativa humoral y celular (254,255). En la inmunidad humoral, el IFNα tiene la capacidad de activar a las células B, estimulando el cambio de clase de inmunoglobulinas (*antibody class switching*) para que produzcan anticuerpos IgG específicos y una respuesta de larga duración contra antígenos proteicos bacterianos (256). Adicionalmente, el rol inmunomodulador del IFNα ha sido reportado en diferentes trabajos donde se ha utilizado como adyuvante molecular en vacunas. Así, un estudio en modelo

murino donde se administró una vacuna de subunidades que incluía antígenos del virus de la influenza y que fue coadyuvada con IFNα, demostró que los ratones produjeron altos títulos de anticuerpos contra los antígenos del virus y esta respuesta permitió una mayor resistencia de los animales frente a la infección con el virus (257). En otra investigación se compararon la actividad adyuvante entre los interferones tipo 1 (IFNα e IFNβ) y el adyuvante completo de Freud (ACF). Allí, se co-inmunizaron ratones con la proteína gamma globulina de pollo formulada por separado con cada adyuvante. Como resultado, se evidenció que tanto los IFN-1 como el ACF eran capaces de estimular la formación de anticuerpos IgG específicos contra la gamma globulina de pollo. Sin embargo, cuando se suministró una mezcla de la proteína de pollo y ACF en ratones knockout para receptores de IFN-1, ACF perdió su capacidad de generar inmunidad mediada por anticuerpos. De acuerdo con este estudio se concluyó que los IFN-1 no solo mejoran la eficacia del adyuvante de Freud, sino que también son mediadores críticos de la acción de este para inducir una respuesta de anticuerpos. Los IFN-1 por su parte, actúan directamente sobre las células B para generar inmunoglobulinas, por lo que perfectamente podrían ser utilizados como adyuvantes únicos en vacunas (258).

Otro resultado relevante obtenido en la evaluación de la respuesta humoral inducida por la inmunización en los animales fue lo observado en la vacunación de terneros con BCG. En estos se evidenció que BCG no indujo respuesta de anticuerpos, por lo que en los ensayos de ELISA no se detectaron IgG que reconocieran a alguna de las proteínas quiméricas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*. Estos resultados coinciden con múltiples investigaciones donde después de haber inmunizado al ganado bovino con BCG se ha medido la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación. En todos ellos se ha evidenciado una ausencia de IgG contra el bPPD o proteínas de *M.bovis* como ESAT-6, CFP-10, MPB70, MBP59, MPB64, MPB83, AcR, PstS-1, pese a que en

algunos casos los animales fueron revacunados con BCG (259–263). La dosis de vacunación de BCG aplicada en los terneros en nuestro estudio si bien fue levemente inferior a la utilizada en algunos de los reportes citados previamente, los resultados fueron equivalentes. La vía de administración subcutánea de BCG empleada en nuestro trabajo también fue la misma aplicada en otras investigaciones donde tampoco se observó respuesta humoral contra BCG. Además, con otras rutas de inoculación de la vacuna BCG en bovinos, como la intradérmica y mucosal (vía respiratoria), se han obtenido los mismos resultados que con la administración subcutánea (264,265). De acuerdo con lo anterior, pareciera que ni la dosis ni la ruta de inoculación fueran factores determinantes en la nula respuesta de anticuerpos inducida por BCG en terneros. No obstante, la edad de los animales al momento de la aplicación de la vacuna pareciera si jugar un rol fundamental en la generación de la respuesta humoral contra BCG. Así lo han demostrado diferentes investigaciones dónde vacas jóvenes (novillas de 1-2 años) han levantado respuesta de anticuerpos frente a la vacunación con BCG. Sin embargo, terneros jóvenes (entre 3 semanas y 6 meses de edad) de forma mayoritaria se ha visto que no tienden a responder contra la vacuna (266). Lo anterior posiblemente debido a que los terneros poseen un sistema inmune inmaduro, lo que limita su capacidad de generar una respuesta de anticuerpos contra BCG (267). Además, se ha evidenciado que los anticuerpos maternos transferidos pasivamente a través del calostro a la cría interferirían con la activación del sistema inmune propio del neonato inhibiendo su capacidad de responder a la vacunación con BCG (268,269).

7.3 Respuesta celular inducida por la vacunación con las proteínas quiméricas en bovinos.

En relación con los análisis celulares realizados mediante citometría a los distintos grupos de terneros inmunizados, se lograron identificar las subpoblaciones de linfocitos T de memoria $CD4^+CD44^+$ y $CD8^+CD44^+$ a partir de

muestras de sangre periférica obtenidas en el día 35 del esquema de vacunación. Tanto en los grupos experimentales vacunados con BCG como aquellos que recibieron las formulaciones DIVA, se observó que la expresión de la población de linfocitos T $CD4^+CD44^+$ fue estadísticamente superior a la detectada en el grupo Placebo. Al comparar dentro de esta misma población de células a los grupos BCG y DIVA IFNα se obtuvo que la respuesta inducida por BCG fue significativamente superior a DIVA IFNα. Por otra parte, para la población $CD8^+CD44^+$ se observó que ninguno de los grupos inmunizados mostró diferencias significativas contra el placebo, ni tampoco entre ellos mismos. Todos los resultados anteriormente mencionados demostrarían que tanto las formulaciones DIVA como BCG tuvieron capacidad de activar una respuesta celular mediada por linfocitos TCD4+, promover su proliferación e inducir una respuesta de memoria contra los antígenos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* caracterizada por los linfocitos T $CD4^+CD44^+$. Diferentes investigaciones en las que se ha estudiado el rol del receptor CD44 han señalado que la expresión de este marcador estaría asociada a la respuesta de memoria contra diferentes antígenos, encontrándose en diversos tipos celulares del sistema inmune, tales como los linfocitos T (270). En estos, el CD44 también estaría relacionado como uno de los marcadores de activación de los linfocitos T más comúnmente identificados, debido a que permite distinguir células T efectoras y T de memoria, de T células inactivadas. Así, al activarse el linfocito T también aumentaría la expresión de CD44 en la superficie de estos (271). Por otro lado, CD44 corresponde a un marcador ampliamente descrito en células efectoras T polifuncionales que cumplen un rol protector contra *M. tuberculosis* y *M. bovis* (272,273). La identificación de los linfocitos T polifuncionales comprenden también la presencia de otros receptores de superficie tales como CD62L, sin embargo, en nuestro trabajo no fue posible evaluar este marcador. De igual modo, esto último no excluiría la posibilidad de que los linfocitos T $CD4^+CD44^+$

identificados en la sangre periférica de los terneros vacunados correspondieran a células polifuncionales. No obstante, para confirmarlo se deben realizar nuevos análisis de citometría a los mismos grupos con el marcador CD62L.

Por otra parte, similar a nuestro trabajo, en un estudio se caracterizó la respuesta celular generada por una vacuna contra el *Mycobacterium avium sp paratuberculosis* (Map) en cabras. Allí, se evidenció que la vacuna indujo la producción de linfocitos T $CD4^+CD44^+$, los que fueron detectados desde PBMCs estimuladas con antígenos Map. La población de linfocitos T $CD4^+CD44^+$ detectados en los animales inmunizados exhibió un incremento de cerca del 20% en comparación con los no vacunados. El incremento de la proliferación de los linfocitos T $CD4^+$ que expresan al receptor CD44 estaría relacionado con una disminución del cuadro generado por la micobacteria, lo que a su vez se correspondería con el rol efector y de memoria que tendrían estas células (271). El porcentaje de células T $CD4^+CD44^+$ obtenidas en el estudio anteriormente mencionado fue inferior al observado en el nuestro, debido a que la formulación BCG quien indujo la mayor producción de esta población celular obtuvo cerca de un 38% y DIVA IFNα un 22% más que el grupo placebo.

Como parte de la respuesta celular inducida por la vacunación en terneros también se analizó el patrón de citocinas proinflamatorias secretadas por los linfocitos T y recuperadas desde el sobrenadante de PBMCs reestimuladas con ambas quimeras. La respuesta celular Th1 mediada principalmente por IFNγ y TNFα, y la respuesta Th17 con la IL-17A participan ejerciendo un rol efector en la respuesta protectora contra *M. bovis*. Las citocinas activan y estimulan la proliferación de los linfocitos T $CD4^+$, T $CD8^+$, macrófagos y células *Natural killer,* entre otras, potenciando en estas últimas su acción bactericida.

De acuerdo con los resultados obtenidos en MILLIPLEX®, se observó que tanto la vacuna BCG como todas las vacunas DIVA, es decir, aquellas que incluyeron

a los antígenos quiméricos *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* tienen capacidad de inducir mayores niveles de IFNγ en comparación al grupo placebo. Sin embargo, solo los terneros vacunados con BCG y la formulación DIVA IFNα produjeron niveles de TNFα e IL-17A estadísticamente superiores a los animales del grupo placebo. Al contrastar estos resultados con otros estudios, se encontró que un grupo de investigadores desarrolló un candidato vacunal H56:IC31 de subunidades que incluía a 3 de nuestros antígenos (Ag85b, ESAT6, Rv2660c) y analizaron la expresión de IFNγ y TNFα en células PBMCs mediante citometría. Los científicos demostraron que la vacunación con el candidato H56:IC31 al igual que con nuestras formulaciones DIVA, estimuló la producción de IFNγ, pero también de TNFα, y otras citocinas proinflamatorias en animales (274).

Las mayores concentraciones de IFNγ, TNFα e IL-17A inducidas por la vacunación con BCG no sería estrictamente un correlato de mejor protección otorgada por esta en contraste con las vacunas DIVA, particularmente con DIVA IFNα, que fue el grupo que comparativamente estuvo más cercano a los niveles de BCG. La evidencia científica ha indicado que una mayor secreción de IFNγ no necesariamente se correlaciona con protección (275). Más bien, la mayor homogeneidad presentada por el grupo BCG en la producción de estas tres citocinas podría considerarse como un factor predictivo de protección contra *M. bovis*. Así lo confirmarían distintas publicaciones donde se evidencia que la secreción simultánea y en niveles similares de IFNγ y TNFα otorgaría mayor potencia a la vacuna mejorando su respuesta protectora contra la bacteria (272,273). Por otra parte, se ha comprobado que vacunas que inducen la producción de IL-17A protegerían contra un desafío con *M. tuberculosis* debido a que la IL-17A tiene la capacidad de disminuir la producción de IL-10 y aumentar la producción de IL-12 impulsando la respuesta Th1 en una infección con la micobacteria. Así, se ha demostrado que la efectividad de la respuesta Th1 es dependiente de las células Th17 productoras de IL-17A, por lo que la inhibición

de la producción de esta citocina aumentaría la susceptibilidad a la infección por tuberculosis (275,276).

7.4 Respuesta cruzada entre las proteínas quiméricas y los antígenos del bPPD de la prueba de la tuberculina.

Otro de los objetivos fundamentales que tenía esta investigación era evaluar la interferencia de las formulaciones vacunales DIVA con el diagnóstico realizado en el ganado mediante la prueba de tuberculina, por lo que se realizaron dos experimentos independientes. El primero implicó realizar ensayos de *Western blot* para establecer si los anticuerpos inducidos por la vacunación tanto de cabras como de terneros con las formulaciones DIVA reconocían a las proteínas presentes en el preparado proteico de *M. bovis* (bPPD) utilizado en la prueba de tuberculina. El segundo experimento involucró la administración de una tuberculina ano caudal (PAC) en todos los animales vacunados durante el ensayo de inmunización realizado en ambas especies animales.

Los resultados obtenidos a partir de los *Western blots* mostraron que en los plasmas pre-inmunes colectados en el día 0, no se detectaron anticuerpos específicos contra ninguno de los antígenos quiméricos, ni tampoco contra el bPPD de la tuberculina. Los terneros utilizados en este trabajo fueron obtenidos desde un predio certificado libre de tuberculosis bovina, por lo que no deberían generar anticuerpos contra las quimeras. Por otra parte, también se comprobó que ni cabras ni terneros inoculados con BCG o con alguna de las formulaciones DIVA, produjeron anticuerpos específicos contra el antígeno bPPD que contiene la tuberculina. Así lo evidenció el análisis realizado a los plasmas colectados en el día 35 del esquema de vacunación. Adicionalmente, los resultados con los plasmas del día 35 dieron cuenta de que las cabras inmunizadas con las vacunas DIVA generaron anticuerpos específicos contra ambas quimeras *qTbA-16MR*A y *qTbA-85ESAT*. Sin embargo, en terneros se observó que todos los animales que recibieron alguna formulación DIVA produjeron anticuerpos sólo contra el

antígeno *qTbA-16MRA*. El grupo DIVA IFNα fue el único que produjo anticuerpos contra *qTbA-85ESAT*, lo que se demostró a través de la detección de una banda inmunoreactiva con el tamaño del antígeno, pero con menor intensidad a la obtenida contra *qTbA-16MRA*. Los resultados se asemejan a los exhibidos en los ensayos de ELISA, donde los terneros inmunizados con las formulaciones DIVA mostraron en general menos títulos de anticuerpos contra la quimera *qTbA-85ESAT* en comparación con *qTbA-16MRA*.

A pesar de que en cabras se comprobó que aquellas que recibieron las formulaciones DIVA, DIVA IFNα y DIVA TNFα produjeron anticuerpos contra ambos antígenos quiméricos, respuesta detectada tanto en ELISA como en *Western blot*, los títulos inducidos por la proteína *qTbA-85ESAT* fueron inferiores. Lo anterior, también se observó en terneros, no obstante, los títulos de anticuerpos inducidos por *qTbA-85ESAT* en esta especie fueron considerablemente menores a los obtenidos contra *qTbA-16MRA*. Esto sugeriría por un lado que la quimera *qTbA-85ESAT* sería menos inmunogénica que *qTbA-16MRA,* lo cual ha sido reportado por otros investigadores (249). Esta aparente menor inmunogenicidad de *qTbA-85ESAT* habría generado una baja o nula producción de anticuerpos contra epítopos lineales de la misma proteína en los terneros inmunizados, lo cual se vería reflejado en la ausencia o baja intensidad de las bandas inmunorreactivas en los *Western blots.* Por otra parte, los resultados también estarían asociados a la menor sensibilidad de la técnica de *Western blot* en comparación a la de *ELISA* (277).

La detección de una banda inmunoreactiva de baja intensidad contra *qTbA-85ESAT* producto de la presencia de anticuerpos específicos en el plasma colectado en el día 35 de los animales vacunados con la formulación DIVA IFNα, se relacionarían al rol inmunomodulador del IFNα. De esta manera, la citocina induciría de manera más eficiente la producción de anticuerpos policlonales en el plasma que reconocieran a epítopos lineales en *qTbA-85ESAT* (254,255). Por

último, al igual que lo obtenido en los ELISA, en los *Western blots* tampoco se logró identificar anticuerpos contra las proteínas *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT* en terneros vacunados con BCG. Esto reafirmaría que la inmunización con BCG no generaría respuesta humoral en los terneros de igual manera en que lo han demostrado otros estudios (259,260,262).

Los resultados obtenidos luego de aplicarles a todos los animales una PAC, mostraron que la vacunación en cabras con las formulaciones DIVA no generó respuesta cruzada con la prueba de tuberculina. Por lo tanto, los animales resultaron negativos al diagnóstico debido a que la zona inoculada con el bPPD presentó un aumento de grosor < 3 mm. Por su parte, en terneros se observó que un solo animal inmunizado con BCG fue negativo al bPPD, y que un ternero del grupo DIVA TNFα resultó reaccionante a la tuberculina. La incorporación de un grupo que recibiera la vacuna BCG en el ensayo en terneros se hizo con el propósito de ser control positivo de interferencia, pues está ampliamente descrito que la inmunización con BCG genera una respuesta cruzada con el bPPD de la tuberculina (278–281). Similarmente a lo reportado en otros trabajos, nuestros resultados comprobarían que la BCG genera interferencia con el diagnóstico de la tuberculina ya que, de los 5 terneros vacunados, 4 fueron reaccionantes.

En un estudio similar donde se vacunó al ganado con BCG y luego se les realizó una prueba de tuberculina ano caudal, se obtuvo que al menos el 50% de los animales inoculados con bPPD resultaron reaccionantes a la prueba. La forma de inoculación y la lectura de la prueba serían factores determinantes en los resultados obtenidos (282). La magnitud y el tipo de respuesta celular inducida por la inoculación del bPPD diferiría según la vía de administración utilizada. Cuando la prueba de la tuberculina es aplicada en la dermis induce un tipo de respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células, las que se acumulan y generan un sitio de inflamación en la zona inoculada. La dermis en general posee una mayor cantidad de células del sistema inmune debido a que

corresponde a una barrera cutánea que esta más expuesta al contacto con patógenos a diferencia del tejido subcutáneo (283). Es por esto mismo que, si el bPPD es aplicado subcutáneo y no intradérmico, la respuesta observada podría ser considerablemente menor generando a su vez menores variaciones en el grosor de la piel, dando lugar a la obtención de resultados falsos negativos. La lectura de la prueba de tuberculina comprende un factor que está sujeto a la manipulación de quien la realiza. Si bien la medición del grosor de la piel a las 72 horas post-administración del bPPD se realiza con un caliper digital, un mínimo cambio en la manipulación de la piel para su medición puede generar cambios en los resultados.

Por otro lado, el *cut off* establecido para la medición de la prueba también comprendería un factor a considerar en la interpretación de los resultados. En la mayoría de los estudios se ha indicado que el *cut off* va de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad en el lugar donde la prueba es aplicada. Esto debido a que la prevalencia de la enfermedad tiene directa incidencia en la sensibilidad de la prueba. Así, en zonas geográficas donde existe mayor prevalencia de tuberculosis bovina en el ganado, generalmente se utilizan valores *cut off* más exigentes (≥ 4 mm). En lugares donde la prevalencia de *M. bovis* es menor se consideran como 'reaccionantes' a aquellos animales que responden a la prueba de tuberculina con valores delta entre 2 y 4 mm (280,284). En nuestro estudio por su parte se utilizó un *cut off* ≥ 3 mm debido a que es el indicado por el SAG en el programa de control y erradicación de bTB implementado en el territorio nacional (285). De acuerdo con los anterior, si el el *cut off* aplicado en este trabajo hubiese sido más bajo (entre 2 y 4 mm) todos los animales del grupo BCG habrían sido considerados reaccionantes a la prueba y en el resto de los grupos inmunizados los resultados serían los mismos.

Por último, la reactividad cruzada exhibida en uno de los terneros inmunizados con la formulación DIVA TNFα con la prueba de tuberculina, podría por un lado

haber ocurrido como una respuesta inespecífica contra bacterias de *E.coli* presentes en la formulación, o por una sensibilización previa frente a micobacterias medioambientales o no tuberculosas. Esto último se respaldaría con estudios que han demostrado una respuesta cruzada en terneros infectados con *Mycobacterium avium subp.paratuberuclosis* contra antígenos del bPPD utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis bovina (286).

7.5 Respuesta protectora inducida por la vacunación de terneros con los antígenos quiméricos contra el desafío con BCG.

Evaluar el nivel de protección conferido por la vacunación de los terneros con las diferentes formulaciones DIVA fue un foco esencial en nuestro estudio, sobre todo en su comparación con la vacuna BCG que actualmente define la base en términos de efectividad para la implementación de nuevas vacunas contra *Mycobacterium bovis*. Para lograr esto, se ejecutó un ensayo de desafío no convencional con la cepa atenuada BCG *Danish* 1331 mediante la inoculación de una dosis de $2.2x10^8$ UFC en el linfonodo preescapular derecho de cada ternero. Se escogió este tipo de desafío debido a que realizar uno con una cepa patogénica de *M. bovis* en animales es costoso, tarda mucho tiempo, requiere de instalaciones BSL3, y demanda la aprobación de la autoridad sanitaria del lugar dónde este se implemente (287). Por lo tanto, la realización de un reto con BCG proveería mayores ventajas comparativas con respecto al realizado con una cepa patogénica. De esta forma, el nivel de protección obtenido con las distintas formulaciones se determinó a través de qPCR dónde se identificó el número de copias del gen MPB70 de *M. bovis* a partir del macerado de los linfonodos desafiados. Este número de copias del gen se consideró directamente proporcional a la carga bacteriana hallada en los tejidos.

Los resultados del reto con BCG mostraron que los animales del grupo placebo fueron los que obtuvieron los mayores números de copias de MPB70 (98.2), por lo tanto, en ellos se encontraría la mayor carga bacteriana. Se esperaba que los

terneros que recibieron la formulación placebo registraran los números de copias de MPB70 más altos debido a que al no haber sido inmunizados con los antígenos quiméricos no habrían sido protegidos contra la bacteria. Por su parte, debido a que los grupos DIVA y DIVA TNFα no obtuvieron diferencias estadísticas en su comparación con el placebo, estas formulaciones no protegerían contra el reto con el patógeno.

El grupo de terneros inmunizados con BCG fueron los que obtuvieron el promedio de copias de MPB70 más bajo (25.74) junto con el grupo DIVA IFNα (27.24). En estos dos últimos grupos se encontraría la menor carga de *M. bovis* en los tejidos de linfonodos. Los promedios del número de copias del gen MPB70 obtenidos por los terneros inmunizados con BCG y DIVA IFNα fueron significativamente inferiores al obtenido en el grupo placebo. Estos resultados sugerirían que tanto la vacunación con BCG como con la formulación DIVA IFNα inducirían mejor protección contra el desafío intranodal con BCG que los grupos DIVA y DIVA IFNα. Por otra parte, al no detectarse diferencias significativas entre la respuesta inducida por la vacuna BCG y DIVA IFNα, podría inferirse que el nivel de protección generado por la formulación DIVA IFNα sería comparable al otorgado por BCG frente a la infección con la bacteria.

Los resultados de protección obtenidos en nuestro trabajo difieren de lo reportado por otros investigadores, los que han utilizado a los antígenos Ag85b, ESAT6, Rv2660c como candidatos vacunales y han comprobado que la fusión de estas proteínas dentro de una misma formulación protegería contra un reto con una cepa patogénica de *M. tuberculosis* (288). En nuestro estudio el grupo DIVA sería el equivalente a la formulación utilizada en el estudio citado más arriba, ya que, incluyó cuatro antígenos de *M. bovis (*Ag85b, ESAT6, Rv2660c, AcR), dónde tres de ellos coinciden con los del estudio mencionado. No obstante, la vacuna DIVA no logró conferir protección en los terneros frente al desafío intranodal con la cepa atenuada de *M. bovis*. La especie animal podría estar siendo un factor

preponderante en la respuesta protectora inducida por la vacunación contra la bacteria, debido a que el primer estudio se realizó en ratones y el nuestro en bovinos. Es más, se ha reportado que la especie murina presentaría cierto grado de resistencia frente a la infección con *M. tuberculosis*, a diferencia de la bovina que es susceptible al patógeno (289). En los animales que recibieron la formulación DIVA se detectó un promedio de copias del gen MPB70 de 66.28, valor que si bien fue inferior al promedio obtenido en el grupo control (98.2), fue superior al obtenido en el grupo DIVA IFNα (27.22). La adición del IFNα a la formulación DIVA (DIVA IFNα) sugiere que este mejoraría la respuesta inducida por los antígenos Ag85b, ESAT6, Rv2660c, AcR (quimeras *qTbA-16MRA* y *qTbA-85ESAT*) y potenciaría la respuesta protectora de la vacuna en su conjunto en su función como inmunomodulador.

Por otra parte, los resultados del reto de los animales se correlacionan con los obtenidos en la respuesta de anticuerpos y la respuesta celular inducida por cada una de las formulaciones vacunales. Allí, se pudo rescatar que la formulación DIVA IFNα estimuló en terneros mayores títulos de anticuerpos y poblaciones de linfocitos de memoria T $CD4^{+}CD44^{+}$, además de las citocinas proinflamatorias IFNγ e IL-17A, en comparación a los animales vacunados con las formulaciones DIVA o DIVA TNFα. Por su parte, a pesar de que la vacuna BCG no levantó respuesta de anticuerpos, se observó que la respuesta celular caracterizada por la secreción de las citocinas IFNγ, TNFα e IL-17A además de haber sido significativamente superior a la generada por las otras formulaciones vacunales (DIVA IFNα, DIVA, DIVA TNFα), fue más consistente. Estos resultados con BCG, de alguna manera concordarían con lo postulado por otros investigadores con respecto a que la protección inducida contra *M. bovis* se fundamentaría en la inmunidad celular (290,291). Sin embargo, los resultados obtenidos con la vacuna DIVA IFNα podrían sugerir algo diferente. Esto debido a que, a pesar de que DIVA IFNα estaba conformada por solo cuatro antígenos de la bacteria

coadyuvados con IFNα, estimuló una respuesta celular y un nivel de protección similar a BCG. A partir de esto, surge la interrogante de si la respuesta humoral caracterizada por los altos títulos de anticuerpos inducidos por la formulación DIVA IFNα en conjunto con la respuesta celular podrían haber mediado la protección otorgada por la vacuna contra el desafío con BCG. Desde hace unos años han ido aumentando las publicaciones que describen el rol protector que cumplen los anticuerpos en infecciones causadas por patógenos intracelulares, específicamente contra micobacterias (292,293). También existen estudios donde se ha probado que por ejemplo altos títulos de anticuerpos IgG contra el antígeno Ag85A de *M. tuberculosis* han estado asociados con la reducción del desarrollo de la fase activa de la enfermedad en niños (294). Estos mismos anticuerpos contra Ag85A se ha visto que han participado en la disminución de lesiones de cavitación en pulmón y en la eliminación del patógeno en el esputo de pacientes con *M. tuberculosis* activo (295). Por otro lado, en pacientes con VIH se ha demostrado que la disminución de anticuerpos contra antígenos de *M. tuberculosis* han aumentado el riesgo de desarrollar la enfermedad (296). Otra evidencia de la importancia de la respuesta de anticuerpos en la tuberculosis lo describe un estudio en el que se evidenció que altos títulos de anticuerpos IgA contra el antígeno AcR de *M. tuberculosis* se relacionarían con una disminución de la severidad de la enfermedad (297) Todos estos estudios aportarían con una nueva perspectiva acerca de la importancia de la respuesta humoral mediada por anticuerpos en la tuberculosis y en cierta forma cambiaría el paradigma establecido en que solo la respuesta celular es responsable de inducir protección frente al patógeno. No obstante, nuestra conjetura requiere de análisis mayores y específicos en torno a la función que cumplirían los anticuerpos inducidos por la vacunación con DIVA IFNα.

8 CONCLUSIONES

- Los antígenos quiméricos qTBA-16MRA y qTBA-85ESAT se expresaron en *E.coli* y se obtienen de forma mayoritaria como cuerpos de inclusión.
- La inmunización de los animales con los antígenos quiméricos qTBA-16MRA y qTBA-85ESAT induce respuesta de anticuerpos IgG, respuesta celular Th1/Th17 y respuesta de memoria mediada por linfocitos T $CD4^{+}CD44^{+}$.
- La citocina IFNα potencia la respuesta humoral y celular inducida por las quimeras qTBA-16MRA y qTBA-85ESAT.
- La vacunación con los antígenos quiméricos TBA-16MRA y qTBA-85ESAT no genera una respuesta cruzada de anticuerpos, ni de hipersensibilidad retardada contra las proteínas del bPPD de la prueba de la tuberculina.
- La formulación DIVA IFNα induce un nivel de protección en terneros similar al provisto por la vacuna BCG contra el modelo de desafío intranodal implementado con la cepa atenuada de *M. bovis*.

9 REFERENCIAS

1. OIE. Oficina Internacional de Epizootias. Tuberculosis bovina. [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 12]. Available from: https://www.woah.org/es/enfermedad/tuberculosis-bovina/

2. Waters WR, Maggioli MF, McGill JL, Lyashchenko KP, Palmer M V. Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. Vet Immunol Immunopathol. 2014;159(3–4):113–32.

3. Esteban J, Muñoz-Egea MC. Mycobacterium bovis and Other Uncommon Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex . Microbiol Spectr. 2016 Dec 23;4(6).

4. Bastos RG, Borsuk S, Seixas FK, Dellagostin OA. Recombinant Mycobacterium bovis BCG. Vol. 27, Vaccine. 2009. p. 6495–503.

5. Ray Waters W, Palmer M V. Mycobacterium bovis infection of cattle and white-tailed deer: Translational research of relevance to human tuberculosis. ILAR J. 2015 May 19;56(1):26–43.

6. Schrager LK, Harris RC, Vekemans J. Research and development of new tuberculosis vaccines: A review [version 1; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]. Vol. 7, F1000Research. F1000 Research Ltd; 2018.

7. ELOIT M. Panorama 2019-1: Eradication of bovine tuberculosis: a One Health issue. Bulletin de l'OIE. 2019 May 30;2019(Panorama-1):1–2.

8. Sibhat B, Asmare K, Demissie K, Ayelet G, Mamo G, Ameni G. Bovine tuberculosis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. Vol. 147, Preventive Veterinary Medicine. Elsevier B.V.; 2017. p. 149–57.

9. Miller RS, Sweeney SJ. Mycobacterium bovis (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: Current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. Vol. 141, Epidemiology and Infection. 2013. p. 1357–70.

10. Verteramo Chiu LJ, Tauer LW, Smith RL, Grohn YT. Assessment of the bovine tuberculosis elimination protocol in the United States. J Dairy Sci. 2019 Mar 1;102(3):2384–400.

11. 12. European FoodSafety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. . 2021.

12. Rivera A. Ocurrencia de la Tuberculosis Bovina en Chile. Servicio Agricola y Ganadero (SAG). 2014.

13. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. Bovine tuberculosis in cattle: Vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. Annu Rev Anim Biosci. 2016 Feb 15;4:87–109.

14. Iturra LC. EVALUACIÓN DEL IMPACTO ECONÓMICO DE LA ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA EN PREDIOS LECHEROS INFECTADOS. 2016.

15. Rahman M, Samad M. Prevalence of bovine tuberculosis and its effects on milk production in Red Chittagong cattle. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine. 1970 Jan 1;6(2):175–8.

16. Mellado M, Reséndiz D, Martínez AM, de Santiago MA, Véliz FG, García JE. Milk yield and reproductive performance of Holstein cows testing positive for bovine tuberculosis. Trop Anim Health Prod. 2015 Aug 27;47(6):1061–6.

17. Poirier V, Rivière J, Bouveret A, Gardon S, Dufour B. Cost-effectiveness assessment of three components of the bovine tuberculosis surveillance system by intradermal tuberculin testing in French cattle farms by a scenario tree approach. Prev Vet Med. 2019 May 1;166:93–109.

18. Paredes LA, Alves E, Luarte C. PROCEDIMIENTO PROYECTO NACIONAL DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA. 2011.

19. Tibesso G. Review on epidemiological features of Mycobaterium bovis at the human, cattle and wildlife interface in Ethiopia. Biom Biostat Int J. 2018 Sep 28;7(5).

20. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, et al. Revisiting the evolution of Mycobacterium bovis. J Bacteriol. 2005 Sep;187(18):6386–95.

21. Joshi D, Harris NB, Waters R, Thacker T, Mathema B, Krieswirth B, et al. Single nucleotide polymorphisms in the Mycobacterium bovis genome resolve phylogenetic relationships. J Clin Microbiol. 2012 Dec;50(12):3853–61.

22. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014;97(S):S5–19.

23. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon S V. Myths and misconceptions: The origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Nat Rev Microbiol. 2009;7(7):537–44.

24. Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim MJ, Homolka S, et al. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. Vol. 8, Cell Host and Microbe. Cell Press; 2010. p. 68–76.

25. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. Proceedings of National Academy of Sciences [Internet]. 2003;100(13):78877–7882. Available from: www.defra.gov.ukanimalh

26. Gormley E, Corner LAL, Costello E, Rodriguez-Campos S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae. Res Vet Sci. 2014;97(S):S30–43.

27. Jarher V, Nlkaldo H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. Vol. 123, FEMS Microbiology Letters. 1994.

28. Van Crevel R, Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG. Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. Vol. 2011, Clinical and Developmental Immunology. 2011.

29. Dorronsoro I, Torroba L, Torroba Álvarez L. Microbiología de la tuberculosis Microbiology of tuberculosis. Vol. 30, An. Sist. Sanit. Navar. 2007.

30. Vivallo IC. TUBERCULOSIS BOVINA. 2009.

31. Aymerich CP, Domínguez Benítez J, Ruiz VA. Mycobacterium bovis. 2011.

32. Velayati AA, Farnia P. The Species Concept. In: Atlas of Myobacterium Tuberculosis [Internet]. Elsevier; 2017. p. 1–16. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128038086000013

33. Doron S, Gorbach SL. B Bacterial Infections: Overview. In 2008. p. 273–82.

34. Lesellier S. Immunological responses of European badgers (Meles Meles) to infection with Mycobacterium bovis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2018 Dec 1;61:9–15.

35. Fine AE, O'Brien DJ, Winterstein SR, Kaneene JB. An Effort to Isolate Mycobacterium bovis from Environmental Substrates during Investigations of Bovine Tuberculosis Transmission Sites (Cattle Farms and Wildlife Areas) in Michigan, USA . ISRN Vet Sci. 2011 Sep 22;2011:1–11.

36. Katale BZ, Mbugi E V., Siame KK, Keyyu JD, Kendall S, Kazwala RR, et al. Isolation and Potential for Transmission of Mycobacterium bovis at Human–livestock–wildlife Interface of the Serengeti Ecosystem, Northern Tanzania. Transbound Emerg Dis. 2017 Jun 1;64(3):815–25.

37. Pollock JM, Rodgers JD, Welsh MD, McNair J. Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. In: Veterinary Microbiology. 2006. p. 141–50.

38. Kao RR, Gravenor MB, Charleston B, Hope JC, Martin M, Howard CJ. Mycobacterium bovis shedding patterns from experimentally infected calves and the effect of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus. J R Soc Interface. 2007 Jun 22;4(14):545–51.

39. Ramos JM, Heinemann MB, Neto JSF, Filho AFDS, Cárdenas NC, Alves CJ, et al. Isolamento e identificação de Mycobacterium bovis em leite de vacas no Nordeste do Brasil. Ciencia Rural. 2016 Dec 1;46(12):2166–9.

40. Domingo M, Vidal E, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. Res Vet Sci. 2014;97(S):S20–9.

41. Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P. Isolation of Mycobacterium bovis and M. Tuberculosis from cattle of some farms in North India-Possible relevance in human health Elsevier book series on plant biostimulants View project

Analysis of host-pathogen interaction in leaf rust infection of wheat: a tanscriptomic approach View project [Internet]. Article in The Indian Journal of Medical Research. 2008. Available from: https://www.researchgate.net/publication/23284371

42. Olea-Popelka F, Muwonge A, Perera A, Dean AS, Mumford E, Erlacher-Vindel E, et al. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by Mycobacterium bovis—a call for action. Vol. 17, The Lancet Infectious Diseases. Lancet Publishing Group; 2017. p. e21–5.

43. Vayr F, Martin-Blondel G, Savall F, Soulat JM, Deffontaines G, Herin F. Occupational exposure to human Mycobacterium bovis infection: A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Jan 1;12(1).

44. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Early Lesion Formation in Cattle Experimentally Infected with Mycobacterium hovis. Vol. 119, J. Comp. Path. 1998.

45. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. In: Tuberculosis. Churchill Livingstone; 2001. p. 79–86.

46. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. Vol. 4, Mucosal Immunology. 2011. p. 271–8.

47. Pollock JM, Pollock DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, et al. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-Mycobacterium bovis infection in cattle. Immunology. 196AD;87:236–41.

48. Ash LR, Orihel TC, Savioli Lorenzo, World Health Organization. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. In World Health Organization; 1994. p. 9.

49. Milne GM, Graham J, Allen A, Lahuerta-Marin A, McCormick C, Presho E, et al. Spatiotemporal analysis of prolonged and recurrent bovine tuberculosis breakdowns in Northern Irish cattle herds reveals a new infection hotspot. Spat Spatiotemporal Epidemiol. 2019 Feb 1;28:33–42.

50. Liebana E, Johnson L, Gough J, Durr P, Jahans K, Clifton-Hadley R, et al. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. Veterinary Journal. 2008 Jun;176(3):354–60.

51. Allen AR, Skuce RA, Byrne AW. Bovine tuberculosis in Britain and Ireland - A perfect storm? The confluence of potential ecological and epidemiological impediments to controlling a chronic infectious disease. Front Vet Sci. 2018 Jun 5;5(JUN).

52. Garro CJ, Garbaccio SG. Tuberculosis generalizada en un bovino de leche: reporte de caso. Revista Argentina de Producción Animal. 2015;35(1):63–82.

53. Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. In: Veterinary Microbiology. 2006. p. 151–61.

54. Maulén NP. Factores de virulencia de Mycobacterium tuberculosis Virulence factors of Mycobacterium tuberculosis. Vol. 139, Rev Med Chile. 2011.

55. Yu X, Xie J. Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of Mycobacterium tuberculosis-host interaction from a systems biology perspective. Vol. 24, Cellular Signalling. 2012. p. 1841–6.

56. Carlsson F, Joshi SA, Rangell L, Brown EJ. Polar localization of virulence-related Esx-1 secretion in mycobacteria. PLoS Pathog. 2009 Jan;5(1).

57. Refai A, Gritli S, Barbouche MR, Essafi M. Mycobacterium tuberculosis virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the anti-inflammatory M2 phenotype. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Sep 18;8(SEP).

58. Samten B, Wang X, Barnes PF. Mycobacterium tuberculosis ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses. Tuberculosis. 2009 Dec;89(SUPPL.1).

59. Kwon BE, Ahn JH, Min S, Kim H, Seo J, Yeo SG, et al. Development of new preventive and therapeutic vaccines for tuberculosis. Vol. 18, Immune Network. Korean Association of Immunologists; 2018.

60. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M. Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis: Novel targets for drug development? Vol. 5, Future Microbiology. 2010. p. 1581–97.

61. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama ,Kuni, Brennan PJ, Besra GS. Role of the Major Antigen of Mycobacterium tuberculosis in Cell Wall Biogenesis. Science (1979) [Internet]. 1997;276:2074. Available from: www.sciencemag.org

62. Karbalaei Zadeh Babaki M, Soleimanpour S, Rezaee SA. Antigen 85 complex as a powerful Mycobacterium tuberculosis immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine design. Vol. 112, Microbial Pathogenesis. Academic Press; 2017. p. 20–9.

63. Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao RL, Harrell MI, Schoolnik GK. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding ⎵-crystallin. Proceedings of National Academy of Science

[Internet]. 2001;98(13):7534–9. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.261577598

64. Singh S, Saraav I, Sharma S. Immunogenic potential of latency associated antigens against Mycobacterium tuberculosis. Vaccine. 2014 Feb 3;32(6):712–6.

65. Yuan Y, Crane DD, Iii CEB. Stationary Phase-Associated Protein Expression in Mycobacterium tuberculosis: Function of the Mycobacterial-Crystallin Homolog [Internet]. Vol. 178, JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1996. Available from: https://journals.asm.org/journal/jb

66. Spratt JM, Britton WJ, Triccas JA. In vivo persistence and protective efficacy of the bacille Calmette Guerin vaccine overexpressing the HspX latency antigen. Bioeng Bugs. 2010;1(1):61–5.

67. Mushtaq K, Sheikh JA, Amir M, Khan N, Singh B, Agrewala JN. Rv2031c of Mycobacterium tuberculosis: A master regulator of Rv2028-Rv2031 (HspX) operon. Front Microbiol. 2015;6(APR).

68. Geluk A, May YL, Van Meijgaarden KE, Leyten EMS, Franken KLMC, Ottenhoff THM, et al. T-cell recognition of the HspX protein of Mycobacterium tuberculosis correlates with latent M. tuberculosis infection but not with M. bovis BCG vaccination. Infect Immun. 2007 Jun;75(6):2914–21.

69. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, Zhu Y, Hickey MJ, Sherman DR, et al. The 16-kDa-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages. Proceeding of National Academy of Sciences [Internet]. 1998;95:9578–83. Available from: www.pnas.org.

70. Raman B, Ramakrishna T, Rao CM. Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. FEBS Lett. 1995;365:133–6.

71. Spratt JM, Britton WJ, Triccas JA. In vivo persistence and protective efficacy of the bacille Calmette Guerin vaccine overexpressing the HspX latency antigen. Bioeng Bugs. 2010;1(1):61–5.

72. Betts J, Lukey P, Robb L, McAdam R, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling. Mol Microbiol. 2002;43(3):717–31.

73. Lin PL, Dietrich J, Tan E, Abalos RM, Burgos J, Bigbee C, et al. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent Mycobacterium tuberculosis infection. Journal of Clinical Investigation. 2012 Jan 3;122(1):303–14.

74. Govender L, Abel B, Hughes EJ, Scriba TJ, Kagina BMN, de Kock M, et al. Higher human CD4 T cell response to novel Mycobacterium tuberculosis latency associated antigens Rv2660 and Rv2659 in latent infection compared with tuberculosis disease. Vaccine. 2010 Dec 10;29(1):51–7.

75. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).

76. Widdison S, Watson M, Coffey TJ. Early response of bovine alveolar macrophages to infection with live and heat-killed Mycobacterium bovis. Dev Comp Immunol. 2011 May;35(5):580–91.

77. Astarie-Dequeker C, Elsa-Noah N'diaye *, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. Vol. 67, INFECTION AND IMMUNITY. 1999.

78. Schlesinger LS. Entry of Mycobacterium tuberculosis into Mononuclear Phagocytes. In: Tuberculosis. 1996.

79. Narayanan S, Vishwanath V, Narayanan PR. Current Science Association Differential expression of a unique protein by intracellular Mycobacterium tuberculosis. Vol. 81, Source: Current Science. 2001.

80. Barber-Mayer KD, Barber DL. Innate and adaptive cellular immune responses to Mycobacterium tuberculosis infection. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Dec 1;5(12).

81. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. Vol. 6, Microbes and Infection. Elsevier Masson SAS; 2004. p. 1382–7.

82. Hoppstädter J, Dembek A, Linnenberger R, Dahlem C, Barghash A, Fecher-Trost C, et al. Toll-Like Receptor 2 Release by Macrophages: An Anti-inflammatory Program Induced by Glucocorticoids and Lipopolysaccharide. Front Immunol. 2019;10:1634.

83. van der Meer AJ, Zeerleder S, Blok DC, Kager LM, Lede IO, Rahman W, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with pulmonary tuberculosis. Vol. 18, Respiratory Research. BioMed Central Ltd.; 2017.

84. Su R, Peng YP, Deng Z, Deng YT, Ye JQ, Guo Y, et al. Mycobacterium tuberculosisinfection induces low-density granulocyte generation by promoting neutrophil extracellular trap formation via ROS pathway. Front Microbiol. 2019;10(JULY).

85. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis. 2009 Jan;89(1):29–37.

86. Araźna M, Pruchniak MP, Demkow U. Reactive oxygen species, granulocytes, and netosis. Adv Exp Med Biol. 2015;836:1–7.

87. Salgame P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. Curr Opin Immunol. 2005;17(4 SPEC. ISS.):374–80.

88. Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in mycobacterium Tuberculosis infection. Adv Exp Med Biol. 2013;783:225–50.

89. Achkar JM, Casadevall A. Antibody-mediated immunity against tuberculosis: Implications for vaccine development. Vol. 13, Cell Host and Microbe. Cell Press; 2013. p. 250–62.

90. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. Vol. 39, European Journal of Immunology. 2009. p. 676–86.

91. Achkar JM, Chan J, Casadevall A. Role of B cells and antibodies in acquired immunity against Mycobacterium tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5(3).

92. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, et al. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with Mycobacterium bovis BCG and Infected with M. bovis. Infect Immun. 2004 May;72(5):2462–7.

93. Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, Schröder U, Källenius G, Svenson SB. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab′)2 fragment prolong survival of mice infected with Mycobacterium tuberculosis. Clin Exp Immunol. 2004 Oct;138(1):30–8.

94. Mcnair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock JM. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. Scand J Immunol. 2001;53(4):365–71.

95. Lyashchenko KP, Grandison A, Keskinen K, Sikar-Gang A, Lambotte P, Esfandiari J, et al. Identification of Novel Antigens Recognized by Serum Antibodies in Bovine Tuberculosis [Internet]. 2017. Available from: https://doi.org/10

96. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, et al. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with Mycobacterium bovis BCG and Infected with M. bovis. Infect Immun. 2004 May;72(5):2462–7.

97. Zhao J, Shiratori B, Okumura M, Yanai H, Matsumoto M, Nakajima C, et al. Difference in Antibody Responses to Mycobacterium tuberculosis Antigens in Japanese Tuberculosis Patients Infected with the Beijing/Non-Beijing Genotype. J Immunol Res. 2017;2017.

98. Pollock JM, Neill SD. Mycobacterium bovis infection and tuberculosis in cattle. Vol. 163, Veterinary Journal. 2002. p. 115–27.

99. Buza J, Kiros T, Zerihun A, Abraham I, Ameni G. Vaccination of calves with Mycobacteria bovis Bacilli Calmete Guerin (BCG) induced rapid increase in the proportion of peripheral blood γδ T cells. Vet Immunol Immunopathol. 2009 Aug 15;130(3–4):251–5.

100. Orme I and Cooper A. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol Today. 1999;20(7):307.

101. Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet Microbiol. 2006 Feb 25;112(2-4 SPEC. ISS.):151–61.

102. Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. Vol. 33, Immunity. 2010. p. 451–63.

103. Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. Vol. 9, Nature Reviews Immunology. 2009. p. 153–61.

104. Maggioli MF, Palmer M V., Thacker TC, Vordermeier HM, Waters WR. Characterization of effector and memory T cell subsets in the immune response to bovine tuberculosis in cattle. PLoS One. 2015 Apr 16;10(4).

105. Olin MR, Choi KH, Lee J, Molitor TW. γδ T-lymphocyte cytotoxic activity against Mycobacterium bovis analyzed by flow cytometry. J Immunol Methods. 2005;297(1–2):1–11.

106. McGill JL, Sacco RE, Baldwin CL, Telfer JC, Palmer M V., Ray Waters W. The role of gamma delta T cells in immunity to Mycobacterium bovis infection in cattle. Vet Immunol Immunopathol. 2014;159(3–4):133–43.

107. Smith RA, Kreeger JM, Alvarez AJ, Goin JC, Davis WC, Whipple DL, et al. Role of CD8+ and WC-1+ γ/δ T cells in resistance to Mycobacterium bovis infection in the SCID-bo mouse. J Leukoc Biol. 1999;65(1):28–34.

108. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, et al. Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung. The Journal of Immunology. 2010 Apr 15;184(8):4414–22.

109. Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Bianco MV, Meikle V, Garbaccio S, et al. Assessment of the immune responses induced in cattle after inoculation of a Mycobacterium bovis strain deleted in two mce2 genes. J Biomed Biotechnol. 2012;2012.

110. Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, van Kaer L, et al. Early secreted antigen ESAT-6 of mycobacterium tuberculosis promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. PLoS Pathog. 2011 Nov;7(11).

111. Teixeira FM, Teixeira HC, Ferreira AP, Rodrigues MF, Azevedo V, Macedo GC, et al. DNA vaccine using Mycobacterium bovis Ag85B antigen induces partial protection against experimental infection in BALB/c mice. Clinical and Vaccine Immunology. 2006 Aug;13(8):930–5.

112. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KLMC, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, et al. Identification of Major Epitopes of Mycobacterium tuberculosis AG85B That Are Recognized by HLA-A*0201-Restricted CD8+ T Cells in HLA-Transgenic Mice and Humans . The Journal of Immunology. 2000 Dec 1;165(11):6463–71.

113. Olsen AW, Van Pinxteren LAH, Okkels LM, Rasmussen PB, Andersen P. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. Infect Immun. 2001;69(5):2773–8.

114. Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 Subunit Vaccination against Mycobacterium tuberculosis Downloaded from [Internet]. Vol. 68, INFECTION AND IMMUNITY. 2000. Available from: http://iai.asm.org/

115. Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, Williams A, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. Nat Med. 2003 May 1;9(5):533–9.

116. Andersen P, Heron I. Specificity of a Protective Memory Immune Response against Mycobacterium tuberculosis. INFECTION AND IMMUNITY. 1993.

117. Minion FC, Menon SA, Mahairas GG, Wannemuehler MJ. Enhanced murine antigen-specific gamma interferon and immunoglobulin G2a responses by using mycobacterial ESAT-6 sequences in DNA vaccines. Infect Immun. 2003 Apr 1;71(4):2239–43.

118. Khera A, Singh R, Shakila H, Rao V, Dhar N, Narayanan PR, et al. Elicitation of efficient, protective immune responses by using DNA vaccines against tuberculosis. Vaccine. 2005 Dec 1;23(48–49):5655–65.

119. West NP, Thomson SA, Triccas JA, Medveczky CJ, Ramshaw IA, Britton WJ. Delivery of a multivalent scrambled antigen vaccine induces broad spectrum immunity and protection against tuberculosis. Vaccine. 2011 Oct 13;29(44):7759–65.

120. Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, van Kaer L, et al. Early secreted antigen ESAT-6 of mycobacterium tuberculosis promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. PLoS Pathog. 2011 Nov;7(11).

121. Dietrich J, Vingsbo Lundberg C, Andersen P. TB vaccine strategies-What is needed to solve a complex problem? Tuberculosis. 2006 May;86(3-4 SPEC. ISS.):163–8.

122. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, García JS, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, et al. Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. Vol. 4, Virulence. Taylor and Francis Inc.; 2013. p. 3–66.

123. Flynn JAL, Chan J. Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: Living with the enemy. Vol. 15, Current Opinion in Immunology. Elsevier Ltd; 2003. p. 450–5.

124. Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, Xu YP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by Acanthopanax senticosus extract in RAW264.7 macrophages. J Ethnopharmacol. 2008 Jul 23;118(2):231–6.

125. Macmicking JD, North RJ, Lacourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis (Mycobacterium tuberculosisinfectious disease). Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 1997;94:5243–8. Available from: www.pnas.org.

126. Ehrt S, Shiloh MU, Ruan J, Choi M, Gunzburg S, Nathan C, et al. A Novel Antioxidant Gene from Mycobacterium tuberculosis [Internet]. Vol. 186, J. Exp. Med. 1997. Available from: http://www.jem.org

127. McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA, Carlsson F, Cheng TL, Cox JS, et al. A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. PLoS Pathog. 2007 Aug;3(8):1051–61.

128. Braunstein M, Benjamin †, Espinosa J, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. Vol. 48, Molecular Microbiology. 2003.

129. Kurtz S, McKinnon KP, Runge MS, Ting JPY, Braunstein M. The SecA2 secretion factor of Mycobacterium tuberculosis promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. Infect Immun. 2006 Dec;74(12):6855–64.

130. Trejo Márquez H, Gorocica P, Porras F, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. Bases moleculares de la interacción de Mycobacterium tuberculosis con los macrófagos. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2003;16(1):41–7.

131. Russell D, VanderVen B, Glennie S, Mwandumba H, Heyderman R. The macrophage marches on its phagosome: dynamic assays of phagosome function. Nature Reviews of Immunology [Internet]. 2009;9. Available from: www.nature.com/reviews/immunol

132. Vieira O V., Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, Gruenberg J, et al. Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase. Mol Cell Biol. 2003 Apr 1;23(7):2501–14.

133. Vergne I, Chua J, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis Phagosome Maturation Arrest: Selective Targeting of PI3P-Dependent Membrane Trafficking. Traffic . 2003;4:600–6.

134. Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Särndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, et al. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. Infect Immun. 2008 Jul;76(7):2882–7.

135. Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, et al. Survival of Mycobacteria in Macrophages Is Mediated by Coronin 1-Dependent Activation of Calcineurin. Cell. 2007 Jul 13;130(1):37–50.

136. MacGurn JA, Cox JS. A genetic screen for Mycobacterium tuberculosis mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. Infect Immun. 2007 Jun;75(6):2668–78.

137. Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca 2+/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. Journal of Experimental Medicine. 2003 Aug 18;198(4):653–9.

138. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. Vol. 37, Trends in Immunology. Elsevier Ltd; 2016. p. 724–37.

139. Moreno C, Mehlert A, Lamb J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. Vol. 74, Clin. exp. Immunol. 1988.

140. Wojciechowski W, DeSanctis J, Skamene E, Radzioch D. Attenuation of MHC Class II Expression in Macrophages Infected with Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Involves Class II Transactivator and Depends on the Nramp1 Gene . The Journal of Immunology. 1999 Sep 1;163(5):2688–96.

141. Myllymäki H, Niskanen M, Oksanen KE, Rämet M. Animal models in tuberculosis research-where is the beef? Vol. 10, Expert Opinion on Drug Discovery. Taylor and Francis Ltd.; 2015. p. 871–83.

142. Hmama Z, Gabathuler R, Jefferies WA, Gary De Jong ¶, Reiner NE. Attenuation of HLA-DR Expression by Mononuclear Phagocytes Infected with Mycobacterium tuberculosis Is Related to Intracellular Sequestration of Immature Class II Heterodimers 1 [Internet]. Vol. 161, tuberculosis. The Journal of Immunology. 1998. Available from: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/161/9/4882/1095252/im219804882o.pdf

143. Chang ST, Linderman JJ, Kirschner DE. Multiple mechanisms allow Mycobacterium tuberculosis to continuously inhibit MHC class II-mediated

antigen presentation by macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2005;102(12):4530–5. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0500362102

144. Lim A, Eleuterio M, Hutter B, Murugasu-Oei B, Dick T. Oxygen Depletion-Induced Dormancy in Mycobacterium bovis BCG. Vol. 181, JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 1999.

145. Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, Harrell MI, Dolganov GM, Sherman DR, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. Journal of Experimental Medicine. 2003 Sep 1;198(5):705–13.

146. Park HD, Guinn KM, Harrell MI, Liao R, Voskuil MI, Tompa M, et al. Rv3133c/ dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis [Internet]. Vol. 48, Molecular Microbiology. 2003. Available from: http://genolist.pasteur.fr/TubercuList

147. Rustad TR, Harrell MI, Liao R, Sherman DR. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 2008 Jan 30;3(1).

148. Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WGJ, Sherman DR. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Biological Chemistry. 2004 May 28;279(22):23082–7.

149. Sherman D, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell M, Schoolnik G. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding ⎵-crystallin. Proceedings of the National Academy of Sciences [Internet]. 2001;98(13):7534–9. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.261577598

150. Manganelli R, Voskuil M, Schoolnik G, Dubnau E, Gomez M, Smith I. Role of the extracytoplasmic-function s Factor sH in Mycobacterium tuberculosis global gene expression. Mol Microbiol. 2002;45(2):365–74.

151. Hu Y, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD, et al. Detection of mRNA Transcripts and Active Transcription in Persistent Mycobacterium tuberculosis Induced by Exposure to Rifampin or Pyrazinamide Downloaded from [Internet]. Vol. 182, JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 2000. Available from: http://jb.asm.org/

152. Lee NH, Lee JA, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee JB. A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. Clin Exp Vaccine Res. 2012;1(1):18.

153. Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Vol. 5, Human Vaccines. 2009. p. 70–8.

154. Melnick JL. SESSION II Live Attenuated Oral Poliovirus Vaccine. Rev Infect Dis [Internet]. 1984;6(2). Available from: http://cid.oxfordjournals.org/

155. Lee NH, Lee JA, Park SY, Song CS, Choi IS, Lee JB. A review of vaccine development and research for industry animals in Korea. Clin Exp Vaccine Res. 2012;1(1):18.

156. Hong SH, Byun YH, Nguyen CT, Kim SY, Seong BL, Park S, et al. Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. Vaccine. 2012 Jan 5;30(2):466–74.

157. Stratton KRJ, Howe C, Johnston RB. Adverse Events Associated with Childhood Vaccines. Adverse Events Associated with Childhood Vaccines. National Academies Press; 1994.

158. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Vol. 45, Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica; 2012. p. 1102–11.

159. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. Vol. 364, International Journal of Pharmaceutics. 2008. p. 272–80.

160. Pérez O, Batista-Duharte A, González E, Zayas C, Balboa J, Cuello M, et al. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. Vol. 45, Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica; 2012. p. 681–92.

161. Hansson M, Nygren PÅ, Ståhl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnol Appl Biochem. 2000 Oct 1;32(2):95.

162. Michel ML, Tiollais P. Vaccins anti-hépatite B: efficacité protectrice et outil thérapeutique potentiel. Pathologie Biologie. 2010 Aug;58(4):288–95.

163. Zoth SC, Leunda MR, Odeón A, Taboga O. Recombinant E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus induces a solid humoral neutralizing immune response but fails to confer total protection in cattle [Internet]. Vol. 40, Braz J Med Biol Res. Available from: www.bjournal.com.br

164. Jang JW, Lee CY, Kim I hwan, Choi JG, Lee YJ, Yuk SS, et al. Optimized clade 2.3.2.1c H5N1 recombinant-vaccine strains against highly pathogenic avian influenza. J Vet Sci. 2017;18:299–306.

165. Cassidy-Hanley DM. Recombinant subunit vaccines: Potentials and constraints [Internet]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/7781793

166. Viret JFO, Cryz SJ, Favre D. Expression of Shigella sonnei lipopolysaccharide in Vibrio cholerae. Mol Microbiol. 1996;19(5):949–63.

167. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. Methods in Molecular Biology. 2012;824:329–58.

168. Makrides SC. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli †. Microbiol Rev. 1996;60(3):512–38.

169. Khan KH. Gene expression in mammalian cells and its applications. Adv Pharm Bull. 2013;3(2):257–63.

170. Alejandra Álvarez M. Los sistemas vegetales como plataformas de producción de proteínas de interés para la industria farmacéutica. Dominguezia. 2020;36(2).

171. Curtiss Iii R, Xin W, Li Y, Kong W, Wanda SY, Gunn B, et al. New Technologies in Using Recombinant Attenuated Salmonella Vaccine Vectors. Crit Rev Immunol. 2010;30(3):255–70.

172. Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AVS. Viral vectors as vaccine platforms: Deployment in sight. Curr Opin Immunol. 2011 Jun;23(3):377–82.

173. Kim BJ, Kim BR, Kook YH, Kim BJ. Development of a live recombinant BCG expressing human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gag using a pMyong2 vector system: Potential use as a novel HIV-1 vaccine. Front Immunol. 2018 Mar 27;9(MAR).

174. Hayat Khan K. DNA vaccines: roles against diseases [Internet]. Vol. 3, www.germs.ro • GERMS. 2013. Available from: www.germs.ro

175. Abaitua F, Rodríguez JR, Garzón A, Rodríguez D, Esteban M. Improving recombinant MVA immune responses: Potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. Virus Res. 2006 Mar;116(1–2):11–20.

176. Goldblatt D. Conjugate vaccines. Clin Exp Immunol [Internet]. 2000;119:1–3. Available from: https://academic.oup.com/cei/article/119/1/1/6461851

177. Joaquín LH, Quevedo M, Clara L, Manrique M, Roberto L, Abdala Díaz T, et al. ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS. Vol. 18, Rev Cubana Invest Biomed. 1999.

178. Staats HF, Bradney CP, Gwinn WM, Jackson SS, Sempowski GD, Liao HX, et al. Cytokine Requirements for Induction of Systemic and Mucosal CTL After Nasal Immunization. The Journal of Immunology. 2001 Nov 1;167(9):5386–94.

179. Chambers MA, Graham SP, La Ragione RM. Challenges in veterinary vaccine development and immunization. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2016. p. 3–35.

180. Idriss HT, Naismith JH. TNF and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). Vol. 50, Microsc. Res. Tech. 2000.

181. Del Tnf-A P, Tuberculosis EAY. Polimorfismo del TNF-α α α α α en autoinmunidad y tuberculosis. Vol. 24, Biomédica. 2004.

182. Gupta S, Termini JM, Kanagavelu S, Stone GW. Design of vaccine adjuvants incorporating TNF superfamily ligands and TNF superfamily molecular mimics. Immunol Res. 2013 Dec;57(1–3):303–10.

183. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Nomura T, Yoshida T, et al. The use of a mutant TNF-α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. Biomaterials. 2009 Oct;30(29):5869–76.

184. Su B, Wang J, Wang X, Jin H, Zhao G, Ding Z, et al. The effects of IL-6 and TNF-α as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination. Vaccine. 2008 Sep 19;26(40):5111–22.

185. Gibbert K, Schlaak JF, Yang D, Dittmer U. IFN-α subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy. Vol. 168, British Journal of Pharmacology. 2013. p. 1048–58.

186. Toledo JR, Barrera M, Farnós O, Gómez S, Rodríguez MP, Aguero F, et al. Human αIFN co-formulated with milk derived E2-CSFV protein induce early full protection in vaccinated pigs. Vaccine. 2010 Nov 23;28(50):7907–14.

187. Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, et al. Differentiation between Mycobacterium bovis BCG-Vaccinated and M. bovis-Infected Cattle by Using Recombinant Mycobacterial Antigens. Vol. 6, CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY. 1999.

188. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. Vol. 65, Advanced Drug Delivery Reviews. 2013. p. 1357–69.

189. Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Ghazvini K, Eydgahi MRA, Sankian M, et al. APC targeting enhances immunogenicity of a novel multistage Fc-fusion tuberculosis vaccine in mice. Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Dec 1;99(24):10467–80.

190. Hope JC, Vordermeier HM. Vaccines for bovine tuberculosis: Current views and future prospects. Vol. 4, Expert Review of Vaccines. Future Drugs Ltd; 2005. p. 891–903.

191. Hope JC, Villarreal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2008 Mar;31(2–3):77–100.

192. Parlane NA, Buddle BM. Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. Vol. 2, Current Clinical Microbiology Reports. Springer; 2015. p. 44–53.

193. Rizzi C, Bianco MV, Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Montenegro V, et al. Vaccination with a BCG Strain Overexpressing Ag85B Protects Cattle against Mycobacterium bovis Challenge. PLoS One. 2012 Dec 10;7(12).

194. Khatri B, Whelan A, Clifford D, Petrera A, Sander P, Vordermeier HM. BCG δzmp1 vaccine induces enhanced antigen specific immune responses in cattle. Vaccine. 2014 Feb 7;32(7):779–84.

195. Khare S, Hondalus MK, Nunes J, Bloom BR, Garry Adams L. Mycobacterium bovis ΔleuD auxotroph-induced protective immunity against tissue colonization, burden and distribution in cattle intranasally challenged with Mycobacterium bovis Ravenel S. Vaccine. 2007 Feb 26;25(10):1743–55.

196. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, De Lisle GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. Vol. 20, Vaccine. 2002.

197. Maue AC, Waters WR, Palmer M V., Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, et al. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with Mycobacterium bovis BCG confers protection to cattle challenged with virulent M. bovis. Vaccine. 2007 Jun 11;25(24):4735–46.

198. Skinner MA, Parlane N, Mccarthy A, Agresearch BMB. Cytotoxic T-cell responses to Mycobacterium bovis during experimental infection of cattle with bovine tuberculosis. Immunology. 2003;110:234–41.

199. Wedlock DN, Denis M, Skinner MA, Koach J, De Lisle GW, Martin Vordermeier H, et al. Vaccination of cattle with a CpG oligodeoxynucleotide-formulated mycobacterial protein vaccine and Mycobacterium bovis BCG induces levels of protection against bovine tuberculosis superior to those induced by vaccination with BCG alone. Infect Immun. 2005 Jun;73(6):3540–6.

200. Wedlock DN, Denis M, Painter GF, Ainge GD, Vordermeier HM, Hewinson RG, et al. Enhanced protection against bovine tuberculosis after coadministration of Mycobacterium bovis BCG with a mycobacterial protein vaccine-adjuvant combination but not after coadministration of adjuvant alone. Clinical and Vaccine Immunology. 2008 May;15(5):765–72.

201. Waters WR, Palmer M V., Buddle BM, Vordermeier HM. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. Vol. 30, Vaccine. 2012. p. 2611–22.

202. Vordermeier HM, Jones GJ, Buddle BM, Hewinson RG, Villarreal-Ramos B. Bovine tuberculosis in cattle: Vaccines, DIVA tests, and host biomarker discovery. Annu Rev Anim Biosci. 2016 Feb 15;4:87–109.

203. Waters WR, Palmer M V., Nonnecke BJ, Thacker TC, Scherer CFC, Estes DM, et al. Efficacy and immunogenicity of Mycobacterium bovis ΔRD1 against aerosol M. bovis infection in neonatal calves. Vaccine. 2009 Feb 18;27(8):1201–9.

204. Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Cockle PJ, McAulay M, Rhodes SG, Thacker T, et al. Viral booster vaccines improve Mycobacterium bovis BCG-induced protection against bovine tuberculosis. Infect Immun. 2009 Aug;77(8):3364–73.

205. Stenger S, Rosat JP, Bloom B, Krensky A, Modlin R. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. Immunol Today. 1999;20(9).

206. Rizzi C, Bianco MV, Blanco FC, Soria M, Gravisaco MJ, Montenegro V, et al. Vaccination with a BCG Strain Overexpressing Ag85B Protects Cattle against Mycobacterium bovis Challenge. PLoS One. 2012 Dec 10;7(12).

207. Khatri B, Whelan A, Clifford D, Petrera A, Sander P, Vordermeier HM. BCG δzmp1 vaccine induces enhanced antigen specific immune responses in cattle. Vaccine. 2014 Feb 7;32(7):779–84.

208. Ramos DF, Silva PEA, Dellagostin OA. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Brazilian Journal of Biology. 2015;75(4):830–7.

209. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesseling AC, Beyers N, Wasserman E, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. Clinical Infectious Diseases. 2008 Jul 15;47(2):203–7.

210. Gormley E, Corner LAL, Costello E, Rodriguez-Campos S. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of Mycobacterium bovis and Mycobacterium caprae. Res Vet Sci. 2014;97(S):S30–43.

211. Dos L, Medeiros S, Dray Marassi C, Eustáquio ; Eduardo, Figueiredo S, Lilenbaum ; Walter. POTENTIAL APPLICATION OF NEW DIAGNOSTIC METHODS FOR CONTROLLING BOVINE TUBERCULOSIS IN BRAZIL. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41:531–41.

212. Ramos DF, Silva PEA, Dellagostin OA. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Brazilian Journal of Biology. 2015;75(4):830–7.

213. Zanini M, Moreira E, Lopes M, Oliveira R, Leão S, Fioravanti R, et al. Mycobacterium bovis: Polymerase Chain Reaction Identification in Bovine Lymphonode Biopsies and Genotyping in Isolates from Southeast Brazil by

Spolygotyping and Restriction Fragment Length Polymorphism. Vol. 96, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001.

214. Michelet L, de Cruz K, Karoui C, Tambosco J, Moyen JL, Hénault S, et al. Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. PLoS One. 2018 Nov 1;13(11).

215. Faye S, Moyen JL, Gares H, Benet JJ, Garin-Bastuji B, Boschiroli ML. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFNγ assay (Bovigam®) in a low prevalence area in France. Vet Microbiol. 2011 Jul 5;151(1–2):60–7.

216. Verma AK, Tiwari R, Chakraborty S, Neha, Saminathan M, Dhama K, et al. Insights into bovine tuberculosis (bTB), various approaches for its diagnosis, control and its public health concerns: An update. Asian J Anim Vet Adv. 2014;9(6):323–44.

217. Praud A, Boschiroli ML, Meyer L, Garin-Bastuji B, Dufour B. Assessment of the sensitivity of the gamma-interferon test and the single intradermal comparative cervical test for the diagnosis of bovine tuberculosis under field conditions. Epidemiol Infect. 2015 Jan 16;143(1):157–66.

218. Canevari Castelão AB, Nishibe C, Moura A, de Alencar AP, Issa M de A, Hodon MA, et al. Draft genome sequence of Mycobacterium bovis strain AN5, used for production of purified protein derivative. Genome Announc. 2014;2(2).

219. Infantes-Lorenzo JA, Moreno I, Risalde MDLÁ, Roy Á, Villar M, Romero B, et al. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. Clin Proteomics. 2017 Nov 2;14(1).

220. Dall'Stella R, Krieger MA, Burger M, Agottani JB, Chahad-Ehlers S, Thomaz-Soccol V. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis use. J Biotechnol. 2007 Jan 1;127(2):278–87.

221. Fitzgerald SD, Kaneene JB. Wildlife Reservoirs of Bovine Tuberculosis Worldwide: Hosts, Pathology, Surveillance, and Control. Vet Pathol. 2013 May;50(3):488–99.

222. Koni A, Juma A, Morini M, Nardelli S, Connor R, Koleci X. Assessment of an ELISA method to support surveillance of bovine tuberculosis in Albania. Ir Vet J. 2016 Aug 20;69(1).

223. Vordermeier M, Jones GJ, Whelan AO. DIVA reagents for bovine tuberculosis vaccines in cattle. Vol. 10, Expert Review of Vaccines. 2011. p. 1083–91.

224. Medeiros L dos S, Ashford D, Peruquetti RC, Domingos SCB, Peixoto RM, Damasceno TNL, et al. Economic aspects of control and eradication of bovine tuberculosis and the managerial costs associated: Review. Pubvet. 2020 Nov;14(11):1–11.

225. O'reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. Vol. 1, Tubercle and Lung Disease. 1995.

226. Pérez CA. EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA VACUNACIÓN CON LA CEPA BCG DE Mycobacterium bovis EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS EN GANADO LECHERO EN UN PREDIO DE LA REGIÓN METROPOLITANA, CHILE. 2019.

227. Borsuk S, Newcombe J, Mendum TA, Dellagostin OA, McFadden J. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS. Tuberculosis. 2009 Nov;89(6):423–30.

228. Whelan AO, Coad M, Upadhyay BL, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Lack of correlation between bcg-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. Vaccine. 2011 Jul 26;29(33):5453–8.

229. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56: IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. Vaccine. 2015;33(33):4130–40.

230. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, et al. Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination . New England Journal of Medicine. 2018 Jul 12;379(2):138–49.

231. Khademi F, Derakhshan M, Yousefi-Avarvand A, Tafaghodi M, Soleimanpour S. Multi-stage subunit vaccines against Mycobacterium tuberculosis: an alternative to the BCG vaccine or a BCG-prime boost? Vol. 17, Expert Review of Vaccines. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 31–44.

232. Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 Subunit Vaccination against Mycobacterium tuberculosis. Vol. 68, INFECTION AND IMMUNITY. 2000.

233. Lin PL, Dietrich J, Tan E, Abalos RM, Burgos J, Bigbee C, et al. The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent

Mycobacterium tuberculosis infection. Journal of Clinical Investigation. 2012 Jan 3;122(1):303–14.

234. Fitzkee NC. Steric restrictions in protein folding: An -helix cannot be followed by a contiguous -strand. Protein Science. 2004 Feb 6;13(3):633–9.

235. Zhao HL, Yao XQ, Xue C, Wang Y, Xiong XH, Liu ZM. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-α2b fusion protein by linker engineering. Protein Expr Purif. 2008 Sep;61(1):73–7.

236. Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of Tf-based fusion proteins. Pharm Res. 2009 Mar;26(3):523–8.

237. Argos P. An Investigation of Oligopeptides Linking Domains in Protein Tertiary Structures and Possible Candidates for General Gene Fusion. Vol. 211, J. Mol. Biol. 1990.

238. Lipničanová S, Legerská B, Chmelová D, Ondrejovič M, Miertuš S. Optimization of an Inclusion Body-Based Production of the Influenza Virus Neuraminidase in Escherichia coli. Biomolecules. 2022 Feb 1;12(2).

239. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. Current Protocols in Protein Science. 2010.

240. Grabski A, Mehler M, Drott D. The Overnight Express Autoinduction System: High-density cell growth and protein expression while you sleep [Internet]. Vol. 2, NATURE METHODS. 2005. Available from: http://www.bnl.gov/bnlweb/pubaf/

241. Jhamb K, Sahoo DK. Production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. Bioresour Technol. 2012 Nov;123:135–43.

242. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. Vol. 14, Microbial Cell Factories. BioMed Central Ltd.; 2015.

243. Wang Lei. Towards revealing the structure of bacterial inclusion bodies. Prion3. 2009;3(3):139–45.

244. Beiroti A, Kavianpour A, Sepahi M, Arsalani F, Tavakoli Zaniani P, Jalalirad R. Effect of post-solubilization conditions on the yield and efficiency of recombinant streptokinase purification at large-scale. Protein Expr Purif. 2014;101:127–32.

245. Fisher B, Sumner I, Goodenough P. Isolation, Renaturation, and Formation of Disulf ide Bonds of Eukaryotic Proteins Expressed in Escherichia coli as Inclusion Bodies. Biotechnol Bioeng. 1993;41:3–13.

246. Wang X, Zhang J, Liang J, Zhang Y, Teng X, Yuan X, et al. Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection offered by a new multistage subunit vaccine correlates with increased number of IFN-γ+IL-2+ CD4+and IFN-γ+ CD8+ T cells. PLoS One. 2015 Mar 30;10(3).

247. Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 Subunit Vaccination against Mycobacterium tuberculosis. Vol. 68, INFECTION AND IMMUNITY. 2000.

248. Moreno-Mendieta SA, Guillén D, Espitia C, Hernández-Pando R, Sanchez S, Rodríguez-Sanoja R. A novel antigen-carrier system: The

Mycobacterium tuberculosis Acr protein carried by raw starch microparticles. Int J Pharm. 2014 Oct 20;474(1–2):241–8.

249. van Dissel JT, Arend SM, Prins C, Bang P, Tingskov PN, Lingnau K, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in naïve human volunteers. Vaccine. 2010 Apr 30;28(20):3571–81.

250. Fan X, Gao Q, Fu R. Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of Mycobacterium tuberculosis in a mouse model. Microbiol Res. 2009;164(4):374–82.

251. Kęsik M, Sączyńska V, Szewczyk B, Płucienniczak A. Inclusion bodies from recombinant bacteria as a novel system for delivery of vaccine antigen by the oral route. Immunol Lett. 2004 Feb 15;91(2–3):197–204.

252. Schetters STT, Jong WSP, Kruijssen LJW, Saparoea HB van den B van, Engels S, Unger WWJ, et al. Bacterial inclusion bodies function as vehicles for dendritic cell-mediated T cell responses. Cell Mol Immunol. 2020 Apr 1;17(4):415–7.

253. De Marco A, Ferrer-Miralles N, Garcia-Fruitós E, Mitraki A, Peternel S, Rinas U, et al. Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. Vol. 43, FEMS Microbiology Reviews. Oxford University Press; 2019. p. 53–72.

254. Prchal M, Pilz A, Simma O, Lingnau K, von Gabain A, Strobl B, et al. Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. Vaccine. 2009 Dec 30;27(SUPPL.6).

255. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type i interferons. Vol. 12, Nature Reviews Immunology. 2012. p. 125–35.

256. Cha L, Berry CM, Nolan D, Castley A, Fernandez S, French MA. Interferon-alpha, immune activation and immune dysfunction in treated HIV infection. Clin Transl Immunology. 2014 Feb 28;3(2):e10.

257. Bracci L, Canini I, Puzelli S, Sestili P, Venditti M, Spada M, et al. Type I IFN is a powerful mucosal adjuvant for a selective intranasal vaccination against influenza virus in mice and affects antigen capture at mucosal level. Vaccine. 2005 Apr 27;23(23):2994–3004.

258. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I Interferons Potently Enhance Humoral Immunity and Can Promote Isotype Switching by Stimulating Dendritic Cells In Vivo. Immunity. 2001;14:461–70.

259. Tanner R, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, McShane H. The humoral immune response to BCG vaccination. Vol. 10, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2019.

260. Buddle BM, Wedlock DN, Parlane NA, Corner LAL, De Lisle GW, Skinner MA. Revaccination of Neonatal Calves with Mycobacterium bovis BCG Reduces the Level of Protection against Bovine Tuberculosis Induced by a Single Vaccination. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6411–9.

261. Lyashchenko K, Whelan AO, Greenwald R, Pollock JM, Andersen P, Hewinson RG, et al. Association of Tuberculin-Boosted Antibody Responses with Pathology and Cell-Mediated Immunity in Cattle Vaccinated with Mycobacterium bovis BCG and Infected with M. bovis. Infect Immun. 2004 May;72(5):2462–7.

262. Debebe T, Ameni G. Immunogenicity of bacillus calmette-guerin (BCG) in bovine neonates under traditional farming in central ethiopia. J Immunoassay Immunochem. 2010 Apr;31(2):160–8.

263. Van Der Heijden EMDL, Chileshe J, Vernooij JCM, Gortazar C, Juste RA, Sevilla I, et al. Immune response profiles of calves following vaccination with live BCG and inactivated Mycobacterium bovis vaccine candidates. PLoS One. 2017 Nov 1;12(11).

264. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, Mccarthy AR, Heslop J, et al. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed Mycobacterium vaccae. Vol. 59, Research in Veterinary Science. 1995.

265. Buddle BM, De Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against Mycobacterium bovis in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vol. 13, Vaccine. 1995.

266. Nonnecke BJ, Waters WR, Foote MR, Palmer M V., Miller BL, Johnson TE, et al. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early vaccination with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. J Dairy Sci. 2005;88(1):195–210.

267. Niewiesk S. Maternal antibodies: Clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. Vol. 5, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2014.

268. Chase CCL, Hurley DJ, Reber AJ. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. Vol. 24, Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice. 2008. p. 87–104.

269. Glezen WP. Effect of maternal antibodies on the infant immune response. In: Vaccine. Elsevier BV; 2003. p. 3389–92.

270. Guan H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of CD44 in the Differentiation of Th1 and Th2 Cells: CD44-Deficiency Enhances the Development of Th2

Effectors in Response to Sheep RBC and Chicken Ovalbumin. The Journal of Immunology. 2009 Jul 1;183(1):172–80.

271. Schumann J, Stanko K, Schliesser U, Appelt C, Sawitzki B. Differences in CD44 surface expression levels and function discriminates IL-17 and IFN-γ producing helper T cells. PLoS One. 2015 Jul 14;10(7).

272. Lewinsohn DA, Lewinsohn DM, Scriba TJ. Polyfunctional CD4+ T cells as targets for tuberculosis vaccination. Vol. 8, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2017.

273. Lewinsohn DA, Lewinsohn DM, Scriba TJ. Polyfunctional CD4+ T cells as targets for tuberculosis vaccination. Vol. 8, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2017.

274. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56: IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. Vaccine. 2015;33(33):4130–40.

275. Counoupas C, Ferrell KC, Ashhurst A, Bhattacharyya ND, Nagalingam G, Stewart EL, et al. Mucosal delivery of a multistage subunit vaccine promotes development of lung-resident memory T cells and affords interleukin-17-dependent protection against pulmonary tuberculosis. Vaccines (Basel). 2020 Dec 1;5(1).

276. Shen H, Chen ZW. The crucial roles of Th17-related cytokines/signal pathways in M.Tuberculosis infection. Vol. 15, Cellular and Molecular Immunology. Chinese Soc Immunology; 2018. p. 216–25.

277. Pestronk A, Lopate G. Polyneuropathies and Antibodies to Nervev Components. In: Peripheral Neuropathy: 2-Volume Set with Expert Consult Basic. Elsevier; 2005. p. 2177–96.

278. Subramanian S, Srinivasan S, Ramaiyan Selvaraju K, Vinoli PM, Selladurai S, Ramasamy B, et al. Defined Antigen Skin Test for Bovine Tuberculosis Retains Specificity on Revaccination With Bacillus Calmette–Guérin. Front Vet Sci. 2022 Apr 13;9.

279. Zuniga Sanchez R, Sanchez Ramos O, Camacho F. The problem associated with tuberculosis in cattle and how this is being addressed. Vol. 8, Bionatura. Clinical Biotec, Universidad Catolica del Oriente (UCO); 2023.

280. BOVINE TUBERCULOSIS. In: OIE Terrestrial Manual. 2018.

281. Buddle BM, Vordermeier HM, Chambers MA, de Klerk-Lorist LM. Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. Vol. 5, Frontiers in Veterinary Science. Frontiers Media S.A.; 2018.

282. Williams GA, Scott-Baird E, Núñez A, Salguero FJ, Wood E, Houghton S, et al. The safety of BCG vaccination in cattle: results from good laboratory practice safety studies in calves and lactating cows. Heliyon. 2022 Dec 1;8(12).

283. Rosenbaum P, Tchitchek N, Joly C, Rodriguez Pozo A, Stimmer L, Langlois S, et al. Vaccine Inoculation Route Modulates Early Immunity and Consequently Antigen-Specific Immune Response. Front Immunol. 2021 Apr 20;12.

284. Srinivasan S, Subramanian S, Shankar Balakrishnan S, Ramaiyan Selvaraju K, Manomohan V, Selladurai S, et al. A Defined Antigen Skin Test That Enables Implementation of BCG Vaccination for Control of Bovine Tuberculosis: Proof of Concept. Front Vet Sci. 2020 Jul 24;7.

285. Paredes L, Alves E, Luarte C. INSTRUCTIVO USO E INTERPRETACION DE PRUEBAS DIAGNOSTICAS DE CAMPO PARA TUBERCULOSIS BOVINA. 2009.

286. Garrido JM, Vazquez P, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Geijo M V., et al. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. PLoS One. 2013 Nov 26;8(11).

287. Biffar L, Blunt L, Atkins W, Anderson P, Holder T, Xing Z, et al. Evaluating the sensitivity of the bovine BCG challenge model using a prime boost Ad85A vaccine regimen. Vaccine. 2020 Jan 29;38(5):1241–8.

288. Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, et al. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. Nat Med. 2011 Feb;17(2):189–95.

289. Mejia OR, Gloag ES, Li J, Ruane-Foster M, Claeys TA, Farkas D, et al. Mice infected with Mycobacterium tuberculosis are resistant to acute disease caused by secondary infection with SARS-CoV-2. PLoS Pathog. 2022 Mar 1;18(3).

290. Ábalos P, Valdivieso N, de Val BP, Vordermeier M, Benavides MB, Alegría-Morán R, et al. Vaccination of Calves with the Mycobacterium bovis BCG Strain Induces Protection against Bovine Tuberculosis in Dairy Herds under a Natural Transmission Setting. Animals. 2022 May 1;12(9).

291. Buddle BM, De Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against Mycobacterium bovis in calves vaccinated with a low dose of BCG. Vol. 13, Vaccine. 1995.

292. Pooley HB, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ, Purdie AC, De Silva K. The humoral immune response is essential for successful vaccine protection against paratuberculosis in sheep. BMC Vet Res. 2019 Jul 2;15(1).

293. Jacobs AJ, Mongkolsapaya J, Screaton GR, McShane H, Wilkinson RJ. Antibodies and tuberculosis. Vol. 101, Tuberculosis. Churchill Livingstone; 2016. p. 102–13.

294. Fletcher HA, Snowden MA, Landry B, Rida W, Satti I, Harris SA, et al. T-cell activation is an immune correlate of risk in BCG vaccinated infants. Nat Commun. 2016 Apr 12;7.

295. Sánchez-Rodríguez C, Estrada-Chávez † C, García-Vigil J, Laredo-Sánchez F, Halabe-Cherem J, Pereira-Suárez A, et al. An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2002;6(8):706–12.

296. Barrera L, de Kantor I, Ritaccot V, Renierot A, Benetuccil J, BeltrAng M, et al. Humoral response to Mycobacterium tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Tubercle and Lung Disease. 1992;73:187–91.

297. Niki M, Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, Ohta K, Inoue M, et al. Evaluation of Humoral Immunity to Mycobacterium tuberculosis -Specific Antigens for Correlation with Clinical Status and Effective Vaccine Development. J Immunol Res. 2015;2015.