

REVISIÓN

***Mycobacterium bovis*: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria**

***Mycobacterium bovis*: realities and challenges for the veterinary biopharmaceutical industry**

Aníbal Domínguez Odio¹, Rafael Pérez Polanco², Isabel González Marrero³, Raiselys Toirac Proenza⁴, Yanelis Riquenes Garlobo⁵, Yudit Rodríguez Coipel⁴, Isis Acosta Guevara⁵.

RESUMEN

El *Mycobacterium bovis* es el principal agente etiológico de la tuberculosis bovina, enfermedad bacteriana de distribución mundial, crónica, de fácil transmisión, debilitante, zoonótica, antropozoonótica, que afecta cualquier órgano y puede cursar asintóticamente. Sobre esta base, se realizó un estudio con el objetivo de abordar el estado actual y las proyecciones científico-tecnológicas para la prevención y diagnóstico de la tuberculosis bovina, provocada por *M. bovis*. Se demostró que el 45,09 % de los artículos originales sobre inmunoprofilaxis contra bacterias, indexados en la base de datos Scopus y contextualizada hasta principios de 2014, estaban enfocadas hacia *M. bovis*. A pesar de los adelantos en biología molecular y las esperanzas depositadas en las moléculas Ag85A, Rv0287, Rv0288, Rv0251c, MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10, conjuntamente con sus combinaciones, continuará ausente en el mercado una vacuna efectiva, segura y diferenciante; así como un sistema diagnóstico DIVA robusto. Se concluye que en los próximos 5 años continúe ausente una formulación vacunal oficialmente reconocida y que la prueba de tuberculina a pesar de sus debilidades continuará siendo la principal herramienta de vigilancia.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, tuberculosis bovina, vacuna, diagnóstico.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is the main etiological agent of bovine tuberculosis, bacterial diseases of world distribution, chronicle, of easy transmission, debilitating, zoonotic and antropozoonotic that affects any organ and which can be presented without symptoms. On this base, it was carried out a study with the objective of approaching the current state and the scientific-technological projections for the prevention and diagnosis of the bovine tuberculosis, caused by *M. bovis*. It was demonstrated that the 45.09% of the original articles on immunoprophylaxis against bacteria, registered in the Scopus database and contextualised until principles of 2014, were focused toward *M. bovis*. In spite of the advances in molecular biology and the hopes deposited in the Ag85A, Rv0287, Rv0288, Rv0251c, MPB70, MPB83, ESAT-6 and CFP-10 molecules, jointly with their combinations, it will continue absent in the market an effective, safety and differentiating vaccine; as well as a robust DIVA diagnosis system. It can be concluded that in the next 5 years, an officially recognized vacinal formulation will continue absent and that the tuberculin test in spite of its weaknesses will continue being the main tool of surveillance.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, vaccines, diagnosis.

Introducción

Dentro de las enfermedades infectocontagiosas que se vigila constantemente y de las que se exige su notificación obligatoria una vez confirmada su presencia, se encuentra la tuberculosis bovina (TBb). Esta enfermedad es provocada con mucha frecuencia por *Mycobacterium bovis*, perteneciente a la familia Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*. Dicha bacteria, a pesar de ser un patógeno primario para los bovinos, tiene un rango excepcionalmente amplio de hospederos vertebrados, entre los cuales se incluyen animales de interés económico (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, aves), afectivos, silvestres y los seres humanos.¹⁻³

El interés mundial en el control y erradicación de la TBb se justifica tradicionalmente no solo por el deterioro cuantitativo

y cualitativo de los principales indicadores productivos y reproductivos que provoca en esta especie, sino además por los incrementos en los costos de producción que genera su diagnóstico, las pérdidas económicas debido al sacrificio sanitario aplicado para su control; su transmisibilidad hacia los humanos; y por las persistentes e inmediatas restricciones comerciales que se les aplican a las producciones ganaderas procedentes de los países afectados.^{4,5}

Las negativas consecuencias productivas-sanitarias-comerciales que se derivan del diagnóstico de la enfermedad, unido a lo extremadamente costoso de los tratamientos antimicrobianos y el incremento del riesgo de aparición de cepas resistentes que esta práctica genera, son incentivos suficientes para favorecer la búsqueda de una protección preventiva, efectiva y segura contra la TBb,

¹ Maestro en Ciencias. Investigador auxiliar. Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

² Doctor en Ciencias. Especialista de la Empresa Productora de Vacunas y Bacterianas. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

³ Directora de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

⁴ Maestro en Ciencia. Especialista de Investigación y Desarrollo del Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

⁵ Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba.

Autor de correspondencia: Aníbal Domínguez Odio. Maestro en Ciencias. Investigador auxiliar. Especialista de Investigación y Desarrollo. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba. E-mail: anibal.dominguez@labiofam.co.cu

pero además de un diagnóstico diferencial *ante mortem* entre animales infectados y vacunados. Sobre esta base se pretende abordar el estado actual y las proyecciones científico-tecnológicas para la prevención y diagnóstico de la TBb, provocada por *M. bovis*.

Tuberculosis en animales y humanos

Quizás la TBb sea un uno de los mejores ejemplos que pueden utilizarse para demostrar la existencia de una sola salud.⁶ Los animales y el hombre son capaces de transmitirse la enfermedad entre sí (zoonosis y antropozoonosis), ser susceptibles de padecerla, tener similares vías de contagio, evolución clínica y lesiones histopatológicas. De igual manera su agente etiológico si bien constituye un linaje filogenético independiente, comparte no solo el 99,95 % de sus genes con *M. tuberculosis*, sino además un origen común, la extremada habilidad para sobrevivir dentro del organismo hospedero, factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.^{4,7-9}

Sin embargo, a pesar de haber transcurrido muchos años de investigación de ambos lados, la TBb continúa y continuará siendo un problema para muchos países sean desarrollados o no. Lo anterior demuestra en primer lugar, la necesidad urgente de analizar la enfermedad desde un enfoque integral, donde la mayor fortaleza radique en la estrecha coordinación entre los servicios de sanidad animal y salud pública. Y en segundo lugar, incrementar el arsenal tecnológico para combatir la enfermedad, a la vez que se entienda mejor su epidemiología.

Los obstáculos que han enfrentado las numerosas estrategias nacionales de control-erradicación, y la emergencia de la enfermedad a nivel global, están asociados a la convergencia de varios

hechos que la condicionan y complejizan. Una revisión de la literatura especializada publicada en los últimos años, permite identificar entre los más relevantes los cambios genómicos frecuentes de esta micobacteria. La variedad genética detectada en *M. bovis* se debe a la presencia/ausencia de secuencias de inserción y espaciadores de secuencias repetidas de irregulares tamaños, mutaciones, entre otros. Lo anterior genera la existencia de regiones variables y esto a su vez a polimorfismos, cepas inherentes a sitios geográficos específicos (figura 1); cepas patógenas circulantes diferentes en animales de vida libre y domésticos, cruce frecuente de la barrera inter-especies, incremento de su virulencia y la aparición de resistencia a drogas antituberculosas.¹⁰⁻¹⁴ A lo anterior se une el riesgo que representa tanto la movilización de animales entre regiones y países,¹⁵ la antropización de áreas de vida silvestre, donde no existen garantías sanitarias¹⁶ y el reemplazo de animales nativos resistentes a la enfermedad por otros más productivos pero más susceptibles.¹⁷

En el ámbito veterinario, la TBb es reportada oficialmente por muchos países a nivel mundial (figura 1), siendo su prevalencia más elevada en África y ciertas partes de Asia y América.^{16,18} En este contexto es transcendental mencionar el importante papel que desempeñan los animales salvajes de vida libre en la diseminación de la enfermedad. Estos al ser hospederos de *M. bovis*, constituyen un riesgo siempre latente en la aparición de nuevos brotes en el ganado especializado y un factor muy importante a tener en cuenta para estimar el éxito o fracaso de los programas de control a largo plazo.^{2,19,20}

Relativo a este tema llama la atención que en el continente Americano solo el 38,23 % de los países que lo conforman reportan la enfermedad en su forma clínica durante el 2014 y el 11,11 % declaran tenerla limitada en una o varias zonas, por lo general en áreas donde habitan animales silvestres (figura 2).

Estos datos deben tomarse con mucha cautela, pues lejos de demostrar avances en su erradicación, apuntan hacia una subnotificación de la enfermedad. Tal sospecha se debe a debilidades diagnósticas presentes en los países latinoamericanos y del caribe,²¹ entre los cuales se pueden mencionar las siguientes:

1. dificultades técnicas existentes para un correcto aislamiento e identificación del agente;
2. uso limitado de pruebas de diagnósticas;
3. inspección veterinaria insuficiente en la mayoría de los mataderos;
4. falta de confianza entre granjeros y oficiales de salud;
5. registros inapropiados para los casos positivos; y
6. falta de adecuada compensación por la eliminación de animales positivos.

Situación contraria presenta la enfermedad en el ámbito de la salud humana, detectándose una re-emergencia.^{4,22} La tuberculosis zoonótica en diferentes países del mundo sean desarrollados o no, está relacionado de forma general con una serie de factores,^{1, 23-26} los cuales se relacionan a continuación:

1. inmigración de personas procedentes de regiones donde la TBb es frecuente;
2. aparición de cepas multiresistentes a drogas antituberculosas;
3. antropización de nuevas áreas y con ello el contacto forzoso entre humano-animal salvaje-animal doméstico;
4. inmunodepresión provocado por infección con el virus de inmunodeficiencia humana u otras enfermedades crónicas debilitantes;
5. persistencia de estilos de vida riesgosos como son: consumo de carne y leche sin pasteurizar procedentes de animales enfermos criados de forma familiar, fabricación de quesos y mantequillas artesanales.

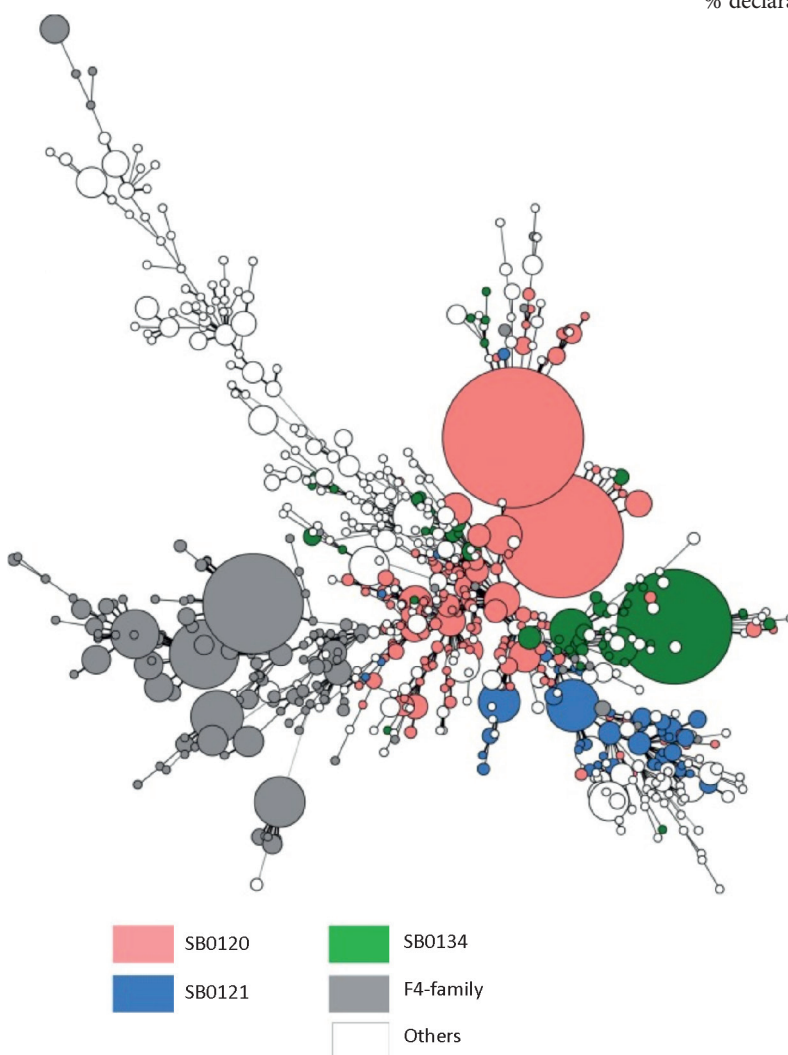


Fig. 1. Variedad de cepas de *M. bovis* detectadas en Francia durante el periodo 1978-2013.¹⁰

nales, entre otros; y desconocimiento de la enfermedad, vía de transmisión y las medidas para evitar su contagio.

Si bien es cierto que algunos países han reconocido oficialmente tener bajos niveles de incidencia de tuberculosis humana inducida por *M. bovis*, otros por el contrario notifican su incremento. La persistencia regionalizada de este agente se demuestra por ejemplo en California, Estados Unidos donde se incrementó su presencia hasta un 69,9 % en pacientes entre 15-69 años de edad.²⁷ Otros países por ejemplo China, declaran un comportamiento contrario, aunque consideran necesario mantener su identificación de forma rutinaria.²⁸ En relación a la región latinoamericana la baja prevalencia debe interpretarse con cuidado, pues existe una subnotificación y por tanto una subvaloración de la tuberculosis como enfermedad zoonótica. Esta situación se debe entre otros factores, al empleo de medios de cultivo menos apropiados para esa micobacteria y baja cobertura diagnóstica.^{29, 30}

Vacunación y diagnóstico veterinario

La estrategia para el control y erradicación de la tuberculosis en sentido general se ha bifurcado en dos líneas de investigación: farmacéutica o terapéutica^{31, 32} y biológica o preventiva.³³ El análisis pormenorizado del flujo de información especializada sobre esta última estrategia de control, permitió conocer que el campo temático de *M. bovis* muestra un lugar relevante, en relación a otras bacterias patógenas igualmente de interés veterinario como *Brucella abortus* y *Escherichia coli*.

La búsqueda temática en la base de datos Scopus y contextualizada hasta principios de 2014, indicó que el 45,09 % de los artículos originales sobre inmunoprofilaxis contra bacterias estaban enfocadas hacia el primer agente bacteriano, mientras que el restante 29,90 % y 25,01 % se corresponden a los dos agentes antes mencionados. Sin embargo, al analizar de forma global el número de investigaciones y publicaciones sobre bovinos, se pudo demostrar que el mayor interés científico a nivel mundial se dirige hacia enfermedades virales y garrapatas,³⁴ quedando en un tercer plano las bacterias patógenas.

Es importante resaltar que no existe, para la enfermedad y para la especie bovina en particular, una formulación inmunoprolifática óptima, a pesar de ser una opción muy económica para su control y erradicación. No obstante, está disponible en el mercado actualmente una vacuna lograda por tecnología clásica de producción a partir de la cepa viva atenuada de *M. bovis* Bacillus de Calmette-Guérin (BCG), pero su uso no está previsto dentro de los programas de control en muchos países afectados por la enfermedad, considerándose incluso ilegal en otros.³⁵ La restricción sanitaria de uso de esta vacuna se debe a su controver-

sial eficacia, y a su interferencia con la prueba de tuberculina.³⁶⁻³⁸

A pesar de esta limitación, se han vacunado con BCG especies salvajes de vida libre que conviven en áreas comunes con los bovinos, estrategia que en principio es similar a la empleada para el control y erradicación de otras enfermedades de etiología viral, como la rabia.³⁹ Las experiencias con BCG en animales salvajes, demostraron que con independencia de la vía de administración (intramuscular y oral), se puede lograr inducir respuestas protectoras que limitan la distribución y la gravedad de la enfermedad.^{40, 41}

El ambiente regulatorio adverso, contrario a lo que pudiera pensarse no ha limitado los esfuerzos para lograr una vacuna preventiva contra TBb. Tal insistencia esta apoyada en varios pilares: relación costo-beneficio favorable al productor pecuario, alto nivel de impacto por el número de especies a proteger, y disminución del riesgo de aparición de cepas resistentes.⁵ Para aspirar a construir desde el presente un ambiente futuro de cambio y vencer prohibiciones sanitarias, las nuevas generaciones de vacunas deben tener en teoría a criterio del autor y otros investigadores de referencia como Conlan *et al.*, 2015,⁴² las siguientes características generales: viable económicamente, segura a corto y largo plazo, formulación estable, inducir protección diferenciante, rápida y duradera, preferiblemente de por vida; generar protección clínica completa, eliminar o reducir la transmisibilidad del agente, y no interferir con los medios diagnósticos de pesquiasaje masivos.

Una gran parte de la literatura consultada demuestra que ha ocurrido un incremento significativo del conocimiento de la biología molecular del *M. bovis* y que este se ha vinculado con el desarrollo tecnológico. Esta convergencia está contribuyendo a identificar las cepas de mayor prevalencia por región geográfica,^{10, 11} lograr una vacuna que permita inmunizar animales domésticos y salvajes por igual, cortar la cadena de transmisión y fortalecer los programas de erradicación y control [43, 44]. En tal sentido, se están transitando por algunos caminos que pueden lograrlo o al menos en parte, una de ellos es atenuando cepas mediante genes eliminados, ya sean únicos como MbΔp27-p55 o dobles como MbΔmce2A/MbΔmce2B y MbΔphoP-phoR/MbΔmce2. Dichas cepas si bien resultaron ser más atenuadas que la BCG, mostraron diferencias en cuanto a eficacia en modelos animales, siendo las de doble delección las candidatas más prometedoras.⁴⁵⁻⁴⁷

Otra vertiente existente en la estrategia de vacunación es mejorar la protección conferida por la vacuna BCG. Como resultado de esto se han ensayado en el organismo diana variantes de esquemas de inmunización, consistente en combinar bajas dosis de BCG por vía oral y filtrado proteico de *M. bovis* formulada con o sin quitina y gel 01, por vía intranasal. Los resultados demostraron que la co-administración independientemente de la vía de administración no confería protección a terneros.⁴⁸



Fuente: OIE/2014

Legenda:
▲ Enfermedad clínica
● Enfermedad limitada a una o varias zonas

Fig. 2. Distribución mundial de la tuberculosis bovina durante el 2014.

La utilización de vectores virales recombinantes que expresan proteínas de la micobacteria, como Ag85A, Rv0287, Rv0288 y Rv0251c, formuladas con o sin adyuvantes, es otra de las variantes utilizadas. Los resultados obtenidos en modelos animales si bien son prometedores,^{49, 50} aún le queda mucho camino que recorrer, siendo uno de los requisitos regulatorios de obligatorio cumplimiento la demostración de la estabilidad de la construcción génica y, la no reversión de la virulencia.

Sin embargo, parece ser que las mayores oportunidades de éxito en la inducción de respuesta vacunal efectiva y diferenciante (tecnología DIVA) están asociadas con la utilización combinada de proteínas recombinantes o cócteles de péptidos inmunogénicos sintéticos. A raíz de esto merece especial atención los antígenos Rv3875, Rv3874, Rv1986, Rv3872, Rv3878 y Rv3615c, siendo estos detectados solo en bovinos infectados naturalmente por *M. bovis* y ausentes animales vacunados con BCG [33], aunque se requiere profundizar en su eficacia.

Esta muy claro para todos los involucrados en el tema *M. bovis* y TBb, que el logro de una vacuna efectiva, segura y diferenciante por tecnología DIVA, será muy ventajosa desde el punto de vista productivo, económico, sanitario y social debido a las siguientes razones:

- reducirá el número de animales que deben ser sacrificados de forma emergente por sospechas de padecer la enfermedad, y con ello el desperdicio de proteínas de origen animal;
- facilitará la pesquisa masiva detectando de forma rápida y di-

ferencial la aparición de brotes;

- acortará el periodo necesario para demostrar la ausencia de la infección y el éxito de los programas de control;
- acortará el periodo de eliminación de las barreras comerciales ocasionadas por la notificación de la TBb, evitando así la pérdida de los mercados y
- contribuirá a que los países en desarrollo alcancen la tan necesaria seguridad alimentaria.

En relación al diagnóstico de la TBb, la tabla muestra la diversidad de métodos directos e indirectos de diagnóstico que existen en la actualidad, conjuntamente con sus fortalezas y debilidades.⁵¹⁻⁵⁴ Esta aparente diversidad de métodos, no impide el hecho de que aún no se dispone de la prueba ideal para el diagnóstico de esta enfermedad. Mientras se encuentra la solución definitiva, se reconoce el aislamiento del agente como uno de los procedimientos para el diagnóstico definitivo de la enfermedad y la prueba de hipersensibilidad retardada (tuberculina) como el método de referencia no solo para la detección de la tuberculosis bovina de rutina en campo, sino en estudios comparativos con otros métodos de diagnósticos presentes y futuros.

Tabla. Caracterización general de algunas pruebas diagnósticas disponibles para pesquiasaje y confirmación de TBb inducida por *M. bovis*

Tabla. Caracterización general de algunas pruebas diagnósticas disponibles para pesquiasaje y confirmación de TBb inducida por *M. bovis*.

Diagnóstico	Ventajas	Limitaciones
Métodos directos	Clínico	Realización diaria
	Pesquisaje masivo	Discriminación limitada por escasos signos clínicos
	Bacteriológico	Define el agente etiológico
		Resultados demorados
		Condiciones especiales
		Demorado
	Histopatológica	Confirmatoria
		Condiciones especiales
		Uso <i>post mortem</i>
Métodos indirectos	Económica	
	Confirma el agente etiológico	No distingue entre especie
	Rápida	Condiciones especiales
	Uso <i>ante mortem</i>	
	Económica	No diferencia entre vacunados e infectados
	Fácil aplicación y lectura	No detecta infección reciente
	Resultados en poco tiempo	Reacciones cruzadas
	Pesquisaje masivo	Solo detecta inmunidad celular
	Experiencia de uso	Sensibilidad y especificidad irregulares
	Uso <i>ante mortem</i>	No se puede repetir hasta después de 60 días
		Doble manipulación del ganado
	Pesquisaje masivo	
	Resultados en poco tiempo	Baja sensibilidad
	Uso <i>ante mortem</i>	Condiciones especiales
	Uso en animales salvajes	Costo elevado
	Se puede repetir la prueba	
	Confirma el agente etiológico	
	Diferencia micobacterias	
	Resultados en poco tiempo	Condiciones especiales
	Poca cantidad de muestras	Costo elevado
	Uso en animales salvajes	No uso de rutina
	Uso <i>ante mortem</i>	
	Se puede repetir la prueba	
	Detecta infección temprana	Condiciones especiales
	Poca cantidad de muestras	Costo elevado
	Uso en animales salvajes	Transporte rápido de muestra
	Uso <i>ante mortem</i>	No uso de rutina
	Se puede repetir la prueba	

Esta debilidad si bien es cierto que probablemente continúe por algún tiempo más, no significa que la comunidad científica se de por vencida para corregirla. Los esfuerzos se han separado en tres vertientes no excluyentes entre sí, la primera encaminada a demostrar la conveniencia del uso combinado de pruebas diagnósticas;^{55, 56} la segunda dirigida a potencializar las actuales pruebas con nuevas moléculas^{57, 58} y la tercera orientada hacia el diagnóstico diferencial entre vacunados e infectados.⁵⁹

Las dos últimas vertientes tienen en común la necesidad de buscar y caracterizar nuevos candidatos antigénicos expresados o secretados por *M. bovis*⁶⁰⁻⁶³ e intentarlos producir de forma eficiente.⁶⁴ En consecuencia se han formulado y ensayados en cobayos proteínas recombinantes purificadas, péptidos sintéticos independientes o en cocteles de antígenos. Las moléculas antigénicas y de captura de mayor interés son: MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 las cuales requirieron estudios más profundos de validación de desempeño, demostrado las potencialidades prácticas de mezclas de antígenos para el diagnóstico DIVA futuro, basado en pruebas de sensibilidad dérmica.^{56, 60-62}

El análisis retrospectivo y detallado de los artículos relacionados con *M. bovis* publicados en Scopus, y contextualizados hasta principios de 2014 permitió apreciar que no existe y probablemente no exista en los próximos 5 años en el mercado una vacuna eficaz contra la tuberculosis bovina, a pesar de que su desarrollo es una prioridad global. Por otro lado la prueba de tuberculina, independientemente de sus debilidades continuará siendo la principal herramienta de vigilancia en los próximos 5 años para la TBb.

Agradecimientos

A Omaidía María Medina Alamo, especialista de la Dirección de Investigación y Desarrollo, perteneciente al Grupo Empresarial LABIOFAM, por sus respectivos aportes a este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Ramdas KE, Lyashchenko KP, Greenwald R, Austerman S, McManis C, Waters WR. *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3): 480-3.
- Musoke J, Hlokwé T, Marcotty T, du Plessis BJ, Michel AL. Spillover of *Mycobacterium bovis* from wildlife to livestock, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3):448-51.
- Buddle BM, de Lisle GW, Griffin J, Hutchings SA. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *N Z Vet J*. 2015;1-9.
- Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C. Zoonotic *Mycobacterium bovis* induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(6): 899-908.
- Hawn TR, Day TA, Scriba TJ, Hatherill M, Hanekom WA, Evans TG, et al. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014; 78(4):650-71.
- Travis DA, Srirammarao P, Cardona C, Steer CJ, Kennedy S, Sreevatsan S, et al. One Medicine One Science: a framework for exploring challenges at the intersection of animals, humans, and the environment. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1334:26-44.
- Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3): 435-43.
- Mittal M, Chakravarti S, Sharma V, Sanjeeth BS, Churamani CP, Kanwar NS. Evidence of presence of *Mycobacterium tuberculosis* in bovine tissue samples by multiplex PCR: possible relevance to reverse zoonosis. *Transbound Emerg Dis*. 2014; 61(2):97-104.
- Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, et al. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci*. 2014; 97 Suppl: S78-85.
- Hauer A, De Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, et al. Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One*. 2015; 10(2):e0117103.
- Navarro Y, Romero B, Copano MF, Bouza E, Domínguez L, de Juan L, et al. Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle. *Vet Microbiol*. 2015; 175(1):99-104.
- Shimizu E, Macías A, Paolicchi F, Magnano G, Zapata L, Fernández A, et al. Genotyping *Mycobacterium bovis* from cattle in the Central Pampas of Argentina: temporal and regional trends. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(2):236-45.
- Ramos DF, Tavares L, da Silva PE, Dellagostin OA. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(2):365-72.
- Hlokwé TM, van Helden P, Michel AL. Evidence of increasing intra and inter-species transmission of *Mycobacterium bovis* in South Africa: are we losing the battle?. *Prev Vet Med*. 2014; 115(1-2):10-7.
- Tsao K, Robbe-Austerman S, Miller RS, Portacci K, Grear DA, Webb C. Sources of bovine tuberculosis in the United States. *Infect Genet Evol*. 2014; 28:137-43.
- Sanou A, Tarnagda Z, Kanyala E, Zingué D, Nouctara M, Ganamé Z, et al. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(10):e3142.
- Richardson IW, Bradley DG, Higgins IM, More SJ, McClure J, Berry DP. Variance components for susceptibility to *Mycobacterium bovis* infection in dairy and beef cattle. *Genet Sel Evol*. 2014; 46(1):77- 81.
- Je S, Yeo UC, Song T, Kim KC, Park SY, Kim MJ, et al. Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay. *J Vet Sci*. 2014; 15(2):259-65.
- Livingstone PG, Hancox N, Nugent G, Mackereth G, Hutchings SA. Development of the New Zealand strategy for local eradication of tuberculosis from wildlife and livestock. *N Z Vet J*. 2015; 2:1-10.
- Ciliberti A, Gavriel-Widén D, Yon L, Hutchings MR, Artois M. Prioritisation of wildlife pathogens to be targeted in European surveillance programmes: Expert-based risk analysis focus on ruminants. *Prev Vet Med*. 2015; 118(4):271-84.
- Proaño PF, Benítez OW, Portaels F, Rigouts L, Linden A. Situation of bovine tuberculosis in Ecuador. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(3): 279-86.
- Cordova E, Gonzalo X, Boschi A, Lossa M, Robles M, Poggi S. Human *Mycobacterium bovis* infection in Buenos Aires: epidemiology, microbiology and clinical presentation. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012; 16(3):415-7.
- Negin J, Abimbola S, Marais BJ. Tuberculosis among older adults - time to take notice. *Int J Infect Dis*. 2015; 32:135-7.
- Khyatti M, Trimbitas RD, Zouheir Y, Benani A, El Messaoudi MD, Hemminki K. Infectious diseases in North Africa and North African immigrants to Europe. *Eur J Public Health*. 2014; 24 Suppl 1:47-56.
- Moiane I, Machado A, Santos N, Nhambir A, Inlamea O, Hattendorf J, et al. Prevalence of bovine tuberculosis and risk factor assessment in cattle in rural livestock areas of Govuro District in the Southeast of Mozambique. *PLoS One*. 2014; 9(3):e91527.
- García DJ, Coelho AC. Evaluación del conocimiento de los ganaderos sobre la tuberculosis bovina e implicaciones para su control. *Rev Mex. Cienc. Pecu*. 2014; 5(2):213-229.
- Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(3):435-443.
- Jiang G, Wang G, Chen S, Yu X, Wang X, Zhao L, et al. Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in China. *Sci Rep*. 2015; 5:8538.
- Fonseca SL, Silva DR, Betzler de Oliveira VG, Gomes da Silva M, Boechat N, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* among mycobacterial isolates from human clinical specimens at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2011; 37(5):664-68.
- Rivas C, Greif G, Coitinho C, Araújo L, Laserra P, Robello C. Primeros casos de tuberculosis pulmonar por *Mycobacterium bovis*: una zoonosis reemergente en Uruguay. *Rev. Méd. Urug*. 2012; 28(3): 209-214.
- Mdluli K, Kaneko T, Upton A. Tuberculosis drug discovery and emerging targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1323:56-75.
- Ibekwe NN, Nvau JB, Oladosu PO, Usman AM, Ibrahim K, Boshoff HI, et al. Some Nigerian anti-tuberculosis ethnomedicines: a preliminary efficacy assessment. *J Ethnopharmacol*. 2014; 155(1):524-32.
- Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*. 2012; 30(16):2611-22.

34. Domínguez A, Pérez R, Cossío G, Morejón Y, Riquenes Y. Current trends and perspectives in veterinary vaccine production. *Biotechnol Appl.* 2014; 31(3): 196-203.
35. Villarreal RB, Berg S, Chamberlain L, McShane H, Hewinson R, Clifford D, et al. Development of a BCG challenge model for the testing of vaccine candidates against tuberculosis in cattle. *Vaccine.* 2014; 32(43):5645-9.
36. Parlange NA, Shu D, Subharat S, Wedlock DN, Rehm B, de Lisle G, et al. Revaccination of cattle with bacille Calmette-Guérin two years after first vaccination when immunity has waned, boosted protection against challenge with *Mycobacterium bovis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106519.
37. Ameni G, Vordermeier M, Aseffa A, Young D, Hewinson R. Field Evaluation of the Efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 1533-1538
38. Whelan AO, Coad M, Upadhyay B, Clifford D, Hewinson R. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitisation and protective immunity in cattle. *Vaccine.* 2011; 29: 5453-5458.
39. Mähl P, Cliquet F, Guiot AL, Niin E, Fournials E, Saint JN, et al. Twenty year experience of the oral rabies vaccine SAG2 in wildlife: a global review. *Vet Res.* 2014; 45(1):77-84.
40. Gormley E, Corner LA. Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(Suppl 1): 128-35.
41. Tompkins DM, Buddle BM, Whitford J, Cross ML, Yates GF, Lambeth MR, et al. Sustained protection against tuberculosis conferred to a wildlife host by single dose oral vaccination. *Vaccine.* 2013; 31(6):893-9
42. Conlan AJ, Brooks Pollock E, McKinley TJ, Mitchell AP, Jones GJ, et al. Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS Comput Biol.* 2015; 11(2):e1004038.
43. Buddle BM, Parlange NA, Wedlock DN, Heiser A. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60(Supl 1):136-46.
44. Majlessi L, Prados R, Casadevall A, Brosch R. Release of mycobacterial antigens. *Immunol Rev.* 2015; 264(1):25-45.
45. Bianco VM, Clark S, Blanco FC, Garbaccio S, García E, Cataldi A, et al. Assessment of *Mycobacterium bovis* deleted in p27-p55 virulence operon as candidate vaccine against tuberculosis in animal Models. Published online. 2014; 21. doi: 10.1155.
46. García E, Bianco MV, Gravisaco MJ, Rocha RV, Blanco FC, Bigi F. Evaluation of *Mycobacterium bovis* double knockout mce2-phoP as candidate vaccine against bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2015; 95(2):186-9.
47. Blanco FC, Bianco MV, Garbaccio S, Meikle V, Gravisaco MJ, Montenegro V, et al. *Mycobacterium bovis* Δ mce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2013; 93(3):363-72.
48. Wedlock DN, Aldwell FE, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM. Protection against bovine tuberculosis induced by oral vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG is not enhanced by co-administration of mycobacterial protein vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;144(3-4):220-7.
49. Dean G, Clifford D, Gilbert S, McShane H, Hewinson RG, Vordermeier HM, et al. Effect of dose and route of immunisation on the immune response induced in cattle by heterologous Bacille Calmette-Guerin priming and recombinant adenoviral vector boosting. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014; 158(3-4):208-13.
50. Dean G, Whelan A, Clifford D, Salguero FJ, Xing Z, Gilbert S, et al. comparison of the immunogenicity and protection against bovine tuberculosis following immunization by BCG-priming and boosting with adenovirus or protein based vaccines. *Vaccine.* 2014; 32(11):1304-10.
51. Seva J, Sanes JM, Ramis G, Mas A, Quereda JJ, Villarreal RB, et al. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Vet Microbiol.* 2014; 171(1-2):139-46.
52. Sales ML, Fonseca AA, Orzil L, Alencar AP, Hodon MA, Issa MA, et al. Validation of two real-time PCRs targeting the PE-PGRS 20 gene and the region of difference 4 for the characterization of *Mycobacterium bovis* isolates. *Genet Mol Res.* 2014; 13(2):4607-16.
53. Je S, Yeo UC, Song T, Kim KC, Park SY, Kim MJ, et al. Extent of *Mycobacterium bovis* infection in dairy cattle herds subject to partial culling as determined by an interferon-gamma assay. *J Vet Sci.* 2014;15(2):259-65.
54. Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker JP, et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clin.Vaccine Immunol.* 2011; 11:1882-1888.
55. Casal C, Díez GA, Álvarez J, Rodríguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, et al. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Vet Microbiol.* 2014; 170(3-4): 342-51.
56. Carvalho RC, Furlanetto LV, Maruyama FH, Araújo CP, Barros SL, Ramos CA, et al. Evaluation of the efficiency of nested q-PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from tuberculosis-suspected lesions in post-mortem macroscopic inspections of bovine carcasses slaughtered in the state of Mato Grosso, Brazil. *Meat Sci.* 2015; 106:11-15.
57. Casal C, Bezoz J, Díez G A, Alvarez J, Romero B, de Juan L, et al. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev. Vet. Med.* 2012; 105:149-154.
58. Jones GJ, Whelan A, Clifford D, Coad M, Vordermeier HM. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19: 620-22.
59. Whelan AO, Clifford D, Upadhyay B, Bredon E, McNair J, Hewinson G, et al. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J. Clin. Microb.* 2010; 48(9):3176-3181.
60. Jones GJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17(9):1344.
61. Vordermeier M S. V. Gordon SV, Hewinson RG. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.* 2011; 151: 8-13.
62. Lamont EA, Janagama HK, Ribeiro LJ, Vulchanova L, Seth M, Yang M, et al. Circulating *Mycobacterium bovis* peptides and host response proteins as biomarkers for unambiguous detection of subclinical infection. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(2):536-43.
63. Marassi CD, Zarden C, Oelemann W, Lilenbaum W. Detection of specific antibodies in cows after injection of PPD. *Pesq. Vet. Bras.* 2014; 34(3):241-243.
64. Marassi CD, Medeiros L, McNair J, Lilenbaum W. Use of recombinant proteins MPB70 or MPB83 as capture antigens in ELISAs to confirm bovine tuberculosis infections in Brazil. *Acta Tropica.* 2011; 118:101-104.

Recibido: enero de 2015.

Aprobado: febrero de 2015.