
Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Papel de las micobacterias ambientales sobre la eficacia de la vacuna contra la tuberculosis bovina

Role of environmental mycobacteria in the efficacy of the BCG vaccine against cattle tuberculosis

Authors/Autores: González-Ruiz, S., Bárcenas-Reyes, I., Contreras-Magallanes, Y.G., Sosa-Gallegos, S.L., Santillán-Flores, M.A., Milián-Suazo, F.

ID: e1984

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1984>

Received/Fecha de recepción: May 29th 2025

Accepted /Fecha de aceptación: December 11th 2025

Available online/Fecha de publicación: January 09th 2026

Please cite this article as/Como citar este artículo: González-Ruiz, S., Bárcenas-Reyes, I., Contreras-Magallanes, Y.G., Sosa-Gallegos, S.L., Santillán-Flores, M.A., Milián-Suazo, F. (2025). Role of environmental mycobacteria in the efficacy of the BCG vaccine against cattle tuberculosis. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1984.
<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1984>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Papel de las micobacterias ambientales sobre la eficacia de la vacuna contra la tuberculosis bovina

Role of environmental mycobacteria in the efficacy of the BCG vaccine against cattle tuberculosis

Vacuna contra la tuberculosis bovina/Bovine tuberculosis vaccine

González-Ruiz, S.^{1*}  <https://orcid.org/0000-0002-9463-1609>, Bárcenas-Reyes, I.¹  <https://orcid.org/0000-0001-8386-6560>, Contreras-Magallanes, Y.G.²  <https://orcid.org/0000-0001-7632-3154>, Sosa-Gallegos, S.L.¹  <https://orcid.org/0000-0002-9663-7772>, Santillán-Flores, M.A.³  <https://orcid.org/0000-0001-7423-8642>, Milián-Suazo, F.¹  <https://orcid.org/0000-0003-4893-4868>

¹Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. De las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230. Querétaro, Qro.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Campus II, Universidad Autónoma de Chiapas.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

*Corresponding Author:

Sara González-Ruiz. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de las Ciencias s/n; Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230, Querétaro, Qro., México. Teléfono: (442) 192 1200 ext. 5360. E-mail: sara.gonzalez@uq.mx

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa, que ocasiona severas pérdidas económicas, directas e indirectas, como limitaciones en la movilización y comercialización de animales y sus productos. En México, el control de la enfermedad se basa en la “prueba y sacrificio”, donde los animales reactores son enviados a rastro. Una alternativa para el control es la vacunación con BCG, la cual ya se ha probado en condiciones experimentales, demostrando una eficacia mayor al 60 %; sin embargo, existe la duda de que micobacterias ambientales enmascaran dicha eficacia. El objetivo de este trabajo fue descartar la presencia de micobacterias ambientales a través de la detección de IFN- γ en respuesta a los antígenos PPD-bovis y PPD-avium. A partir de muestras sanguíneas de animales vacunados y no vacunados con BCG-Phipps, y posteriormente desafiados a una cepa de campo de *M. bovis*, se obtuvo un promedio general de respuesta de IFN- γ , el cual fue significativamente superior cuando el estímulo se hizo con PPD-bovis, en comparación a la estimulación con PPD-avium, por lo que se concluye que las micobacterias ambientales no tienen influencia sobre la respuesta a la vacunación.

PALABRAS CLAVE:

Tuberculosis bovina, vacunación, cabras, IFN- γ , micobacterias.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious disease that causes severe direct and indirect economic losses, due to restrictions on the movement and marketing of live animals and animal products. In Mexico, disease control is based on "test and slaughter," where animals reactive to the tuberculin tests are sent to slaughter. An alternative for controlling this disease is vaccination with the BCG strain. Under experimental conditions, this vaccine has shown efficacy to reduce infection and disease dissemination, with an efficacy of about 60 %; however, there are some concerns about environmental mycobacteria masking this efficacy. The objective of this study was to rule out the influence of these mycobacteria by detecting IFN- γ in response to the antigens PPD-*bovis* and PPD-*avium*. Using blood samples from animals vaccinated and animals unvaccinated with the BCG, and the challenged with a field strain of *M. bovis*, the overall average of IFN- γ response was significantly higher in the stimulation with PPD-*bovis*. We conclude that environmental mycobacteria do not affect the efficacy of BCG in reducing infection in vaccinated cattle.

KEY WORDS

Bovine tuberculosis, vaccination, goats, IFN- γ , mycobacteria.

Introducción

La tuberculosis bovina (BTb) es una enfermedad infecto-contagiosa crónica, de distribución mundial que afecta a varias especies animales, tanto domésticas como silvestres. Es causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Taye *et al.*, 2021). Además de las severas pérdidas económicas que ocasiona a la ganadería, también representa un riesgo para la salud pública, debido a que entre el 3 y 10 % de los casos de tuberculosis en humanos son causados por *M. bovis* (World Health Organization, 2020).

El inventario de ganado bovino nacional es de alrededor de 30 millones de cabezas, de las cuales 91 % corresponde a la producción de carne y doble propósito, y el 9 % restante (2,700,000 cabezas), a la producción de leche. Hasta diciembre del año 2024, en México, el control de la tuberculosis se basaba en la estrategia de "prueba y sacrificio", estrategia que había sido exitosa en ganadería para producción de carne, donde la prevalencia de la enfermedad es <0.5 % (Rojas-Martínez *et al.*, 2021), pero con poco éxito en ganadería para la producción de leche, donde la tasa de prevalencia es mayor al 0.5 (rango de 0.1–14.2 %) (Perera-Ortíz *et al.*, 2021; SENASICA, 2024). Esta diferencia tiene una explicación, mientras los productores de ganado para carne tienen el incentivo económico de mantener su hato limpio para poder exportar animales en pie a los Estados Unidos de Norteamérica (US), los productores de leche no exportan, y la mayor parte de la leche que producen va a plantas pasteurizadoras. Esto, aunado al pobre comportamiento epidemiológico de la prueba oficial de la tuberculina, la prueba de pliegue caudal tiene una sensibilidad que va de 65.6 a 72 % y una especificidad del 68 al 98.6 % (Rivera *et al.*, 2009; Klepp *et al.*, 2019). No obstante, por razones de salud pública y económica, la erradicación de la BTb en México es una tarea impostergable, por lo que, actualmente para el control de la enfermedad se estableció el ACUERDO para la operación de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) donde se incorporan pruebas diagnósticas complementarias basadas en respuesta inmune en sangre y en biología molecular, como la prueba in vitro de IFN- γ , que distingue animales positivos por medio de la liberación celular de IFN- γ específico contra los antígenos *M. bovis* y

M. avium en plasma. Las micobacterias no tuberculosas (MNT) habitan de manera normal el suelo y agua; en estas, se incluyen más de 200 especies, por lo que, tanto los animales como lo humanos estamos en contacto frecuente con ellas desde el momento que tenemos contacto con el medio exterior (Falkinham, 2022).

Una estrategia para disminuir la prevalencia de la BTb en el ganado lechero que ha interesado a los productores es la incorporación de la vacunación al actual programa de control. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* y es una de las principales vacunas que se ha utilizado en humanos por más de 100 años que ha demostrado ser eficaz en la protección contra formas graves de la enfermedad (Okafor et al., 2023). Tras 230 pases de subcultivos necesarios para obtener una cepa viva atenuada que no causara enfermedad al ser inoculada en animales, se generó una variante genéticamente muy distante de su ancestro patógeno. Esta atenuación se atribuye a la pérdida de la Región Diferencial 1 (RD1) (Brosch et al., 2007). La BCG se ha probado experimentalmente para su uso potencial en diferentes especies animales determinando que dosis bajas (1×10^4 - 1×10^6) tienen una mayor eficacia que dosis altas (1×10^8) (Buddle et al., 2018), que la cepa de BCG utilizada no hace mucha diferencia en la eficacia (Srinivasan et al., 2021) y que la vacunación de animales de una semana de edad proporciona mejores resultados que si se aplica a becerros de 4-6 meses o a animales adultos (Hope et al., 2005). De igual manera, se ha reportado una eficacia de la vacuna del 67 % en promedio, con base a la cantidad y el tamaño de las lesiones en los animales vacunados en comparación a los no vacunados, así como por el número de bacilos viables por lesión (Vordermeier et al., 2002). Además de demostrar que el uso de la vacunación representa una herramienta valiosa en el control de la enfermedad en poblaciones donde la estrategia de “prueba y sacrificio” es inviable por los costos que esto conlleva (Fromsa et al., 2024).

Trabajos de nuestro grupo han demostrado que la primo-vacunación con la cepa BCG-Phipps y un refuerzo con un extracto proteico purificado de cultivo (EPP) tuvo una eficacia del 83 % en la reducción del número de lesiones, el tamaño de las lesiones y el número de bacilos por lesión de animales vacunados, comparado con los no vacunados (Canto-Alarcón et al., 2013). Además, se comprobó que presenta la misma eficacia en vaquillas, siendo totalmente inocua en vaquillas gestantes (Milián-Suazo et al., 2011). Se ha determinado también que el uso de refuerzos con subunidades de EPP mejora la protección (De Lisle et al., 1999; Young et al., 2007). Diversos estudios de vacunación en ganado bovino reportan que la sensibilización de los terneros a las micobacterias ambientales antes de la aplicación de la vacuna afecta negativamente la eficacia protectora de la BCG ya que puede causar respuestas inmunitarias reactivas cruzadas, bloqueando la eficacia de la vacuna (Buddle et al., 2002, Skinner et al., 2003, Buddle, 2010, Parlane & Buddle, 2015). Además, al carecer de la Región Diferencial 1 (RD1), la vacuna BCG no induce una respuesta de IFN-γ frente a los antígenos CFP-10 y ESAT-6, lo que permite su aplicación en el diagnóstico diferencial (Denis et al., 2007; Sopp et al., 2008).

La prueba oficial *in vivo* para el diagnóstico de la BTb es la prueba intradérmica doble comparativa de la tuberculina, donde se utiliza un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD-bovis) y uno de *M. avium* (PPD-avium). El uso de estos dos antígenos es necesario para descartar la posibilidad de interferencia de micobacterias ambientales, tales como *M. avium*, *M. paratuberculosis* o micobacterias atípicas, que pudieran reportar animales falsos positivos (OMSA, 2019). En general, un animal

infectado con *M. bovis* tiene en la sangre linfocitos que reconocen a antígenos propios en el PPD-*bovis*, como resultado inducen una respuesta de interferón gama INF- γ que puede ser detectado por un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales (Sánchez-López *et al.*, 2017). En estudios experimentales con vacunas contra la BTb se considera al INF- γ como el mejor marcador de respuesta inmune y de eficacia vacunal; sin embargo, en este tipo de estudios siempre existe la duda de si la liberación del INF- γ es debida a la exposición a la vacuna o a la posible exposición a bacterias ambientales, por lo que, para descartar esto último se hace necesario incorporar el antígeno PPD-*avium* (Díaz-Otero *et al.*, 2008; Borham *et al.*, 2022). En este contexto, la presente investigación compara, a través del ensayo *in vitro* de INF- γ (Bovigam), la respuesta de los animales vacunados a los antígenos *M. bovis* (antígeno vacunal) y de *M. avium* (antígeno representativo de micobacterias ambientales) en caprinos inmunizados con la cepa BCG-Phipps y posteriormente desafiados con una cepa de campo de *M. bovis*.

Material y Métodos

Animales experimentales

El experimento se realizó de acuerdo con lo descrito por Contreras-Magallanes *et al.* (2021). De manera resumida, el tamaño de animales por grupo se determinó por disponibilidad de recursos e incluyó 35 cabras de tres a cinco meses de edad, crusa de Alpina y Nubia, libres de tuberculosis confirmado con las pruebas de tuberculina y ELISA-IFN- γ (Bovigam), y a paratuberculosis con el kit de diagnóstico ID Screen® para muestras de suero y plasma (LABGENE Scientific SA, Châtel-Saint-Denis, Switzerland). Los animales fueron divididos de manera aleatoria en cinco grupos de siete animales cada uno y colocados en corrales preparados específicamente para los fines del experimento, con suficiente espacio y sombra, agua y comida *ad libitum*. El estudio se realizó en estricto apego a las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Autónoma de Querétaro, México. El Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Querétaro aprobó el protocolo (Número de Protocolo: 20FCN2019).

Vacunación, refuerzo y desafío

Los detalles están en Contreras-Magallanes *et al.* (2021). En resumen, los animales experimentales se distribuyeron aleatoriamente a los tratamientos en un diseño completo aleatorizado. La aplicación de la vacuna fue por vía subcutánea en la tabla del cuello. Los tratamientos fueron: 1) grupo control sin vacunar, 2) vacunación con 1×10^3 UFC de BCG, 3) vacunación con 1×10^3 UFC de BCG con refuerzo de EPP (720 µg/mL) al mes de la primo-vacunación, 4) vacunación con 1×10^2 UFC de BCG envuelta en quitosano con refuerzo de EPP (720 µg/mL) al mes de la primo-vacunación + PLGA (ácido láctico-co-glicólico, por sus siglas en inglés) y 5) vacunación con 1×10^3 UFC de BCG más refuerzo con EPP 720 (µg/mL) + quitosano. A todos los tratamientos se les agregó el adyuvante Montanide (MontanideTM). A los dos meses de la primo-vacunación, todos los animales fueron desafiados con una cepa de campo de *M. bovis*, y eutanasiados a los siete meses de iniciado el experimento.

Toma de muestras de sangre y estimulación de antígenos

Describo en [Contreras-Magallanes et al. \(2021\)](#). En resumen, la toma de muestras de sangre para la determinación de IFN- γ se realizó cada dos a tres semanas hasta la semana 30, con un total de 13 muestreos. La sangre se tomó de la vena yugular de los animales en tubos vacutainer con heparina. Para la prueba se usaron 750 μl de sangre completa de cada animal, la cual fue incubada en microplacas de 50 μl de PPD-*bovis* a concentración de 0.9 a 1.1 mg/ml y 50 μl de PPD-*avium* a concentración de 0.45 a 0.55 mg/ml. Como control negativo se utilizó PBS, y como control positivo 50 μl el mitógeno pokeweed, a una concentración de 1mg/mL (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Las microplacas fueron incubadas en un humidificador con 5 % CO₂ a 37°C por 20h. Las densidades ópticas (DO) del control negativo PBS se utilizaron para normalizar las lecturas del ELISA para calcular las densidades ópticas de cada antígeno. Así, las DO finales se obtuvieron substrayendo las lecturas de las muestras de PBS. La concentración de IFN- γ en sangre *in vitro* fue determinada durante 30 semanas (teniendo un total de 16 muestreos) con el kit comercial [Bovine IFN- γ microplate Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kit (ELISA; Bovigam®; Prionics AG, USA)].

Análisis estadístico

A través de un análisis de varianza (ANOVA) se comparó la concentración promedio de IFN- γ en sangre (DO en datos crudos) por grupo experimental para cada periodo de muestreo. La comparación de la concentración de IFN- γ en respuesta al estímulo con PPD-*bovis* y PPD-*avium* se hizo con una prueba de t de Student. En todos los análisis se consideró un nivel de confianza del 95 %. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software de estadística SPSS versión 22.

Resultados y Discusión

Respuesta de IFN- γ al PPD-*bovis* en sangre. A la fecha, la concentración de IFN- γ en sangre se considera uno de los mejores indicadores de eficacia de la vacuna BCG en modelos animales ([Rothel et al., 1992](#); [Vordermeier et al., 2002](#)). En nuestro estudio, la concentración de IFN- γ , medida por densidad óptica (DO) a 450 nm en un ELISA con el antígeno PPD-*bovis*, se presenta en la Tabla 1. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en los muestreos 1, 3 y 6 ($p > 0.05$); sin embargo, el grupo control mostró de manera consistente una menor concentración de IFN- γ en comparación con los grupos vacunados (2 a 5). De manera similar, al final del experimento (semanas 24, 28 y 30), no se detectaron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$).

En contraste, entre las semanas 8 y 22 sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos vacunados y el grupo control, lo que coincide con reportes previos que destacan que la vacunación con BCG induce una respuesta inmune celular mediada por IFN- γ frente a *M. bovis* ([Buddle et al., 2005](#); [Buddle et al., 1995](#)). El pico máximo de concentración de IFN- γ se alcanzó en la semana 20 (muestreo 9) para la mayoría de los grupos, con excepción del grupo 2, que alcanzó su máximo en la semana 18, es decir, un muestreo antes. Cabe destacar que cinco semanas

después del desafío (semana 18), el grupo 2, vacunado únicamente con la cepa BCG, mostró la mayor respuesta de IFN- γ , mientras que el grupo control presentó la más baja. Estos resultados concuerdan con lo descrito por [Vordermeier et al. \(2002\)](#), quienes demostraron que los animales vacunados con BCG presentan una respuesta más robusta de IFN- γ en comparación con los no vacunados. Asimismo, [Hope et al. \(2005\)](#) reportaron que los picos de IFN- γ suelen ocurrir pocas semanas después del desafío experimental, lo que coincide con lo observado en este estudio. No obstante, nuestros resultados difieren parcialmente de lo señalado por [Skinner et al. \(2003\)](#), quienes observaron que la exposición previa a micobacterias ambientales podía reducir la magnitud de la respuesta de IFN- γ ; en nuestro caso, la participación de micobacterias ambientales parece haber sido mínima, ya que los grupos vacunados mantuvieron diferencias significativas respecto al control durante la mayor parte del experimento.

Finalmente, todos los grupos regresaron a niveles basales hacia el muestreo 13 (semana 30), lo que concuerda con observaciones previas en las que la respuesta de IFN- γ tiende a declinar con el tiempo, aun en presencia de vacunación ([Buddle et al., 2002](#)). Este patrón refuerza la necesidad de considerar esquemas de refuerzo o estrategias combinadas que prolonguen la duración de la respuesta protectora en campañas de vacunación contra tuberculosis bovina (Figura 1).

Tabla 1. Concentración de IFN- γ para los grupos experimentales de cabras vacunadas contra la BTb y desafiadas con una cepa de campo de *M. bovis* con el antígeno PPD-bovis para cada semana de muestreo.

Semana muestreo	Grupo experimental	Media de IFN- γ (OD 450nm)	Desviación estándar	IC 95%	Valor de p
1	1	0.1866 ^a	0.2419	-0.0672; 0.4405	
	2	0.0914 ^a	0.0164	0.0762; 0.1066	
	3	0.0970 ^a	0.0366	0.0361; 0.1308	0.713
	4	0.1661 ^a	0.2277	-0.0440; 0.3767	
	5	0.1101 ^a	0.0751	0.0313; 0.1890	
3	1	0.01453 ^a	0.0350	0.1085; 0.1821	
	2	0.2711 ^a	0.0350	-0.0340; 0.5763	
	3	0.3282 ^a	0.1801	0.1616; 0.4949	0.25
	4	0.2578 ^a	0.1251	0.1421; 0.3736	
	5	0.1245 ^a	0.0331	0.0897; 0.1592	
6	1	0.1235 ^a	0.0367	0.0849; 0.1620	
	2	0.1377 ^a	0.0772	0.0662; 0.2091	
	3	0.2185 ^a	0.1406	0.0884; 0.3486	0.357
	4	0.2197 ^a	0.2122	0.0233; 0.460	
	5	0.1158 ^a	0.0275	0.0869; 0.1447	
8	1	0.2021 ^b	0.0180	0.1831; 0.2211	
	2	0.0947 ^a	0.0106	0.0849; 0.1044	0.001

		3	0.1114 ^a	0.0352	0.0788; 0.1440	
		4	0.0925 ^a	0.0366	0.0586; 0.1264	
		5	0.1495 ^{ab}	0.0663	0.0798; 0.2191	
11		1	0.1755 ^a	0.0436	0.1296; 0.2213	
		2	.3252 ^{ab}	0.0759	0.2550; 0.3954	
		3	.5140 ^b	0.1366	0.3877; 0.6402	0.05
		4	.3640 ^{ab}	0.2260	0.1750; 0.5529	
		5	.4252 ^{ab}	0.3734	-0.0385; 0.8889	
13		1	0.0988 ^a	0.0204	0.0773; 0.1203	
		2	0.2364 ^a	0.1450	0.1022; 0.3705	
		3	0.2405 ^a	0.0820	0.1647; 0.3164	0.49
		4	0.1848 ^a	0.1010	0.0914; 0.2783	
		5	0.1475 ^a	0.0401	0.1053; 0.1896	
16		1	0.2556 ^a	0.1852	0.0612; 0.4501	
		2	0.4712 ^{ab}	0.2387	0.2504; 0.6921	
		3	0.3667 ^{ab}	0.2463	0.1389; 0.5945	0.002
		4	0.7475 ^b	0.4321	0.3478; 1.1472	
		5	0.1013 ^a	0.04951	0.0493; 0.1532	
18		1	0.0933 ^a	0.0205	0.0717; 0.1149	
		2	1.1730 ^b	0.8178	0.4166; 1.9293	
		3	0.6585 ^{ab}	0.4943	0.2014; 1.1157	0.002
		4	0.4650 ^{ab}	0.3746	0.1184; 0.8115	
		5	0.1053 ^a	0.0307	0.0730; 0.1375	
20		1	0.7015 ^{ab}	0.2699	0.4181; 0.9848	
		2	1.022 ^{ab}	0.6780	0.3949; 1.6490	
		3	0.7787 ^{ab}	0.5017	0.3146; 1.2427	0.50
		4	1.4491bc	0.8747	0.6401; 2.2581	
		5	0.4566 ^{ab}	0.3581	0.0807; 0.8325	
22		1	0.2473 ^a	0.1335	0.1072; 0.3874	
		2	0.7285 ^{ab}	0.5109	0.2560; 1.2011	
		3	0.4198 ^{ab}	0.3974	0.0522; 0.7874	0.001
		4	1.2011 ^b	0.7193	0.5357; 1.8665	
		5	0.1071 ^a	0.0343	0.0711; 0.1432	
24		1	0.4270 ^a	0.2106	0.2059; 0.6480	
		2	0.3648 ^a	0.2789	0.1068; 0.6228	
		3	0.1421 ^a	0.0583	0.0881; 0.1960	0.137
		4	0.4712 ^a	0.4152	0.0872; 0.8553	
		5	0.2450 ^a	0.1186	0.1204; 0.3695	
28		1	0.3918 ^a	0.3512	0.0232; 0.7604	
		2	0.1785 ^a	0.0802	0.1043; 0.2528	
		3	0.1441 ^a	0.0780	0.0719; 0.2163	0.158
		4	0.2178 ^a	0.1717	0.0590; 0.3676	
		5	0.2430 ^a	0.0725	0.1668; 0.3191	
30		1	0.0688 ^a	0.0138	0.0542; 0.0833	
		2	0.1361 ^a	0.0556	0.0847; 0.1875	0.180
		3	0.1174 ^a	0.0529	0.0684; 0.1663	

	4	0.1205 ^a	0.0498	0.0744; 0.1667
	5	0.0665 ^a	0.0079	0.0581; 0.0748

Fuente: Elaboración propia

Respuesta de IFN- γ al PPD-avium en sangre. Con relación a la respuesta de IFN- γ en sangre estimulada con el antígeno PPD-avium, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en los muestreos 1, 6, 8 y 12 ($p > 0.05$); sin embargo, sí se detectaron diferencias ($p < 0.05$) en los muestreos 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 y 13 (Tabla 2). En particular, en los muestreos 4 y 9 el grupo 1 (grupo control) presentó los valores más altos de respuesta, mientras que en los demás muestreos se observó una mayor variabilidad entre los grupos (Figura 2).

Este comportamiento sugiere que la exposición a micobacterias ambientales puede inducir respuestas inespecíficas de IFN- γ , como se ha señalado previamente en bovinos y caprinos (Skinner *et al.*, 2003; Buddle, 2010). En concordancia, Hope *et al.* (2005) reportaron que las respuestas inducidas por PPD-avium no siempre reflejan una infección por *M. avium*, sino que pueden deberse a contactos frecuentes con micobacterias ambientales presentes en el suelo y el agua. Nuestros resultados difieren parcialmente de los descritos por Vordermeier *et al.* (2002), quienes observaron que la vacunación con BCG no generaba respuestas elevadas frente a PPD-avium, lo que permitía diferenciar la exposición a *M. bovis* de la exposición a micobacterias ambientales. En nuestro estudio, aunque en algunos muestreos el grupo control presentó respuestas más altas frente a PPD-avium, los grupos vacunados también mostraron reactividad variable, lo que coincide con lo propuesto por Parlame & Buddle (2015), quienes argumentan que las respuestas a PPD-avium pueden enmascarar la verdadera eficacia de la BCG cuando existe alta exposición ambiental a micobacterias no tuberculosas. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar la influencia de las micobacterias ambientales en la interpretación de pruebas basadas en la producción de IFN- γ . Además, sugieren que el uso complementario de antígenos más específicos, como ESAT-6 o CFP-10, podría mejorar la capacidad diagnóstica y reducir la interferencia generada por PPD-avium (Vordermeier *et al.*, 2001; Denis *et al.*, 2007).

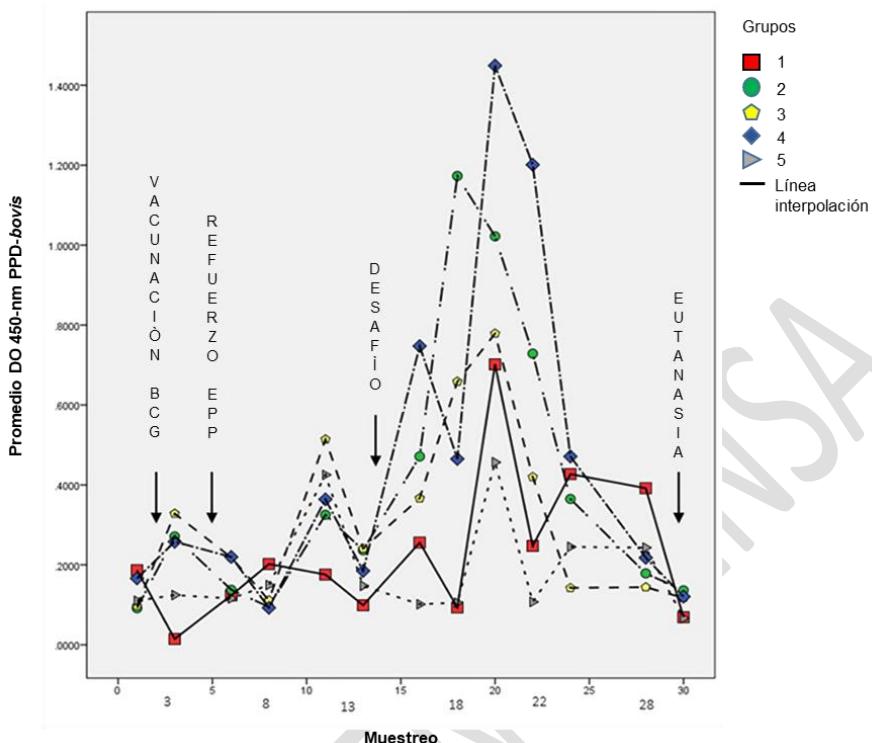


Figura 1. Concentración de IFN-γ en sangre de cabras estimuladas con el antígeno PPD-bovis para los 13 muestreos de los cinco grupos experimentales. Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450nm). Fuente: Elaboración propia a partir de Contreras-Magallanes *et al.* (2021).

Al comparar el promedio de la concentración de IFN-γ en células sanguíneas periféricas en respuesta al estímulo con los antígenos PPD-bovis y PPD-avium, de los grupos vacunados contra el grupo control, no se observó diferencia significativa en los muestreos 1-4, 6, 12 y 13 ($p > 0.05$), pero si en los muestreos 5 y 7-11 (Figura 3). El pico de concentración de IFN-γ para ambos casos se alcanzó en la semana 20, tanto para PPD-bovis como para PPD-avium, regresando a su nivel basal en la semana 30. Estos resultados significan que no existió exposición previa a *M. avium* u otras micobacterias ambientales que pudieran haber influido sobre la respuesta a la vacuna BCG-Phipps reportada en este experimento. Estudios han descrito lo anterior y demostrado que una exposición a micobacterias ambientales puede sesgar la respuesta inmune hacia PPD-avium (Alcaraz-López *et al.*, 2021).

En contraste con nuestros hallazgos, Buddle *et al.* (2002) y Parlame & Buddle (2015) han reportado que la sensibilización a micobacterias ambientales puede disminuir la eficacia protectora de la BCG y aumentar la reactividad frente a PPD-avium, lo cual complica la interpretación de las pruebas inmunodiagnósticas. Sin embargo, la ausencia de este efecto en nuestro estudio coincide con lo descrito por Vordermeier *et al.* (2002), quienes encontraron que la vacunación con BCG induce respuestas más robustas frente a PPD-bovis, sin que PPD-avium tenga un impacto significativo en la respuesta global.

Tabla 2. Concentración de IFN- γ para los grupos experimentales de cabras vacunadas contra la BTb y desafiadas con un cepa de campo de *M. bovis* con el antígeno PPD-avium para cada semana de muestreo.

Semana muestreo	Grupo experimental	Media de IFN- γ (DO 450nm)	Desviación estándar	IC 95%	Valor de p
1	1	0.0975 ^a	0.0492	0.0458; 0.1491	
	2	0.0945 ^a	0.0159	0.0797; 0.1093	
	3	0.0844 ^a	0.0158	0.0697; 0.0990	0.364
	4	0.072 ^a	0.0130	0.0600; 0.0841	
	5	0.0808 ^a	0.0166	0.0633; 0.0983	
3	1	0.1120 ^a	0.0186	0.0923; 0.1316	
	2	0.1748 ^a	0.1233	0.0607; 0.2889	
	3	0.2498 ^a	0.1068	0.1510; 0.3487	0.037
	4	0.2135 ^a	0.0985	0.1223; 0.3047	
	5	0.1158 ^a	0.0279	0.0865; 0.1451	
6	1	0.1296 ^a	0.0288	0.0993; 0.1599	
	2	0.1435 ^b	0.0485	0.0987; 0.1884	
	3	0.1182 ^a	0.0355	0.0854; 0.1511	0.043
	4	0.1060 ^a	0.0201	0.0873; 0.1246	
	5	0.0880 ^a	0.0125	0.0748; 0.1011	
8	1	0.1955 ^c	0.0134	0.1814; 0.2095	
	2	0.0967 ^a	0.0168	0.0811; 0.1123	
	3	0.0894 ^a	0.0159	0.0746; 0.1042	0.0001
	4	0.0744 ^a	0.0049	0.0698; 0.0790	
	5	0.1565 ^b	0.0295	0.1255; 0.1874	
11	1	0.0905 ^a	0.0108	0.0790; 0.1019	
	2	0.2651 ^{bc}	0.0448	0.2237; 0.3065	
	3	0.3362 ^{bc}	0.1124	0.2322; 0.4403	0.0001
	4	0.3262 ^{bc}	0.1403	0.1965; 0.4560	
	5	0.1563 ^b	0.0980	0.0534; 0.2592	
13	1	0.1345 ^a	0.1051	0.0241; 0.2448	
	2	0.2000 ^a	0.1642	0.0480; 0.3519	
	3	0.1385 ^a	0.0594	0.0836; 0.1935	0.627
	4	0.1260 ^a	0.0531	0.0768; 0.1751	
	5	0.1918 ^a	0.1335	0.0516; 0.3320	
16	1	0.1018 ^a	0.0512	0.0480; 0.1555	
	2	0.2734 ^{ab}	0.1031	0.1780; 0.3688	
	3	0.2661 ^{ab}	0.1201	0.1549; 0.3772	0.001
	4	0.3870 ^b	0.1358	0.2613; 0.5126	
	5	0.1380 ^a	0.0986	0.0345; 0.2414	
18	1	0.3460 ^a	0.2259	0.1088; 0.5831	
	2	0.4572 ^a	0.2444	0.2312; 0.6833	
	3	0.3542 ^a	0.3409	0.0389; 0.6695	0.713
	4	0.3592 ^a	0.1565	0.2145; 0.5040	
	5	0.2651 ^a	0.1669	0.0899; 0.4404	
20	1	0.5986 ^b	0.3491	0.2322; 0.9651	0.046

		2	0.4795 ^{ab}	0.1787	0.3142; 0.6449	
		3	0.1715 ^a	0.0505	0.1248; 0.2182	
		4	0.3542 ^{ab}	0.2693	0.1051; 0.6034	
		5	0.4540 ^{ab}	0.3026	0.1364; 0.7715	
22		1	0.1671 ^b	0.0881	0.0746; 0.2597	
		2	0.4264 ^{bc}	0.2908	0.1574; 0.6954	
		3	0.0751 ^a	0.0428	0.0354; 0.1147	0.003
		4	0.4662 ^c	0.3359	0.1556; 0.7769	
		5	0.0940 ^{ab}	0.0730	0.0173; 0.1706	
24		1	0.1738 ^{ab}	0.0910	0.0782; 0.2693	
		2	0.0765 ^{ab}	0.0160	0.0617; 0.0913	
		3	0.1465 ^{ab}	0.0573	0.0935; 0.1995	0.010
		4	0.0708 ^a	0.0407	0.0332; 0.1085	
		5	0.1818 ^b	0.1031	0.0735; 0.2900	
28		1	0.1838 ^a	0.0914	0.0879; 0.2797	
		2	0.2385 ^a	0.1733	0.0782; 0.3988	
		3	0.1557 ^a	0.0859	0.0762; 0.2352	0.765
		4	0.2058 ^a	0.1489	0.0681; 0.3435	
		5	0.2476 ^a	0.1934	0.0446; 0.4506	
30		1	0.0725 ^{ab}	0.0226	0.0487; 0.0962	
		2	0.0418 ^a	0.0213	0.0221; 0.0616	
		3	0.0535 ^a	0.0177	0.0371; 0.0700	0.001
		4	0.0521 ^a	0.0118	0.0411; 0.0630	
		5	0.0928 ^b	0.0270	0.0644; 0.0112	

Fuente: Elaboración propia

En conjunto, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que, bajo condiciones controladas, la interferencia de micobacterias ambientales en la respuesta inmune inducida por la BCG puede ser mínima o inexistente. Este hallazgo es relevante desde el punto de vista práctico, ya que respalda el potencial uso de la BCG-Phipps en campañas de vacunación contra tuberculosis bovina en regiones donde la exposición a micobacterias ambientales es frecuente.

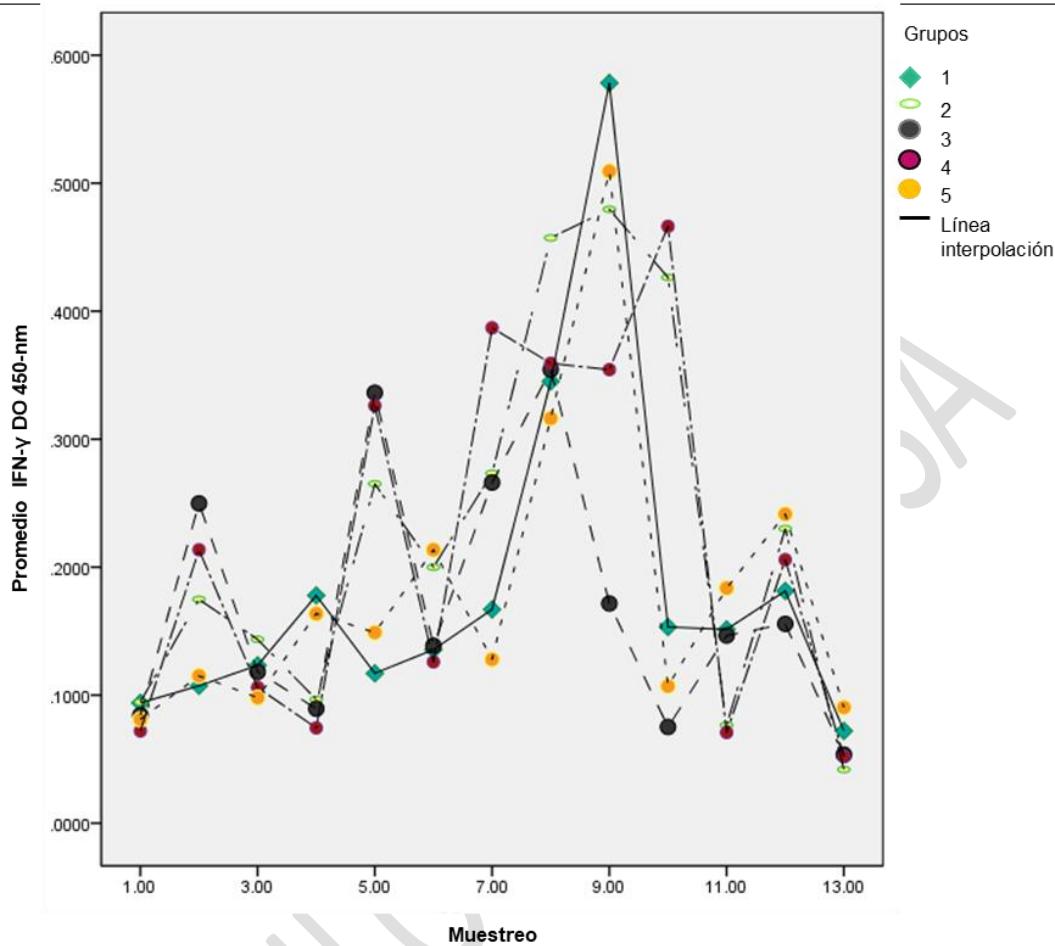


Figura 2. Concentración de IFN- γ en sangre de cabras estimulada con el antígeno PPD-*avium* para los 13 muestreos de los cinco grupos experimentales. Los valores están expresados en promedios de densidades ópticas (DO 450nm). Fuente: Elaboración propia a partir de Contreras-Magallanes *et al.* (2021).

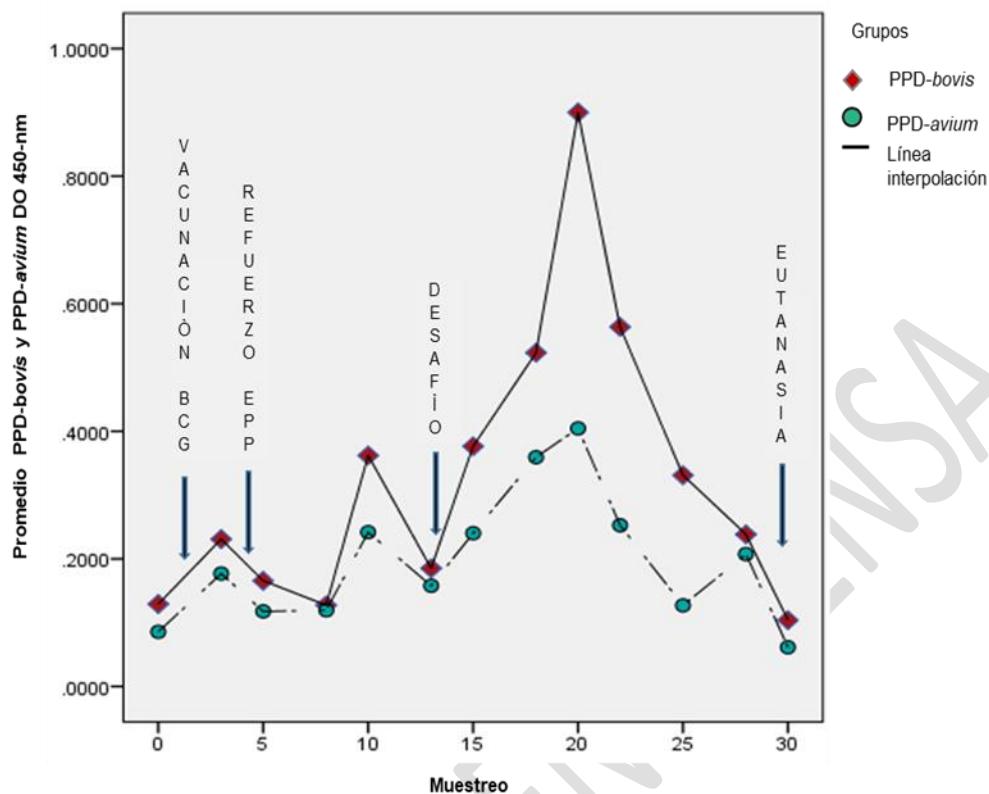


Figura 3. Respuesta antígeno-específica de IFN- γ en cabras posvacunación, posrefuerzo y posdesafío con una cepa de campo de *M. bovis*. Se utilizaron los PPD-bovis y PPD-avium para la estimulación de sangre completa *in vitro*. Los valores de respuesta de IFN- γ están expresados en densidades ópticas (DO 450nm). Fuente: Elaboración propia a partir de [Contreras-Magallanes et al. \(2021\)](#).

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que la respuesta de IFN- γ al estímulo de células sanguíneas periféricas con el antígeno específico PPD-bovis fue consistentemente superior a la obtenida con PPD-avium en los animales vacunados, en comparación con el grupo control, después de ser desafiados con una cepa de campo de *M. bovis*. Asimismo, el promedio general de respuesta en todos los grupos vacunados fue significativamente mayor frente a PPD-bovis que frente a PPD-avium, lo que confirma la especificidad de la respuesta inmune inducida por la vacuna.

Estos hallazgos sugieren que la participación de micobacterias ambientales en la modulación de la respuesta a la vacuna BCG (cepa Phipps) fue mínima o inexistente en este experimento, y que no influyó en su eficacia protectora. En términos prácticos, los resultados respaldan la viabilidad de incorporar la vacunación con BCG en programas de control y erradicación de tuberculosis bovina, incluso en regiones con alta exposición a micobacterias ambientales, ya que estas no comprometerían de manera significativa la respuesta inmune inducida por la vacuna. Esto indica que la participación de micobacterias ambientales sobre la respuesta a la vacuna en este experimento fue baja o nula y no tuvo influencia sobre la eficacia de la vacuna.

Comprender en detalle el impacto de la exposición a las MNT en la eficacia de la vacuna BCG es fundamental para el desarrollo continuo de nuevas vacunas contra la BTb, ya que podría ser un factor decisivo para su éxito en la vacunación animal.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo.; desarrollo de la metodología, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo, Bárcenas-Reyes.; validación experimental, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo, Sosa-Gallegos.; análisis de resultados, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo, Bárcenas-Reyes.; Manejo de datos, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo.; escritura y preparación del manuscrito, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo, Bárcenas-Reyes, Santillán-Flores.; administrador de proyectos, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo.; adquisición de fondos, González-Ruiz, Contreras-Magallanes, Milián-Suazo. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con el número FON.INST./239/2018.

Declaraciones éticas

Los autores declaran una previa autorización para la realización del proyecto por parte del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro con número de folio 20FCN2019.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento con el número FON.INST./239/2018.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Alcaraz-López, O.A., Flores-Villalva, S., Cortéz-Hernández, O., Vigueras-Meneses, G., Carrisoza-Urbina, J., Benítez-Guzmán, A., Esquivel-Solís, H., Werling, D., Salguero-Bodes, F.J., Vordemeier, M., Villarreal-Ramos, B., & Gutiérrez-Pabello, J.A. (2021). Association of immune responses of Zebu and Holstein-Friesian cattle and resistance to mycobacteria in a BCG challenge model. *Transboundary and Emerging Diseases*. 68(6),3360-3365. <https://doi.org/10.1111/tbed.13939>
- Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H.O., Al-Gaabary, M., & Matsumoto, T. (2022). Review on Bovine Tuberculosis: An Emerging Disease Associated with Multidrug-Resistant *Mycobacterium* Species. *Pathogens*. 11(7),715. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>
- Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., ... & Cole, S. T. (2007). Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5596–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700869104>
- Buddle, B.M. (2010). Tuberculosis vaccines for cattle: The way forward. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1121–1124. <https://doi.org/10.1586/erv.10.112>
- Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., & Wedlock, D.N. (2005). Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and

- protection against bovine tuberculosis. *Vaccine*. 23(27),3581-9.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.150>
- Buddle, B.M., de Lisle, G.W., Pfeffer, A., & Aldwell, F.E. (1995). Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine*. 13(12),1123-30.
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)00055-r](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)00055-r)
- Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., & de Klerk-Lorist, L.M. (2018). Efficacy and Safety of BCG Vaccine for Control of Tuberculosis in Domestic Livestock and Wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*. 26(5),259.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00259>
- Buddle, B.M., Wards, B.J., Aldwell, F.E., Collins, D.M., & De Lisle, G.W. (2002). Influence of sensitization to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine*, 20(7), 1126–1133. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00436-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00436-4)
- Cantó-Alarcón, G.J., Rubio-Venegas, Y., Bojorquez-Narvaez, L., Pizano-Martínez, O.E., García-Casanova, L., Sosa-Gallegos, S., Nava-Vargas, A., Olvera-Ramírez, A.M., & Milián-Suazo, F. (2013). Efficacy of a vaccine formula against tuberculosis in cattle. *PLoS One*. 8(10), e76418.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076418>
- Contreras-Magallanes, Y.G., Durán-Aguilar, M., Sosa-Gallegos, S.L., Álvarez, Á.H., Andrade-Santillán, F.A., Bárcenas-Reyes, I., González-Ruiz, S., Rodríguez-Hernández, E., Cantó-Alarcón, G.J., & Milián-Suazo, F. (2021). Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model. *Animals (Basel)*. 11(4),1046. <https://doi.org/10.3390/ani11041046>
- De Lisle, G.W., Wilson, T., Collins, D.M., & Buddle, B.M. (1999). Vaccination of guinea pigs with nutritionally impaired avirulent mutants of *Mycobacterium bovis* protects against tuberculosis. *Infection and Immunity Journal*. 7(5),2624-6. <https://doi.org/10.1128/iai.67.5.2624-2626.1999>
- Denis, M., Wedlock, D.N., McCarthy, A.R., Parlame, N.A., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., & Buddle, B.M. (2007). Enhancement of the sensitivity of the whole blood gamma interferon assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infections in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14,1483–1489.
<https://doi.org/10.1128/cvi.00291-07>
- Díaz-Otero, F., Padilla, J., Jaramillo, L., González, D., & Arriaga, C. (2008). Evaluation of BCG vaccine and *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins against bovine tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149,306-8. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.014>
- Falkinham, J.O. (2022). Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Tuberculosis*, 137, 102267.
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102267>
- Fromsa, A., Willgert, K., Srinivasan, S., Mekonnen, G., Bedada, W., Gumi, B., Lakew, M., Tadesse, B., Bayissa, B., Sirak, A., Girma-Abdela, M., Gebre, S., Chibssa, T., Veerasami, M., Vordermeier, H.M., Bakker, D., Berg, S., Ameni, G., Juleff, N., & Kapur, V. (2024). BCG vaccination reduces bovine tuberculosis transmission, improving prospects for elimination. *Science*. 383,6690. <https://doi.org/10.1126/science.adl3962>
- Hope, J.C., Thom, M.L., Villarreal-Ramos, B., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., & Howard, C.J. (2005). Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clinical & Experimental Immunology*. 139(1),48-56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02668.x>
- Klepp, L.I., Eirin, M.E., Garbaccio, S., Soria, M., Bigi, F., & Blanco, F.C. (2019). Identification of bovine tuberculosis biomarkers to detect tuberculin skin test and IFN- γ release assay false negative cattle. *Research in Veterinary Science*. 122,7-14. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.016>
- Milián-Suazo, F., Gutiérrez-Pabello, J.A., Bojórquez-Narváez, L., Anaya-Escalera, A.M., Cantó-Alarcón, G.J., González-Enríquez, J.L., & Campos-Guillén, J. (2011). IFN- γ response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. *Research in Veterinary Science*. 90(3),419-24.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.018>
- Okafor, C.N., Rewane, A., & Momodu, I.I. (2023). Bacilo de Calmette y Guerin. En: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538185/>
- OMSA [Organización Mundial de Sanidad Animal]. Controlling bovine tuberculosis: a One Health challenge. Bulletin #2019-1. Available from: <https://bulletin.woah.org/wp-content/uploads/bulletins/panorama-2019-1-en.pdf>
- Parlane, N.A., & Buddle, B.M. (2015). Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(1), 44–53. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40588-014-0009-4>
- Perera-Ortiz, A., Perea, C., Dávalos, E., Flores-Velázquez, E., Salazar-González, K., Rosas-Camacho, E., García-Latorre, E.A., Salinas-Lara, C., Muñiz-Salazar, R., Bravo, D.M., Stuber, T.P., Thacker, T.C., & Robbe-Austerman, S. (2021). Whole genome sequencing links *Mycobacterium bovis* from cattle, cheese and humans in Baja California, Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*. 3(8),674307.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.674307>

Rivera, P.S., Jiménez, J.F., & Deward, J. (2009). Valoración de las pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina en un rebaño bovino ubicado en zona de alta incidencia del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 19(6), 566–575. https://ve.scien.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000600003

Rojas-Martínez, C., Loza-Rubio, E., Rodríguez-Camarillo, S.D., Figueroa-Millán, J.V., Aguilar-Romero, F., Lagunes-Quintanilla, R.E., & Álvarez Martínez, J. A. (2021). Antecedentes y perspectivas de algunas enfermedades prioritarias que afectan a la ganadería bovina en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 12, 111–148. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5848>

Rotheil, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., & Wood, P.R. (1992). The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal*. 69(1), 1-4. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09848.x>

Sánchez-López., A.D., Flores-Villalva, S., & Gutiérrez-Pabello, J.A. (2017). *Mycobacterium bovis* induce una respuesta inmune celular heterogénea en bovinos infectados naturalmente. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 9(1), 171–183. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i1.4320>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA]. Situación Actual de la Tuberculosis Bovina en México. México (2024). Consultado el 2 de septiembre de 2025). Available online at: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-de-tuberculosis-bovina?state=published>

Skinner, M.A., Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Keen, D., Lisle, G.W., Tascon, R.E., Ferraz, J.C., Lowrie, D.B., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., & Hewinson, R.G. (2003). A DNA Prime-*Mycobacterium bovis* BCG Boost Vaccination Strategy for Cattle Induces Protection against Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity*, 71(9), 4901. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4901-4907.2003>

Sopp, P., Coad, M., Hewinson, G., Howard, C.J., Cheallaigh, C.N., Keane, J., Harris, J., & Hope, J.C. (2008). Development of a simple, sensitive, rapid test which discriminates BCG-vaccinated from *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vaccine* 26, 5470–5476. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.059>

Srinivasan, S., Conlan, A.J.K., Easterling, L.A., Herrera, C., Dandapat, P., Veerasami, M., Ameni, G., Jindal, N., Raj, G.D., Wood, J., Juleff, N., Bakker, D., Vordermeier, M., & Kapur, V. (2021). A Meta-Analysis of the Effect of Bacillus Calmette-Guérin Vaccination Against Bovine Tuberculosis: Is Perfect the Enemy of Good? *Frontiers in Veterinary Science* 18(8), 637580. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.637580>

Taye, H., Alemu, K., Mihret, A., Wood, J.L.N., Shkedy, Z., Berg, S., & Aseffa, A. (2021). Global prevalence of *Mycobacterium bovis* infections among human tuberculosis cases: Systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health* 68(7), 704–718. <https://doi.org/10.1111/zph.12868>

Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Simmons, J., & Hewinson, R.G. (2002). Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental Bovine Tuberculosis. *Infection and Immunity Journal*. 70(6), 3026–32. <https://doi.org/10.1128/iai.70.6.3026-3032.2002>

Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmer, N., & Hewinson, R.G. (2001). Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of Bovine Tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(3), 571–8. <https://doi.org/10.1128/cdli.8.3.571-578.2001>

World Health Organization [WHO]. (2020). Geneva: Global tuberculosis report 2020. Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available from: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/b1692b45-a92a-4871-8392-72080827ea6d/content>

Young, S.L., Slobbe, L., Wilson, R., Buddle, B.M., De Lisle, G.W., & Buchan, G.S. (2007). Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infection and Immunity Journal*. 75, 2833–2840. <https://doi.org/10.1128/iai.01826-06>