

MODELOS ANIMALES PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS CONTRA TUBERCULOSIS

Q.F.B. Michel de Jesús Aceves Sánchez y Dr. Mario Alberto Flores Valdez

Introducción.

El desarrollo de una vacuna implica varias fases de estudio, donde el uso de modelos animales en las fases preclínicas continúa siendo de suma importancia para el estudio de candidatos a vacuna en vías de verificar seguridad y eficacia en organismos completos más que en células aisladas en modelos bi- o tri-dimensionales, o por predicciones bioinformáticas únicamente, herramientas que no han podido reemplazar el uso de los modelos para evaluar la respuesta inmune desencadenada contra un patógeno de interés. La semejanza entre la fisiología humana y animal en algunos aspectos de los distintos modelos ha sido útil debido a que proporciona valiosa información acerca de los sistemas humanos. En el estudio de la tuberculosis existen diferentes modelos vivos como ratones, cobayos, conejos, primates, terneros bovinos, pez cebra, ratas, hurones, mini cerdos, moscas de la fruta, nemátodos, planarias, e incluso amibas. A pesar de la contribución de cada modelo, ninguno ha podido emular en su totalidad la enfermedad en humanos. La selección del modelo animal correcto es crítico para el éxito de la evaluación de un candidato a vacuna, además de que esto ayuda a reducir el número animales utilizados en la investigación. En este trabajo, sólo nos enfocaremos a describir el uso preclínico de los modelos más ampliamente estudiados a la fecha.

Diseño de vacunas

El objetivo de cualquier vacuna es provocar una respuesta inmune protectora y de memoria contra un patógeno de interés, por lo cual se requiere contar con los datos necesarios que determinen su viabilidad para conferir protección. Tal información es recopilada durante el diseño de la vacuna y sus ensayos preclínicos. Los modelos animales son de utilidad porque permiten determinar diferentes aspectos en términos de seguridad y eficacia. Respecto a la efectividad, esta se evalúa con distintos parámetros como son i) la protección en el reto a infección del patógeno de interés o la enfermedad, ii) dosis y formulación de la vacuna, iii) ruta óptima de administración, iv) la evaluación de la aparición, duración, tipo y magnitud de la inmunidad y v) la correlación de la inmunogenicidad con respecto a la protección ¹.

Los criterios para considerar a un modelo animal como pertinente, son el grado de similitud de la enfermedad en el modelo respecto a los humanos incluyendo modo y ruta de infección, la dosis infectiva, el acceso a los distintos compartimentos inmunes, la respuesta inmune similar posterior a la vacunación y en la capacidad de correlacionar la protección y la progresión de la enfermedad y patogénesis. En cuanto a este último punto, para la tuberculosis es importante considerar la carga bacteriana, los cambios patológicos en el pulmón, la reducción de los síntomas y la recaída a la enfermedad activa o daños asociados a la misma ¹⁻³.

Idealmente, se considera que un buen modelo para evaluar la eficacia de una vacuna debe de tener la misma especie patógena a los humanos como agente infeccioso. Sin embargo, en este punto se pueden ubicar dos tipos de modelos disponibles, los cuales son el natural y el sustituto. En los modelos naturales, el agente patógeno en animales es uno similar al agente infeccioso en humanos, pero no infeccioso para estos últimos, el cual se utiliza para evaluar protección de la vacuna desarrollada ⁴.

En el caso de las enfermedades zoonóticas, se puede utilizar el mismo agente patógeno, ya que puede causar la misma enfermedad tanto en humanos como en animales. Criterios como la similitud en la genética y antigenicidad de los patógenos, además de los órganos blanco, patogénesis y signos clínicos son clave para utilizar alguna especie como modelo. En el caso de los modelos sustitutos, el patógeno en humanos es utilizado para retar especies animales heterólogas considerando sus debidas restricciones. Para la selección del agente infeccioso, los criterios importantes para la validez de su uso como modelo incluye la similitud de la ruta de entrada y la infección, además del nivel de replicación y enfermedad en los órganos blanco. En estos modelos, el patógeno es capaz de replicarse, pero no necesariamente causar la enfermedad clínica, y si la enfermedad se desarrolla, los síntomas son usualmente menos severos ⁴.

Por otro lado, durante el ensayo, también habrá que considerar otras variables que pueden ser controladas en el laboratorio como la dieta, la exposición a otros patógenos y parásitos del medio ambiente, así como y la susceptibilidad genética de cada especie ⁵.

Comparación de modelos animales para la evaluación de vacunas contra tuberculosis

Existen diferentes modelos animales aplicados a la investigación de la tuberculosis y aunque ninguno imita por completo las características que ocurren durante la infección del ser humano, todos ellos proporcionan información valiosa respecto alguna etapa de la enfermedad. Su uso permite estudiar varias etapas de la progresión de la TB como la formación del granuloma, licuefacción, formación de cavitaciones y diseminación hematogena en modelos animales. En estos modelos se pueden observar síntomas de la enfermedad como fiebre, pérdida de peso, radiografías anormales y daño pulmonar, y si la enfermedad no es tratada, eventualmente mueren, como es el caso de los humanos. Sin embargo, adicional a cuestiones inmunológicas y similitud de la enfermedad en humanos, la elección de modelo se deberá considerar también el costo, disponibilidad, espacio, así como los requerimientos de bioseguridad. Las diferencias y complejidad de cada modelo animal en conjunto con los recursos disponibles para los ensayos antes mencionados influirán en la reproducibilidad de los resultados y el valor de las pruebas de eficacia en animales, sin embargo, su consideración representa la oportunidad de mejora en un ensayo. Las diferencias se especifican en la Tabla 1.

Modelos murinos

El ratón es uno de los modelos experimentales más popular y ampliamente utilizado contando con varias especies que pueden ser utilizadas como modelo, entre las más comunes se encuentran C57BL/6, BALB/c, DBA/2 y C3H/HeJ, CBA y 129/SvJ, cada una de ellas bien caracterizadas, pero con algunas diferencias a nivel inmunológico y que van en niveles de resistencia/susceptibilidad innata a la TB. Las principales diferencias entre cepas se observan con el grado de susceptibilidad a la infección y sobrevivencia. Las cepas CBA, DBA/2, C3H y 129/SvJ se clasifican como altamente susceptible, mientras que BALB/c y C57BL/6 se consideran altamente resistentes, dada su capacidad de contener la enfermedad⁶. Aunque ambos grupos difieren en la capacidad en el control de la replicación bacteriana en pulmón, siendo menor en los susceptibles, en hígado y bazo ambos son capaces de contener el crecimiento bacilar. Histopatológicamente, los granulomas en ratones resistentes están bien organizados, mientras que las lesiones en los ratones susceptibles son a menudo mal organizadas, necróticas y contienen pocos linfocitos⁷. Por

otro lado, los ratones susceptibles en algunos casos han mostrado un deficiente mantenimiento de la inmunidad o la generación de una respuesta inmune de memoria ⁸. Las cepas C57BL/6 y BALB/c inmunizadas por BCG pueden sobrevivir dos veces más que las cepas DBA/2 y C3H/HeJ tras ser retadas con *M. tuberculosis* vía aerosol. Así mismo se ha observado que tras la inoculación intravenosa de la cepa H37Rv en ratones BALB/c y DBA/2, las cuentas en pulmón en la fase estacionaria era 2 log superior en éste último ^{9,10}. No obstante, entre cepas es diferente el efecto protector después de la vacunación. Mientras que las cepas resistentes C57/BL6 y BALB/c muestran una buena protección inducida por la vacuna, la inmunización parenteral con BCG no confiere eficacia protectora en las cepas sensibles CBA/J o DBA/2 ¹¹.

Sumado a estas especies se han desarrollado modelos humanizados o deficientes en genes para estudiar alguna etapa de la enfermedad o mecanismo en específico en la patogénesis. También está el uso de ratones desnudos inmunodeficientes para la evaluación de seguridad de vacunas contra la TB en vivo y como sustituto del efecto de la vacunación en personas infectadas por el VIH ¹².

Quizá la ventaja más palpable sea la económica, ya que permite evaluar gran cantidad de vacunas y utilizar un número muy amplio de ratones, además de la disponibilidad de reactivos inmunológicos. Sin embargo, la manipulación y la inducción de la enfermedad también son algo por lo cual se puede considerar. Los ratones pueden ser fácilmente infectados por diferentes vías, incluyendo aerosoles con una baja dosis de microorganismos, con la multiplicación del bacilo en los pulmones y la posterior diseminación al hígado y al bazo. La infección es controlada más no eliminada por la inmunidad mediada por células, principalmente por la respuesta de las células T.

En el ratón se pueden determinar la ruta de inmunización, tipo de adyuvante y cómo el antígeno específico afecta a la capacidad de las células T de memoria a acumularse en el sitio de desafío ⁶. En esta estrategia, los ratones son inmunizados y generalmente retados a los 30 días con una baja dosis en aerosol de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* el cual puede multiplicarse en los pulmones y diseminarse hacia otros órganos, más notablemente en hígado y bazo. Después de un intervalo de 4 semanas, los ratones son sacrificados y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón y bazo son enumeradas por extensión en placa en un medio de cultivo. La candidata a vacuna es evaluada por su habilidad de reducir la carga bacteriana a un nivel el cual es estadística y significativamente

menor que el control solución salina. BCG, es tomado como control positivo y en este modelo, es posible obtener la reducción de un logaritmo en cuentas bacilares ².

La naturaleza de la protección y la limitada extrapolación en los seres humanos de los resultados observados debido a la resistencia innata del modelo a la tuberculosis y la generación de una fuerte respuesta celular contra la infección por TB constituyen las principales desventajas, sumado a diferencias en las manifestaciones clínicas como la formación del granuloma ¹³. Por otra parte, la corta vida del ratón limita algunos estudios como es el caso de la latencia.

No obstante, el modelo murino presenta varias ventajas en los estudios inmunológicos de la TB y se ha encontrado disponible como el primer tamiz de las candidatas a vacuna y la eficacia de nuevas candidatas a vacuna, y para la posterior evaluación en otros modelos animales para la TB una vez que se ha demostrado muestran una buena protección en ratones.

Conejillos de indias

Los conejillos de indias son un modelo bien caracterizado, en el cual se ha observado su extrema sensibilidad a la infección por *M. tuberculosis*. El modelo replica muchos aspectos de la infección de la tuberculosis en los seres humanos, incluyendo la formación de granulomas, primaria y lesiones pulmonares hematógenas, la difusión y la necrosis caseosa ¹⁴. Este modelo es útil para identificar la quimioterapia efectiva contra la tuberculosis, vacunas adecuadas, además del potencial rol de los constituyentes micobacterianos como factores de virulencia ^{15,16}. Este ha sido un modelo útil para evaluar muchos tipos de vacunas, incluyendo bacilos no viables, micobacterias atenuadas, diferentes cepas de BCG, vacunas subunitarias recombinantes, y vacunas de ADN ⁶.

El conejillo de indias también se replica muchos aspectos de la infección de la tuberculosis en los seres humanos (especialmente la tuberculosis infantil y la tuberculosis en pacientes inmunodeprimidos), incluyendo la formación de granulomas, primaria y lesiones pulmonares hematógena, la difusión y la necrosis caseosa ¹⁴. La principal diferencia con los humanos es la inherente susceptibilidad de los conejillos de indias, ya que la mayoría de los seres humanos infectados pueden contener la infección por *M. tuberculosis* ¹⁷.

El conejillo de indias se puede infectar eficientemente con aerosoles a bajas dosis, mostrando un curso invariablemente fatal de la progresión de la enfermedad ¹⁸. Esta característica le proporciona al modelo un parámetro confiable para estudiar la protección para el candidato a vacuna. Durante la evaluación de vacunas, las diferencias en la reducción logarítmica de la carga bacteriana son fácilmente apreciables ya que en comparación con el modelo murino, que se consigue solamente la reducción logarítmica de ~ 1 unidad de la carga bacilar máxima en pulmón por la vacuna BCG, la reducción es de 2-3 unidades logarítmicas en conejillos de indias inmunizados, lo cual proporciona un espectro más amplio para evaluar la eficacia de candidatos a vacunas ^{15,16}. La reducción o prevención del daño tisular es un criterio importante el cual puede ser fácilmente evaluado en este modelo durante el desarrollo de una vacuna. Este modelo es similar al modelo murino, sin embargo, los experimentos abiertos del tipo de sobrevivencia pueden durar hasta dos años ¹⁹.

Las desventajas del uso como modelo tamiz de primer orden son el alto costo de crianza de los animales en condiciones de bioseguridad comparado con los bajos costos que implican mantener ratones y la limitada disponibilidad de reactivos para evaluar los factores inmunológicos implicados en la protección en estudios vacunales. No obstante, el número de reactivos para el uso en estudios inmunológicos ha ido en aumento.

Conejos

El conejo ha sido utilizado por su resistencia innata a la tuberculosis, además de tener un mostrar características propias de la enfermedad en humanos, incluyendo las mismas etapas de la enfermedad. En los conejos infectados con TB, el tejido pulmonar es destruido, en gran parte como resultado de la reacción del propio huésped a los antígenos del bacilo. El curso de la infección para estos animales entre las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* presenta una marcada diferencia en la virulencia, por lo que el modelo es ha sido utilizado para diferenciar la infección entre tales cepas ⁶.

En general, los conejos son resistentes y capaces de contener la enfermedad causada por la cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Con la infección *M.bovis*, los conejos forman

crónicamente cavidades pulmonares fibrosas. Finalmente, los granulomas en conejos, con sus centros caseosos ²⁰.

Las limitaciones de este modelo incluyen la falta de reactivos inmunológicos comerciales, costos de los animales y su mantenimiento, el espacio requerido y variabilidad de los resultados por la falta en la disponibilidad de conejos consanguíneos. Además, el uso de este modelo en la evaluación de vacunas ha sido limitado, por lo cual no se cuenta con información suficiente.

Modelos de primates

Son el modelo de elección ideal para evaluar vacunas humanas contra muchos patógenos. Responden de manera similar a los humanos en muchos aspectos inmunológicos, patológicos y además comparten manifestaciones clínicas comunes para la TB, incluyendo signos y síntomas pulmonares y extrapulmonares. En este modelo la ruta, dosis de infección y la especie infectada determinará si la infección progresa a TB aguda, crónica o latente ²¹. Sin embargo, debido a su acceso limitado y alto costo de mantenimiento, se usan sólo en las últimas etapas del desarrollo para ciertos patógenos. La enfermedad en monos es usualmente una enfermedad progresiva pulmonar con diseminación hematógena y bronquial del bacilo. Además, se puede presentar necrosis caseosa extensiva junto con la licuefacción del material caseoso y la formación de cavitación ²². Adicionalmente, una ventaja sobre otros modelos es la presencia en primates de varias moléculas del huésped implicadas en las infecciones por TB en humanos ²³. Por otro lado, la inmunización con BCG disminuye la carga bacteriana en pulmón y la severidad de la infección después de la exposición al patógeno ¹⁹, previniendo lesiones pulmonares visibles en algunos animales después de la inhalación de bajas dosis de *M. tuberculosis*.

A la fecha se emplean principalmente 2 especies: los monos/macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) y los macacos cangrejeros (*cynomolgous*, *Macaca fascicularis*), siendo estos últimos más resistentes a la infección, pero no tanto como los humanos inmunocompetentes ^{21,22}. Además, los macacos cangrejeros se protegen de forma más eficiente después de la vacunación con BCG que los monos Rhesus y en consecuencia ofrecen un buen modelo experimental para la evaluación de nuevas vacunas donde la protección podría ser medida

en términos de la capacidad de reducir síntomas, la patología y carga bacteriana ²⁴. Diferencias adicionales se enlistan en la Tabla 2.

Los primates tienen una ventaja sobre otros modelos por la similitud a la tuberculosis humana, el espectro de la enfermedad y la patología, además de la disponibilidad de reactivos para estudiar los parámetros inmunológicos. Esto se traduce en obtener resultados que son más directamente aplicables al manejo de la enfermedad en humanos. Sin embargo estos modelos tienen algunas desventajas como el alto costo, requerimientos de amplias instalaciones de bioseguridad, el uso de equipos especializados y técnicas estandarizadas para la infección vía aerosol, además de la disponibilidad de animales endógenos. Habrá que considerar que el uso de animales no consanguíneos puede causar variabilidad en los experimentos, sin embargo esto establecerá condiciones más parecidas a lo que ocurre en la población humana. Adicional a esto, se debe tomar en cuenta que los animales con tuberculosis son contagiosos a otros animales, incluyendo otros monos y al personal de laboratorio, poniendo en serio riesgo una instalación animal. Si bien, el modelo de los primates parece ser atractivo para la investigación de la tuberculosis, son estos factores los que limitan el uso de este modelo en muchas instituciones de investigación.

Consideraciones finales

Los modelos animales son de suma importancia en diferentes etapas de la investigación para el desarrollo de vacunas, por que permiten determinar mecanismo, ruta, y la transmisión de la enfermedad, la respuesta inmune del huésped a la infección y vacunación, así como la duración de la protección inducida. Sin embargo, la correcta selección de modelos previamente caracterizados en cuanto a su respuesta inmune y semejanza con el humano respecto a la progresión de la tuberculosis contribuirá a tener datos robustos y confiables y de esta forma avanzar a las siguientes fases en la evaluación de un candidato a vacuna. Habrá que considerar entonces, las ventajas y limitaciones del modelo, a las que se le sumarán requerimientos de espacio y condiciones BSL 3, la disponibilidad de animales, costo de los mismos y su mantenimiento, dificultades de manejo y cuestiones éticas. Si bien el éxito de una vacuna puede ser evaluado en términos de la protección conferida por la capacidad de reducir síntomas, la patología y carga bacteriana, no todos los modelos permiten discriminar dentro de estos parámetros la factibilidad de usar una candidata como vacuna. En la selección del modelo adecuado a fin de mejorar el diseño de la evaluación, no se deberá dejar de lado la susceptibilidad inherente de cada especie

animal, ya que la protección se puede detectar más fácilmente en modelos o cepas susceptibles, evitando que la resistencia a la enfermedad impida apreciar la protección o efectos perjudiciales del tratamiento. Adicional a esto, el uso de protocolos de evaluación en modelos animales bien racionalizados permitirá la elección correcta del modelo, la reducción de animales, la intervención de herramientas informáticas cuando son válidas y necesarias, lo cual a su vez impactará en los resultados y costes.

Tabla 1. Comparación entre modelos animales contra la tuberculosis				
Parámetro	Ratón	Conejillo de indias	Conejo	Primates
Respuesta inducida tras la vacunación con BCG	Sí	Sí	Sí	Sí
Patología				
Granulomas	Poco organizados	Bien estructurado	Bien estructurado	Bien estructurado
Necrosis	Mínima, puede depender del estado inmunológico	Sí	Sí	Sí
Caseación	Usualmente no o muy pobre	Sí	Sí	Sí
Cavidades pulmonares	No	Poco frecuente	Sí	Sí
Lesiones diseminadas	Granulomas confluentes causando finalmente la muerte	Diseminación hematogena; pulmones destruidos por continuar necrosis caseosa	La enfermedad se cura, con excepción de la formación de cavidades y la difusión bronquial	Diseminación hematogena; pulmones destruidos por continuar necrosis caseosa
Susceptibilidad relativa a <i>M. tuberculosis</i>	Baja	Muy alta	Muy baja a <i>M. tb</i> , Utiliza típicamente <i>M. bovis</i> para evaluar susceptibilidad	Alta
Inmunidad mediada por células	Buena	Pobre	Buena	Pobre
Presenta una infección latente a TB como en humanos	No Se utilizan diversos modelos modificados para ello	No	No	Sí
Experimentación				
Usos experimentales más comunes	Inmunología de la TB, efectividad de fármacos	Efectividad de vacunas; transmisión por vía aérea	Patogénesis de la enfermedad	Patogénesis de la TB por transmisión aérea; inmunodeficiencia retroviral y TB
Rutas de infección	Aerosol Intravenosa Intratraqueal Intranasal Intraperitonea Subcutánea	Aerosol Intravenosa Subcutánea Intrapleural	Aerosol	Aerosol Intravenosa Intratraqueal Vía broncoscópico
Uso extendido para evaluar vacunas	Modelo de rutina	Modelo de rutina, ventana para BCG	No	Uso limitado a etapas finales de la fase preclínica
Requerimientos				
Reactivos inmunológicos disponibles	Amplia	Relativamente baja	Moderada	Amplia
Espacio en el laboratorio y costos	Relativamente pequeños	Moderados	Relativamente Grandes	Grandes
Bases genéticas disponibles	Sí	ND	ND	Sí

Diferentes mutantes disponibles	Sí	No	No	No
Cepas o especies disponibles bien caracterizadas	Resistentes: A/Sn, Balb/c, C57BL/10, C57BL/6 Susceptibles: 129/Sv, A/J, C3H (C3H/HeJ, C3H/SnJ, C3H/HeOuj, C3HeB/FeJ, C3H-SW-H2b), CBA, DBA/2, I/St	ND	ND	Macaco Rhesus Macaco Cynomolgus

Fuente: Dharmadhikari y Nardell, 2008; Gupta y Katoch, 2005; Kramnik y Beamer, 2016; Young, 2009.

Tabla 2. Comparación entre humanos y modelos primates

Parámetro	Humanos	Macacos Rhesus	Macacos Cynomolgus
Respuesta inducida tras la vacunación con BCG	Sí Eficacia variable	Sí Eficacia variable	Sí Eficacia variable
Patología			
Presencia tanto de manifestaciones pulmonares como extrapulmonares	Sí	Sí	Sí
Granulomas caseosos	Sí	Sí	Sí
Calcificación	Variable	Variable	Variable
Cápsula fibrosa	Variable	Variable	Variable
Cavidades pulmonares	Sí	Sí	Sí
Lesiones diseminadas	Variable	Variable	Variable
Manifestaciones clínicas			
Formas de la progresión de la enfermedad			
Aguda	10%	90%	60%
Latente	90%	10%	40%
Reactivación de las formas latentes	Sí	Sí	Sí
Presencia de síntomas de la infección activa/crónica			
Tos	Sí	Sí	Sí
Espujo con sangre	Sí	Sí	Sí
Incremento de la temperatura corporal	Sí	Sí	Sí
Pérdida de peso	Sí	Sí	Sí
Presencia de síntomas de la infección latente			
Ausencia de signos clínicos	Sí	Sí	Sí
TB activa por coinfección (VIH/SIDA)	Sí	Sí	Sí
Susceptibilidad dentro de una misma especie	Variable	Variable	Variable

Adaptación de: Peña & Ho, 2015

REFERENCIAS

- 1 Gerdts, V. *et al.* Large Animal Models for Vaccine Development and Testing. *Ilar J* **56**, 53-62, doi:10.1093/ilar/ilv009 (2015).
- 2 Orme, I. M. Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis* **85**, 13-17, doi:10.1016/j.tube.2004.08.001 (2005).
- 3 Zhan, L. J. *et al.* Prophylactic Use of Ganoderma lucidum Extract May Inhibit Mycobacterium tuberculosis Replication in a New Mouse Model of Spontaneous Latent Tuberculosis Infection. *Front Microbiol* **6**, doi:ARTN 1490 10.3389/fmicb.2015.01490 (2016).
- 4 Gerdts, V., Littel-van den Hurk, S. V., Griebel, P. J. & Babiuk, L. A. Use of animal models in the development of human vaccines. *Future Microbiology* **2**, 667-675, doi:10.2217/17460913.2.6.667 (2007).
- 5 McShane, H. & Williams, A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis (Edinb)* **94**, 105-110, doi:10.1016/j.tube.2013.11.003 (2014).
- 6 Gupta, U. D. & Katoch, V. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis* **85**, 277-293, doi:10.1016/j.tube.2005.08.008 (2005).
- 7 Kramnik, I. & Beamer, G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol* **38**, 221-237, doi:10.1007/s00281-015-0538-9 (2016).
- 8 Chackerian, A. A. & Behar, S. M. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 279-285 (2003).
- 9 Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Miallhe, A. C. & Turcotte, R. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun* **32**, 42-47 (1981).
- 10 Turner, J. *et al.* Immunological basis for reactivation of tuberculosis in mice. *Infect Immun* **69**, 3264-3270, doi:10.1128/IAI.69.5.3264-3270.2001 (2001).
- 11 Medina, E. & North, R. J. Genetically susceptible mice remain proportionally more susceptible to tuberculosis after vaccination. *Immunology* **96**, 16-21 (1999).
- 12 Calderon, V. E. *et al.* A humanized mouse model of tuberculosis. *PLoS One* **8**, e63331, doi:10.1371/journal.pone.0063331 (2013).
- 13 McMurray, D. N. Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med* **7**, 135-137 (2001).
- 14 Dharmadhikari, A. S. & Nardell, E. A. What animal models teach humans about tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 503-508, doi:10.1165/rcmb.2008-0154TR (2008).
- 15 Grover, A. *et al.* Assessment of vaccine testing at three laboratories using the guinea pig model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **92**, 105-111, doi:10.1016/j.tube.2011.09.003 (2012).
- 16 Orme, I. A. I. in *Tuberculosis and the tubercle bacillus* (ed W. R. Jacobs Jr, Jr.) Ch. Tuberculosis vaccine preclinical screening and development., 561-571 (ASM Press, 2005).
- 17 Flynn J.L., C. A. M., Bishai W. in *Tuberculosis and the tubercle bacillus* (ed Eisenach K.D. Cole S.T., McMurray D.N., Jacobs Jr, W.R.) Ch. Animal models of tuberculosis. , 547-560 (ASM Press, 2005).
- 18 Orme, I. M. Immunology and vaccinology of tuberculosis: can lessons from the mouse be applied to the cow? *Tuberculosis* **81**, 109-113, doi:10.1054/tube.2000.0257 (2001).
- 19 Gupta, U. D. & Katoch, V. M. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J Med Res* **129**, 11-18 (2009).
- 20 Young, D. Animal models of tuberculosis. *Eur J Immunol* **39**, 2011-2014, doi:10.1002/eji.200939542 (2009).
- 21 Capuano, S. V., 3rd *et al.* Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infect Immun* **71**, 5831-5844 (2003).
- 22 Pena, J. C. & Ho, W. Z. Monkey models of tuberculosis: lessons learned. *Infect Immun* **83**, 852-862, doi:10.1128/IAI.02850-14 (2015).
- 23 McMurray, D. N. A nonhuman primate model for preclinical testing of new tuberculosis vaccines. *Clin Infect Dis* **30 Suppl 3**, S210-212, doi:10.1086/313885 (2000).

- 24 Langermans, J. A. *et al.* Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* **23**, 2740-2750, doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.051 (2005).