



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO HETERÓLOGO DE LA CEPA
BCG DE *Mycobacterium bovis* EN LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL CONTRA EL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN
TERNERAS**

Nicole Isabel Maylenn Sánchez Mendoza

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. PATRICIO RETAMAL MERINO
Universidad de Chile

Financiamiento: Convenio SAG-FAVET

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO HETERÓLOGO DE LA CEPA
BCG DE *Mycobacterium bovis* EN LA RESPUESTA INMUNE
HUMORAL CONTRA EL VIRUS DIARREA VIRAL BOVINA EN
TERNERAS**

Nicole Isabel Maylenn Sánchez Mendoza

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

Nota Final:

Firma:

Profesor Guía: Patricio Retamal M.....

Profesor Corrector: José Pizarro L.....

Profesor Corrector: Claudio Zuñiga M.....

SANTIAGO, CHILE
2019

A mi hijo, Benjamín E. Sánchez.

INDICE DE CAPITULOS

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
<i>Tuberculosis Bovina</i>	2
<i>Situación nacional de la tuberculosis bovina</i>	2
<i>Tuberculosis humana</i>	3
<i>Vacuna</i>	3
<i>BCG e inmunidad heteróloga</i>	4
<i>Diarrea Viral Bovina</i>	5
<i>BCG en bovinos</i>	5
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
<i>Zona de estudio</i>	8
<i>Sujetos de estudios</i>	8
<i>Toma de muestra</i>	8
<i>Ensayo de Elisa</i>	9
<i>Titulación del Virus</i>	10
<i>Prueba de seroneutralización</i>	10
<i>Análisis de datos</i>	11
<i>Consideraciones de Bioseguridad y Ética</i>	11
RESULTADOS	12
DISCUSION	16
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA	20
ANEXOS	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Zonas epidemiológicas para el control de la tuberculosis en Chile. Elaboración propia con datos de: SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG) . 2015. Norma técnica 2015 Plan nacional de control y erradicación de Tuberculosis Bovina. Santiago, Chile. SAG, División de protección pecuaria. 21 p.	28
Tabla 2: Distribución de los animales a muestrear según edad y estado de vacunación.....	8
Tabla 3: Distribución de los animales muestreados según edad, estado de vacunación y predio.	12
Tabla 4: Distribución de los animales muestreados según estado de infección por predio.....	13
Tabla 5: Distribución de los animales muestreados según estado de infección y edad por predio.....	13
Tabla 6: Distribución de los animales, según edad, condición de vacunación, Predio, Resultado, Título de Anticuerpo y Densidad Óptica	28
Tabla 7: Distribución de frecuencia de títulos de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina en bovinos a los 6 y 12 meses en los grupos vacunados (BCG) y placebo.	14
Tabla 8: Promedio y rango del título de anticuerpos seroneutralizantes según edad y condición de vacunación, indicando cantidad de individuos por grupo.	15

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad que representa pérdidas de aproximadamente 300 millones de dólares al año, debido a que impacta de manera negativa la eficiencia de los planteles productivos de leche y de carne. En Chile, el SAG el año 2011 inicia el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. Debido a que la distribución de la enfermedad es heterogénea, dividió el país en tres zonas epidemiológicas: zona de erradicación norte, zona de control y zona de erradicación sur. En la zona de control existe una alta prevalencia de esta enfermedad, y para controlarla se planteó el uso de vacunas como la BCG, que actualmente es ocupada en humanos. Estudios anteriores plantean que BCG puede proteger a los bebés inmunizados contra otros patógenos, distintos a *M. bovis*, dando como resultado una protección heteróloga o no específica, por lo tanto el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la vacunación con la cepa BCG *M. bovis* en la respuesta inmune humoral generada contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos, debido a que el vDVB es una patología que tiene altas prevalencias en el país, y causa graves daños económicos. Se utilizó el kit comercial ELISA IDEXX para determinar anticuerpos totales contra el VDVB, y la prueba de Seroneutralización para determinar el título de anticuerpos neutralizantes contra el VDVB en sueros de bovinos. Se muestrearon animales a 6 y 12 meses post inoculación, además de un grupo placebo. La presencia de anticuerpos fue detectada en 68 de 235 animales de 6 meses, y 19 de 231 animales del grupo de 12 meses. Si bien la cantidad de animales reaccionantes fue baja, el virus está presente en todos los predios muestreados. Respecto a la diferencia de los títulos de anticuerpos entre los grupos placebos y vacunados no hubo diferencias significativas, a los 6 meses y 12 meses post-inoculación. Por lo tanto, la vacuna BCG bajo las condiciones experimentales de este trabajo no causa efecto en la respuesta inmune humoral generada contra el vDVB en bovinos.

Palabras claves: BCG, Diarrea Viral Bovina, protección heteróloga.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a disease that costs approximately 300 million dollars per year, because it negatively impacts the efficiency of the milk and meat production. In Chile, SAG in 2011 initiated the National Plan for the Control and Eradication of Bovine Tuberculosis. Because the distribution of the disease is heterogeneous, the country was divided into three epidemiological zones: northern eradication zone, control zone and southern eradication zone. In the control zone, there is a high prevalence of this disease, requiring the use of vaccines such as BCG for control, which currently is being occupied in humans. Previous studies suggest that BCG can protect infants against pathogens other than *M. bovis*, resulting in heterologous or nonspecific protection. Therefore, the objective of this study was to determine the effect of vaccination with *M. bovis* BCG strain in the humoral immune response generated against Bovine Viral Diarrhea Virus in dairy cattle. This pathogen has high prevalences in the country, and causes serious economic damages. To determine total antibodies and the neutralizing antibody titer against BVDV, the Elisa IDEXX commercial kit and the Seroneutralization test were used, respectively. Groups of animals at 6 and 12 months after inoculation were analyzed, in addition to a placebo group. At 6 months the presence of antibodies was detected in 68 of 235 animals, and at 12 months in 19 of 231 animals. Although the number of reactive animals was small, the virus is still present in all the sampled farms. Regarding the difference in antibody titers between the placebo and vaccinated groups, there were no significant differences between 6 and 12 months post-inoculation. Therefore, the BCG vaccine under the experimental conditions of this work has no effect on the humoral immune response generated against vDVB in bovines.

Key words: BCG, Viral Bovine Diarrhea, heterologous protection.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB), es una enfermedad bacteriana, infectocontagiosa, crónica, de carácter zoonótica, producida por *Mycobacterium bovis*, por lo cual, es una patología que causa grandes problemas económicos, debido a que impacta de manera negativa la eficiencia de los planteles productivos de leche y de carne.

Esta patología es de distribución mundial y es de considerable importancia en la medicina veterinaria. Es descrita principalmente en el ganado bovino, pero también puede afectar a otras especies de ganado doméstico y animales silvestres.

En humanos es una enfermedad que ha causado efectos devastadores en el mundo. En el año 2016, 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,7 millones murieron por esta enfermedad, produciéndose principalmente en países con bajos índices económicos. Y se estima que un cuarto de la población mundial tiene tuberculosis latente.

En Chile, el plan nacional de inmunizaciones utiliza la cepa BCG de *M. bovis*, vacuna que es aplicada a los lactantes el primer día de vida, y es utilizada actualmente para generar protección en los primeros años de vida contra la tuberculosis humana. Sin embargo, existe una respuesta inmune heteróloga o no específica frente a la inoculación de la BCG, disminuyendo la prevalencia de otras patologías, además de un descenso en la mortalidad infantil por otros agentes infecciosos.

Actualmente, se está desarrollando un proyecto en FAVET para evaluar la efectividad de la BCG contra la tuberculosis bovina, y también se ha evidenciado una disminución de la mortalidad de terneras producto del uso de esta vacuna.

Por este motivo, en esta Memoria de Título se evaluará el efecto inespecífico de la cepa BCG en la respuesta inmune de bovinos, evaluando como modelo de infección el Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB), debido a que esta es una patología que causa grandes pérdidas en la industria ganadera del país, y además tiene altos índices de prevalencia. El estudio consistirá en determinar el efecto de BCG sobre la generación de respuesta inmune humoral contra VDVB en los bovinos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tuberculosis Bovina

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa, crónica, de distribución mundial causada por *Mycobacterium bovis*, que es miembro del complejo *M. tuberculosis*. Otras micobacterias de este complejo, como *M. tuberculosis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* y *M. orygis*, pueden inducir lesiones granulomatosas similares en el ganado, pero la diseminación de estas infecciones es de menor prevalencia (Vordermeier *et al.*, 2016). Estos agentes son bacilos ácido-alcohol resistentes, gram positivos, inmóviles, aerobios estrictos y de lento crecimiento en medios de cultivo; además, pueden sobrevivir por varios meses en el ambiente (Soo *et al.*, 2009).

La principal vía de transmisión es aerógena (85%), que sucede al inhalar bacilos tuberculosos suspendidos en el aire, requiriendo un bajo número de organismos infectantes (SAG, s.f). También está la ingestión de alimentos y leche contaminada, que ocurre cuando esta no es pasteurizada. Otras vías de transmisión son la congénita, genital y cutánea, pero son menos comunes que las anteriores (Quezada y Retamal, 2010)

La infección permanece localizada durante meses o años, pero puede generalizarse (Vordermeier *et al.*, 2016), pudiendo esta misma ser subclínica durante mucho tiempo, hasta que factores estresantes desencadenen la signología clínica de la enfermedad, que por lo general es inespecífica, incluyendo debilidad, anorexia, disnea, extenuación, inflamación de los ganglios linfáticos, tos y diarrea intermitente. Esta patología causa grandes problemas económicos en la industria pecuaria, debido a que provoca muerte de animales, disminución de la producción de leche y de carne, y la depreciación de estos productos en planteles infectados por la desvalorización de la leche y el decomiso de la carne. Además, esta patología contribuye a un gran problema en la salud pública debido a que el agente causal se transmite al ser humano, los animales domésticos y a la fauna silvestre (Quezada y Retamal, 2010; SAG, s.f).

Situación nacional de la tuberculosis bovina

En Chile, la tuberculosis bovina es de carácter endémica (Paredes, 2008). El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la clasifica como “enfermedad presente”, con presentación

periódica dentro del año y de denuncia obligatoria (SAG, 2015a). El SAG el año 2011, inicia el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina en Chile, y debido a que la distribución es heterogénea dividió el país en tres zonas epidemiológicas (tabla 1): zona de erradicación norte, zona de control y zona de erradicación sur. Cada zona cuenta con sus respectivas medidas sanitarias (SAG, 2015b).

Tuberculosis humana

La tuberculosis en humanos es causada por lo general por *M. tuberculosis*, pero también puede ser causada por *M. bovis*, debido a que es zoonótica (Torgerson y Torgerson, 2010). Esta enfermedad ha causado efectos devastadores en el mundo siendo llamada la “peste blanca” y se cree que apareció en Europa y en el Cercano Oriente, en el período Neolítico, entre 6.000-8.000 años A.C. (Túñez *et al.*, 2002). Esta enfermedad causa tos productiva, dolores torácicos, debilidad, pérdida de peso, fiebre y sudores nocturnos. Respecto a la epidemiología, en el año 2016 10,4 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,7 millones murieron por esta enfermedad. Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos. Se calcula que una cuarta parte de la población mundial tiene tuberculosis latente (OMS, 2018a).

Vacuna

El médico Albert Calmette y el veterinario Camille Guérin entre los años 1908 y 1921 desarrollaron una vacuna viva atenuada derivada de *M. bovis*, producida por subcultivo repetido de una cepa extraída de un bovino utilizando los principios de Pasteur para la construcción de vacunas, a la que llamaron vacuna Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Martin *et al.*, 2017). Desde el año 1974 esta vacuna está incluida en el programa ampliado de inmunización de la OMS. Hoy la OMS recomienda esta vacunación en todos los países con altas tasas de incidencia de tuberculosis (OMS, 2018b). Actualmente en Chile, la BCG es parte del Programa Nacional de Inmunizaciones del Ministerio de Salud y se aplica en lactantes de 1 día de edad, de forma intradérmica en la cara lateral del brazo (MINSAL, 2015).

BCG e inmunidad heteróloga

Se han realizado diversos estudios que han evidenciado que la BCG además de proteger contra la tuberculosis humana potencia una respuesta inmune heteróloga o inespecífica frente a otras patologías, especialmente en las regiones afectadas con una alta carga de enfermedades infecciosas. Respecto a la mortalidad infantil, diversos estudios han señalado que la tasa de muerte en los vacunados es sustancialmente menor que los que no fueron vacunados con BCG, disminuyendo el riesgo de mortalidad por todas las causas hasta un 30–50% en niños hasta los 2 años en África Occidental y hasta los 5 años en Uganda. Estudios en Malawi, Guinea-Bissau e India, también encontraron tendencia en la reducción de la mortalidad a los lactantes vacunados con BCG (Butkeviciute *et al.*, 2018). Kleinnijenhuis *et al.*, (2012) señalan que la BCG induce una inmunidad entrenada y protección no específica contra infecciones a través de la reprogramación epigenética de células inmunes innatas. Los monocitos de adultos vacunados con BCG tuvieron una mayor expresión de marcadores de activación de la superficie y produjeron más IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α en respuesta a *Staphylococcus aureus* o *C. albicans* hasta 3 meses después de la vacunación en comparación con los monocitos aislados antes de la vacunación de los mismos adultos, y en el caso de las células NK aumentó la producción de IL-1 β e IL-6 (Butkeviciute *et al.*, 2018). Se ha demostrado que BCG estimula la respuesta de anticuerpos y aumenta la producción de células T cooperadoras (Th1 y Th2) a antígenos vacunales no relacionados, incluidas la vacuna contra la Hepatitis B, el poliovirus oral y el tétano (Roth *et al.*, 2006), y también se determinó que BCG aumenta los títulos de anticuerpos de la vacuna contra la influenza (Butkeviciute *et al.*, 2018). Roth *et al.*, (2006) indican que hay varios estudios que demuestran que la BCG tiene un efecto protector frente a enfermedades como septicemia, virus sincicial, infecciones del tracto respiratorio bajo y dermatitis atópica. Esta respuesta inmune inespecífica producida por la BCG podría replicarse en los bovinos, por ejemplo, tras la infección del Virus Diarrea Viral Bovina.

Diarrea Viral Bovina

La Diarrea Viral Bovina (DVB), una de las enfermedades más comunes en el ganado bovino en Chile, es provocada por el Virus Diarrea Viral Bovina (VDVB), un virus perteneciente al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este virus es causante de una gran diversidad de presentaciones clínicas y de distinta intensidad, pudiendo ser de carácter digestivo, respiratorio y reproductivo (Celedón *et al.*, 1997a). Esta enfermedad está asociada a grandes pérdidas económicas debido a que disminuye la producción de leche, la ganancia de peso, la fertilidad, y además produce abortos. Respecto a la inmunidad humoral esta es detectada 2-3 semanas posterior a la infección con el vDVB, pero también puede estimularse por la exposición del antígeno del vDVB a través de vacunas, o por la adquisición de inmunidad pasiva por la ingestión de anticuerpos presentes en el calostro (Goyal y Ridpath, 2006). Se ha descrito que las tres glicoproteínas de la envoltura del vDVB son las que producen los principales anticuerpos seroneutralizantes: gp 53/E2, gp 48/E0 y gp 25/E1, siendo la proteína E2 inmunodominante (Bolin y Ridpath, 1990). La respuesta inmune celular depende del biotipo del vDVB, en el caso del biotipo no citopático la respuesta inmune es principalmente del tipo Th2, con una baja producción de inmunidad mediada por células. En cambio, el biotipo citopático produce una mayor respuesta de Th1, junto con la regulación positiva del receptor de IL-2 (IL-2R) en respuesta al aumento de los niveles de IL-2 (Goyal y Ridpath, 2006).

En Chile esta enfermedad se describe desde el año 1985, a partir de un brote de la enfermedad de las mucosas (Reinhardt, 1992). Se reporta una alta prevalencia y diseminación del virus en el país, con un 69,2% de prevalencia en la IX Región de La Araucanía y X Región de Los Lagos, un 59,7% en bovinos de leche de la Región Metropolitana, y un 86% en bovinos de carne de la misma región, junto con una prevalencia predial del 100% (Celedón *et al.*, 1997b).

BCG en bovinos

El año 1911, cuando fue desarrollada la vacuna BCG, al momento de ser probada en bovinos, se observó que lograba inducir protección contra *M. bovis*. En estos últimos años se ha logrado demostrar su eficacia utilizando modelos de exposición de bajo riesgo (10^4 – 10^6 UFC) administrándolos de manera subcutánea. Para poder demostrar la eficacia de esta

vacuna, se desarrolló una herramienta diagnóstica capaz de diferenciar entre la respuesta inmune a la cepa BCG y la de campo, conocida como DIVA (*Differentiate Infected from Vaccinated Animals*). Esta prueba incorpora la estimulación de la sangre, previamente extraída de bovinos, con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, propios de cepas de campo y ausentes en la cepa BCG (Vordermeier *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la aplicación de la BCG causa un efecto protector contra la infección de *M. bovis* en el ganado, variando desde un 25 a un 61% de protección en distintos estudios de campo (Ameni *et al.*, 2010).

En esta memoria de título se medirá el efecto heterólogo de la vacuna BCG sobre la respuesta inmune humoral al Virus Diarrea Viral Bovina, generada por los bovinos inoculados con la vacuna, a través de la medición de los títulos de anticuerpos neutralizantes, usando la prueba de seroneutralización.

HIPÓTESIS

Bovinos vacunados con la cepa BCG de *M. bovis* generan títulos de anticuerpos neutralizantes contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina significativamente mayores que bovinos no vacunados con la cepa BCG.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la vacunación con la cepa BCG *M. bovis* en la respuesta inmune humoral generada contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar títulos séricos de anticuerpos neutralizantes contra el Virus Diarrea Viral Bovina en terneras no vacunadas y vacunadas con la cepa BCG de *M. bovis*, a los 6 meses y 1 año post vacunación.
2. Comparar los títulos séricos de anticuerpos neutralizantes contra el Virus Diarrea Viral Bovina entre las terneras no vacunadas y vacunadas con la cepa BCG de *M. bovis*, a los 6 meses y 1 año post vacunación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

Este estudio se llevó a cabo en 5 predios lecheros ubicados en la Región Metropolitana, en las comunas de Padre Hurtado y Melipilla. Estos predios tienen niveles de prevalencia de tuberculosis bovina mayores al 15% en su ganado, y 100% de prevalencia predial del Virus Diarrea Viral Bovina. Respecto a su desarrollo tecnológico son predios de características intensivas, y tienen similares características de manejos sanitarios. Ninguno de estos predios utiliza alguna vacuna contra el Virus Diarrea Viral Bovina.

Sujetos de estudios

Los sujetos de estudio fueron todos los bovinos de 6 meses y 1 año que fueron inoculados con BCG cuando terneras, entre los meses de octubre del 2017 y marzo del 2018. También se consideró animales de las mismas edades pero que fueron inoculados con una solución placebo de NaCl 0,9%. Considerando la disponibilidad de animales en los predios y la alta prevalencia esperada de DVB (80%), el número total de individuos muestreados fue de 466, según la distribución de la Tabla 2.

Tabla 2.

Distribución de los animales a muestrear según edad y estado de vacunación

Animales 6 meses post-inoculación		Animales 1 año post-inoculación	
Cepa BCG <i>M. bovis</i>	Placebo	Cepa BCG <i>M. bovis</i>	Placebo
114	121	127	104

Toma de muestra

Para la toma de muestra se utilizaron tubos colectores de sangre sin anti-coagulante. La sangre se colectó de la vena coccígea, y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (21°C) por 24 hrs, para la obtención del suero. Posteriormente, los sueros se almacenaron y rotularon en tubos de 1,5 mL, y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Previo a su análisis, los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos para así eliminar inhibidores inespecíficos que pudiesen alterar los resultados.

Ensayo de Elisa

A todas las muestras del estudio se les realizó un ensayo de ELISA indirecto, con el kit comercial IDEXX BVDV Total Ab®. Esta prueba consiste en el uso de una placa de microtitulación cubierta con antígenos del vDVB. Los anticuerpos frente al vDVB presentes en las muestras de suero, previamente diluidas, se unen al antígeno de la placa. Se realiza una incubación durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lava, para eliminar el material no ligado. Se añade la solución conjugado que consiste en la enzima peroxidasa de rábano, junto con un segundo anticuerpo, que detectan el complejo Antígeno-Anticuerpo formado previamente. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, se realiza un segundo lavado para eliminar el conjugado que no se ligó y se añade una solución de sustrato/cromógeno generando una reacción colorimétrica. Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara oscura, y posteriormente se adiciona una solución para detener la reacción. Se utilizaron controles negativos y positivos incluidos en el Kit.

La absorbancia se mide con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Para la validación de las muestras se obtuvo el promedio de los controles negativos y positivos que debían cumplir los siguientes parámetros:

Promedio del control negativo igual o menor a 0,250 y la resta del promedio del control positivo y negativo mayor o igual a 0,150.

La presencia o ausencia de anticuerpos del vDVB en la muestra se determinó mediante el cociente M/P de cada muestra:

$$M/P = \frac{\text{Muestra A}(450) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$$

El valor entregado se interpretará mediante estos parámetros: $M/P < 0.2$ es negativo, Si M/P se encuentra entre 0.2 y 0.3 es dudoso, y si $M/P > 0.3$ es positivo.

Titulación del Virus

Como antígeno para la posterior prueba de Seroneutralización se utilizó la cepa viral citopatógena Nacional Animal Disease Laboratory (NADL) del vDVB. Para cuantificar su infecciosidad se diluyó el virus en base a 10 desde 1:10 hasta 1:10.000.000 en un medio de cultivo. 50 uL de cada dilución se colocó en una microplaca de 96 pocillos, posteriormente se añadió 50 uL de medio de cultivo a cada mezcla y 50 uL de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (15.000 células) en medio MEM con 30% de suero equino.

La microplaca se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 3-4 días, observándolas diariamente en búsqueda de efecto citopático producido por el virus NADL. El título del virus correspondió al valor recíproco de la dilución que destruye al 50% de la población celular, que se calculó bajo el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Prueba de seroneutralización

Esta prueba permite detectar y cuantificar los anticuerpos séricos que son capaces de neutralizar la infección de un virus. Para ello en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano, cada suero se diluyó en base 2, desde 1:4 a 1:256 en volúmenes de 50 uL. Se incluyó un pocillo con el control positivo (suero con anticuerpos para VDVB), y otro con el control negativo (suero sin anticuerpos para VDVB). Paralelamente se controló la viabilidad celular, la potencia del virus y la citotoxicidad de los sueros.

Las diluciones séricas se incubaron con 100 DICT₅₀ de la cepa citopatógena NADL del VDVB a 37° durante 60 minutos. Posteriormente se agregaron 50 uL de células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (15.000 células) en medio de cultivo MEM, con suero equino 30%.

Las microplacas se incubaron a 37°C, con 95% de humedad y una concentración gaseosa de 5% de CO₂. Las células se observaron diariamente durante 3-4 días, para detectar el efecto citopático de las células producido por el virus NADL. El título neutralizante del suero es el valor recíproco de la dilución del suero que protege al 50% de la población celular de la infección viral, que se calculó bajo el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Análisis de datos

Los títulos de anticuerpos seroneutralizantes fueron comparados entre los animales vacunados y no vacunados. Se obtuvo un promedio de los resultados y estos se analizaron mediante la prueba de T de Student. La diferencia de los títulos de anticuerpos es significativa con un $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa InfoStat®.

Consideraciones de Bioseguridad y Ética

En este estudio se consideró bioseguridad a nivel de predio y a nivel de laboratorio. En el caso de los predios se tuvo cuidado con la sujeción de los animales, donde se contó con la colaboración de personal técnico capacitado. Además, se utilizaron implementos de seguridad necesarios para el trabajo en terreno, como overol y botas. En el caso del laboratorio, se trabajó con patógenos correspondiente a un nivel de bioseguridad 2, debido a que se manipularon muestras de sangre, por lo tanto, las medidas que se tomaron son el uso de ropa de protección como guantes y delantal, como también el uso de cabinas de bioseguridad.

Antes del muestreo de los animales se contó con un consentimiento firmado por parte del dueño de estos.

RESULTADOS

Muestras Obtenidas

Se obtuvo un total de 466 muestras de suero bovino, el detalle por sector se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.

Distribución de los animales muestreados según edad, estado de vacunación y predio.

Predio	6 meses		12 meses		Total N (%)
	Placebo	BCG	Placebo	BCG	
ME1	68	66	52	59	245 (52,6)
ME2	11	6	9	11	37 (7,9)
ME3	14	16	13	19	62 (13,3)
ME5	22	18	24	27	91 (19,5)
PH1	6	8	6	11	31 (6,7)
Total	121	114	104	127	466 (100)

Frecuencia de seropositividad al VDVB

De los 466 animales muestreados, 87 presentaron anticuerpos al VDVB a través de la prueba de ELISA, correspondiendo al 19% de las muestras.

Edad

Respecto a la edad de los animales, fueron muestreados 235 animales de 6 meses, de los cuales 68 presentan anticuerpos contra VDVB (28,9%): 34 del grupo placebo (14,45%) y 34 del grupo vacunado con BCG (14,45%). A los 12 meses fueron muestreados 231 animales, de los cuales 19 presentan anticuerpos contra VDVB (8,2%): 8 (3,46%) del grupo placebo y 11 (4,76%) del grupo vacunado con BCG. Se determinó que la edad de los animales se asocia con su estado de infección ($p=0,0001$).

Predio

Tabla 4.

Distribución de los animales muestreados según estado de infección por predio

Predio	Positivos (%)	Negativos (%)	Total N
ME1	58(23,6)	187(76,4)	245
ME2	6(12)	31(88)	37
ME3	14(22,5)	48(77,5)	62
ME5	6(6,5)	85(93,5)	91
PH1	3(9,6)	28(90,4)	31
Total	87(18,6)	379(81,3)	466

En la tabla 4 se aprecia que hubo diferencias en la infección con VDVB según predio de muestreo ($p=0.0043$).

Tabla 5.

Distribución de los animales muestreados según estado de infección y edad por predio

Predio	6 meses		12 meses		Total N (%)
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
ME1	49	85	9	102	245 (52,6)
ME2	6	11	0	20	37 (7,9)
ME3	8	22	6	26	62 (13,3)
ME5	4	36	2	49	91 (19,5)
PH1	1	13	2	15	31 (6,7)
Total	68	167	19	212	466 (100)

Al analizar los resultados por predios según edad de los animales, especificados en la tabla 5 se visualiza que a los 6 meses hay asociación entre estas variables ($p=0.0061$), a diferencia de los 12 meses ($p=0.0907$).

Objetivo 1:

Seroneutralización

A todos los animales que dieron positivos a la prueba de ELISA, se les realizó la prueba de Seroneutralización, resultando 6 negativos y 81 positivos a la prueba. Según el índice de

correlación de Pearson, entre la prueba de Seroneutralización y la prueba de Elisa, existe una correlación positiva ($r=0.69$). En la tabla 6 se detallan los resultados por predio.

De los animales positivos los títulos de anticuerpos neutralizantes se encuentran entre <4 y 362.

Tabla 7.

Distribución de frecuencia de títulos de anticuerpos seroneutralizantes para el Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos a los 6 y 12 meses en los grupos vacunados (BCG) y placebo.

Título de Anticuerpo	Número de animales			
	6 meses		12 meses	
	Placebo	BCG	Placebo	BCG
<4	4	0	1	0
5	2	4	0	0
6	3	0	0	0
7	1	8	0	3
9	3	0	0	0
11	3	1	1	0
13	1	0	0	1
19	1	4	0	2
23	1	0	0	0
27	1	2	1	1
38	1	1	0	1
45	2	5	0	0
53	1	3	1	0
76	0	2	2	0
91	1	0	1	0
107	1	1	0	0
151	0	0	0	1
181	2	0	0	0
214	1	0	1	0
302	0	1	0	2

Objetivo 2:

Al determinar la diferencia en los títulos de anticuerpos seroneutralizantes de los animales a los 6 y 12 meses post-inoculación entre los grupos vacunado y placebo, se determinó que esta diferencia no era significativa (Tabla 8).

Tabla 8.

Promedio y rango del título de anticuerpos seroneutralizantes según edad y condición de vacunación, indicando cantidad de individuos por grupo.

	6 meses		12 meses	
	BCG	Placebo	BCG	Placebo
Promedio	45,52	39,17	92	68.65
Mediana	19	9	19	64.5
(Rango)	(5-302)	(1-214)	(7-362)	(1-214)
[n]	[33]	[29]	[11]	[8]

$p > 0,05$

El mismo resultado se obtuvo al comparar las densidades ópticas resultantes de la prueba de Elisa.

Análisis de mediana

Al analizar la mediana a través de la prueba de Wilcoxon tampoco se encontraron diferencias entre los grupos de 6 meses ($p=0.08$) y 12 meses ($p=0.6119$). Sin embargo, el análisis por predio detectó diferencias en el caso de ME1 a los 6 meses post inoculación ($p=0,0198$).

DISCUSION

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de la vacunación con la cepa BCG *M. bovis* en la respuesta inmune humoral generada contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos. En primer lugar, se determinó mediante ensayo Elisa Indirecto que el 19% de los animales muestreados presentaron anticuerpos contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina y que el 100% de los predios tienen el virus. La tasa de seropositividad al VDVB de manera predial coincide con estudios anteriores de prevalencia realizados en la región, debido a que anteriormente se obtuvo el mismo resultado (Celedón *et al.*, 1997b). Respecto a la frecuencia de seropositividad individual, varió desde un 6,5% hasta un 23,6%, estos valores son menores en comparación a estudios anteriores (Celedón *et al.*, 1997b). Cabe destacar que en el estudio citado anteriormente solo se muestrearon vaquillas y vacas, por lo tanto, este podría ser un factor que influenciaría en los resultados, debido a que en nuestro estudio solo analizamos animales de hasta 12 meses de edad. Además, este trabajo solo fue realizado en 5 predios en dos comunas de la región, y el estudio realizado anteriormente fue concretado en toda la región con un total de 24 predios. En los predios de este estudio además no se están dando las condiciones óptimas para que el virus se transmita eficientemente entre los animales, por ejemplo, la crianza extensiva, el compartir alimentos y el contacto con fluidos nasales. Todos estos factores se están evitando ya que son predios intensivos, por ende, tienen mayor desarrollo tecnológico demostrado mediante la división de animales por grupo de edad, el traslado de estos mismos de manera conjunta, y además del poco contacto con las madres al nacer, factores que facilitan la propagación del virus debido a la transmisión de secreciones infectadas. Cabe destacar que faltan estudios actualizados de prevalencia dentro de la Región Metropolitana, para así realizar una comparación adecuada.

Se determinó que entre los predios hay una diferencia de tasas de reacción entre un 6,5 hasta un 23,6%, dando una diferencia significativa entre ellos ($p=0.0043$). En el predio ME1 donde existía un mayor número de animales, coincidió con la mayor tasa de reacción, debido a que puede existir en este predio una mayor tasa de infección natural, pero en los siguientes predios no se correlaciona el número de animales junto con la tasa de reacción al vDVB, se podría explicar debido a que a pesar de tener mayor número de animales ocupan estrategias para evitar la propagación del virus como las discutidas en el párrafo anterior. Además, se

determinó que hay mayores tasas de reacción al vDVB en animales de 6 meses que animales de 12 meses ($p=0.0001$), lo que se explicaría debido a que las madres de los terneros traspasan inmunidad pasiva a través del calostro, y hay estudios que determinan que estos anticuerpos podrían durar hasta 7 meses en el ternero (Ridpath *et al.*, 2003).

Se determinó que no hay diferencias significativas en los títulos de anticuerpos seroneutralizantes y en los anticuerpos totales medidos por el ensayo de ELISA tras ocupar la vacuna BCG en animales de 6 meses y 12 meses. Esto puede ser debido a que el resultado de los animales de los 6 meses se pudo ver interferido por la inmunidad pasiva entregada por la madre, no logrando mostrar un número real del título de anticuerpos entregado por la vacuna. Respecto de los resultados a los 12 meses post vacunación, se especula que no se están dando las condiciones predilectas para una infección natural del vDVB, por ende, hay menos animales contagiados con el virus ocasionando un número poco representativo de animales a evaluar. Esto se explicaría porque a los 12 meses ya disminuyen los anticuerpos producidos por la reacción inmunológica originada por la vacuna, debido a que estudios indican que a los 12 meses ya disminuye la efectividad de la vacuna BCG frente a la tuberculosis (Vordermeier *et al.*, 2016). Por ende, un estudio realizado entre los 7 y 11 meses disminuiría al mínimo los factores antes mencionados.

Los estudios que han demostrado que aumentan los títulos de anticuerpos frente a otros agentes infecciosos tras ocupar la vacuna BCG, vacunan contra esos patógenos en un período de tiempo cercano a la vacunación con BCG, por ejemplo, en el caso de la influenza, hepatitis B, polio y antitetánica (Butkeviciut *et al.*, 2018). En cambio, este es el primer estudio que compara la diferencia de títulos de anticuerpos en animales que no fueron vacunados frente al otro patógeno, sino solo evidenciándolo en el caso de una infección natural al vDVB. Un nuevo diseño experimental que implique el uso de predios con altas tasas de prevalencia al vDVB implicaría una mayor tasa de infección natural a este mismo, y por ende un número más representativo para evaluar la diferencia de títulos de anticuerpos al vDVB tras ocupar la vacuna BCG, al verse terminada la inmunidad pasiva. Como también se puede añadir el uso de vacunas contra el vDVB en grupos placebo y control, previamente a la inoculación de la vacuna BCG, para cumplir el mismo objetivo de tener más animales sensibilizados al

vDVB, y por ende poder evaluar la eficacia de la vacuna BCG al comparar los títulos de anticuerpos al vDVB en animales control y placebo.

Se evaluó la correlación entre los resultados del ELISA y los títulos alcanzados por la prueba de Seroneutralización, y se determinó un $r=0.69$ ($p < 0.05$), estableciendo una correlación fuerte y positiva. Este resultado coincide con el estudio de Reinhardt *et al.*, (2001), donde establece un $r=0.61$ para todas las muestras y $r=0.69$ para las muestras positivas. Aun así, la prueba de Seroneutralización arroja más negativos que la de prueba de Elisa, debido a que esta última es una prueba con mucho más sensibilidad para el diagnóstico de anticuerpos anti-DVB, debido a que la prueba de Seroneutralización usada en esta memoria de título solo determina anticuerpos neutralizantes usando un virus del genotipo 1 del vDVB.

Al realizar el análisis de la mediana de los títulos de anticuerpos entre el grupo de 6 meses que ocupó la vacuna BCG frente al grupo placebo, como también al grupo de 12 meses que ocupó BCG frente al grupo placebo, no se observaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos seroneutralizantes. Exceptuando el caso del predio ME1 a los 6 meses, que además es el predio con el mayor número de animales muestreados. Con esto podríamos especular que los animales de 6 meses post inoculación de BCG que fueron contagiados en este predio generaron más títulos de anticuerpos que animales con solo la solución placebo, explicándose debido a que en este predio existe la mayor tasa de reacción al vDVB en el estudio, por ende una mayor tasa de infección natural del virus.

Los resultados obtenidos muestran que en todos los predios hay animales reaccionantes a diarrea viral bovina, pero al estudiarlos de manera intra predial estos no superan el 23,6%. Además, debido a las condiciones experimentales de este trabajo, donde el grupo de animales a los 6 meses su título de anticuerpos entregado por la vacuna BCG fue enmascarado por la inmunidad pasiva, y en el grupo de 12 meses había una baja tasa de infección natural al vDVB, se determinó que no existe efecto de la vacunación con la cepa BCG *M. bovis* en la respuesta inmune humoral generada contra el Virus de la Diarrea Viral Bovina en bovinos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis de este trabajo.

CONCLUSIONES

- En este estudio, en todos los predios analizados de la comuna de Melipilla y Padre Hurtado de la Región Metropolitana se detectaron bovinos reaccionantes a vDVB.
- En los bovinos muestreados de 6 y 12 meses de edad se detectó una tasa de reacción al vDVB desde un 6,5% hasta un 23,6%.
- No se determinaron diferencias significativas en el título de anticuerpos seroneutralizantes entre los animales vacunados con la BCG y animales placebos.
- No se determinaron diferencias significativas en los anticuerpos totales medidos por Elisa en los animales vacunados con la BCG y animales placebo.
- No existen diferencias significativas en el título de anticuerpos seroneutralizantes entre los animales vacunados con la BCG y animales placebos, por ende, se rechaza la hipótesis del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- **AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ASEFFA, A.; DOUGLAS, B.; YOUNG, R.; HEWINSON, G.** 2010. Field evaluation of the efficacy of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clin. Vaccine. Immunol.* 17(10): 1533–1538
- **BOLIN, S.; RIDPATH, J.** 1990. Range of neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am. J. Vet. Res* 51:703–707.
- **BUTKEVICIUTE, E.; JONES, C.; SMITH, S.** 2018. Heterologous effects of infant BCG vaccination: potential mechanisms of immunity. *Future Microbiol*, 13(10), 1193–1208.
- **CELEDÓN, M.; ROCO, L.; QUINTEROS, G.; SANTIBAÑEZ, M.; BERRIOS, P.** 1997a. Puesta en evidencia del virus diarrhoea viral bovina en bovinos clínicamente afectados. *Arch. Med. Vet.*, 29(2), 189-195.
- **CELEDÓN, M.; PALACIOS, L.; PIZARRO, J.; IBARRA, L.** 1997b. Prevalencia de anticuerpos seroneutralizantes para el virus de la diarrhoea viral bovina en ganado de carne de la Región Metropolitana de Chile. *Av. Cs. Vet.* 12: 98-100.
- **GOYAL, S; RIDPATH, J.** 2006. Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control. *Can. Vet. J.*, 47(9), 893.
- **KLEINNIJENHUIS, J.; QUINTIN, J.; PREIJERS, F.; JOOSTEN, L.; IFRIM, D.; SAEED, S.; JACOBS, C.; VAN LOENHOUT, J.; DE JONG, D.; STUNNENBERG, H.; XAVIER, R.; VAN DER MEER, J.; VAN CREVEL, R.; NETEA, M.** 2012. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109(43):17537–42.
- **MARTIN, C.; AGUILO, N.; GONZALO-ASENSIO, J.** 2017. Vacunación frente a tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2017.

- **MINISTERIO DE SALUD.** 2015. Programa nacional de inmizaciones. [en línea] < <http://www.minsal.cl/programa-nacional-de-inmunizaciones/> > [consulta: 09-04-2018]

- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2018a. Tuberculosis [en línea] <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> [consulta: 20-04-2018]

- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2018b. BCG vaccines: WHO position paper. *Wkly. Epidemiol. Rec.* (8): 73-96.

- **PAREDES, L.** 2008. Proyecto Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. Servicio Agrícola y Ganadero, pp. 5–114.

- **QUEZADA, N.; RETAMAL, P.** 2010. La tuberculosis bovina: El desafío sanitario de Chile. *TecnoVet.* 16(1): 26-29.

- **REED, L.; MUENCH, H.** 1938. A simple method of estimating fifty-percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

- **REINHARDT, G.** 1992. Diarrea viral bovina/enfermedad mucosa, una enfermedad viral compleja. *Monografías Med. Vet.* (14): 49-55.

- **REINHARDT, G.; CARRASCO, L.; TADICH, N.; RIEDEMANN, S.** 2001. Comparación entre dos técnicas de diagnóstico para diarrea viral bovina (DVB) en 50 predios de la x región, Chile: seroneutralización y enzimoimmunoensayo indirecto (elisa-i)*. *Arch. Med. Vet.*, 33(2), 173-183.

- **RIDPATH, J.; NEILL, J.; ENDSLEY, J.; ROTH, J.** 2003. Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhea virus in calves. *Am. J. Vet. Res.* 64(1) 65-9.

- **ROTH, A.; STENSALLEA, L.; GARLVA, M.; AABYA, P.** 2006. Beneficial non-targeted effects of BCG— Ethical implications for the coming introduction of new TB vaccines. *Tuberculosis* (86) 397–403.

- **SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG).** s.f. Tuberculosis Bovina. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/tuberculosis-bovina-tb>> [consulta: 04-03-2018]

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG).** 2015a. Lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG. [en línea] <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/lista_enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_02-01-2018.pdf> [consulta: 05-03-2018]

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG).** 2015b. Norma técnica 2015 Plan nacional de control y erradicación de Tuberculosis Bovina. Santiago, Chile. SAG, División de protección pecuaria. 21 p.

- **SOO, P.; HORNG, Y.; CHANG, K.; WANG, J.; HSUEH, P.; CHUANG, C.; LU, C.; LAI, C.** 2009. A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. *Mol. Cell. Probes.* 23(5): 240-246.

- **TORGERSON, P.; TORGERSON, D.** 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends. Microbiol.* 18(2): 67-72.

- **TÚÑEZ, V.; GARCÍA, M.; PÉREZ DEL MOLINO, M.; LADO, F.** 2002. Epidemiología de la tuberculosis. *Med. Integr.* 39(5):172-80.

- **VORDERMEIER, H.; JONES, G.; BUDDLE, B.; HEWINSON, R.; VILLAREAL RAMOS, B.** 2016. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annu. Rev. Anim. Biosci* (4): 87-109.

ANEXOS

Tablas:

Tabla 1: Zonas epidemiológicas para el control de la tuberculosis en Chile. Elaboración propia con datos de: **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG)**. 2015. Norma técnica 2015 Plan nacional de control y erradicación de Tuberculosis Bovina. Santiago, Chile. SAG, División de protección pecuaria. 21 p.

Zona	Regiones
Erradicación Norte	Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta
Control	Atacama, Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins, Maule, y Biobío, exceptuando la Provincia de Arauco
Erradicación Sur	La Araucanía, de Los Ríos, de Los Lagos, de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo, de Magallanes y Antártica Chilena y de la Provincia de Arauco, de la Región del Biobío

Tabla 6: Distribución de los animales, según edad, condición de vacunación, Predio, Resultado, Título de Anticuerpo y Densidad Óptica

ID	Edad	Condición	Predio	Resultado	Título de AC	DO
95	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
96	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
97	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
98	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
99	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
424	12	Placebo	Ostolazas	Positivo	1	0,30656039
182	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	0	0,349478847
102	12	BCG	Ostolazas	Negativo		

103	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
373	6	Placebo	Hermanos Carrera	Positivo	0	0,348252606
633	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	0	0,328632741
106	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
107	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
108	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
109	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
110	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
111	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
637	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	1	0,372777437
113	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
114	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
116	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
117	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
645	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	0	0,39852851
731	6	Placebo	La Invernada	Positivo	0	0,396683673
350	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	1	0,459183673
121	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
122	12	BCG	La Invernada	Negativo		
123	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
641	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	1	0,408338443
648	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	1	0,354383814
127	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
128	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
129	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
130	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
162	6	BCG	Ostolazas	Positivo	0	0,464745555
140	12	BCG	Peralillo	Negativo		
183	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	5	0,516247701
142	6	BCG	Peralillo	Negativo		
143	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
423	12	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,35438381
145	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
146	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
147	12	BCG	Peralillo	Negativo		
149	6	BCG	Peralillo	Negativo		
150	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
456	12	BCG	Hermanos Carrera	Positivo	7	0,37508112
152	6	BCG	Peralillo	Negativo		
153	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
154	12	BCG	Peralillo	Negativo		

155	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
156	12	BCG	Peralillo	Negativo		
158	6	BCG	Peralillo	Negativo		
730	6	Placebo	La Invernada	Positivo	5	0,496173469
316	6	BCG	Santa Cruz	Positivo	5	0,29980532
604	12	BCG	Peralillo	Positivo	7	0,315136476
610	6	BCG	Peralillo	Positivo	5	0,322501533
164	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
165	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
635	6	BCG	Ostolazas	Positivo	5	0,393623544
167	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
758	6	BCG	La Invernada	Positivo	5	0,405612245
169	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
170	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
168	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	6	0,407112201
460	6	Placebo	Hermanos Carrera	Positivo	6	0,329858982
627	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	6	0,394849785
280	6	BCG	Hermanos Carrera	Positivo	7	0,309012876
330	6	BCG	Peralillo	Positivo	7	0,28682674
471	12	Placebo	Hermanos Carrera	Positivo	11	0,35561324
177	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
553	6	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,719803801
179	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
180	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
181	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
568	6	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,568976088
624	6	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,518700184
184	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
185	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
186	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
187	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
188	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
189	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
230	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
654	6	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,407112201
232	12	BCG	La Invernada	Negativo		
233	12	BCG	Peralillo	Negativo		
234	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
235	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
355	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	7	0,422193878
237	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		

238	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
239	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
240	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
241	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
242	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
243	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
244	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
245	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
246	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
247	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
248	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
249	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
250	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
151	12	BCG	Peralillo	Positivo	13	0,327543424
252	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
253	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
254	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
255	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
256	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
257	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
258	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
259	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
260	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
261	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
262	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
263	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
264	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
265	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
267	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
268	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
269	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
270	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
271	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
272	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
273	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
274	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
275	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
276	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
277	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
278	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
279	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		

105	12	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,573200993
313	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
314	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
315	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
160	12	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,392059553
317	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
656	6	BCG	Ostolazas	Positivo	7	0,499080319
319	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
320	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
767	6	BCG	hermanos Carrera	Positivo	7	0,50127551
322	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
126	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	9	0,393623544
324	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
325	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
326	6	BCG	Peralillo	Negativo		
327	12	BCG	Peralillo	Negativo		
328	12	BCG	Peralillo	Negativo		
329	6	BCG	Peralillo	Negativo		
171	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	9	0,434089516
331	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
332	12	BCG	Peralillo	Negativo		
333	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
337	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
338	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
339	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
340	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
341	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
342	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
343	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
344	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
345	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
346	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
347	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
348	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
349	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
488	6	Placebo	Peralillo	Positivo	9	0,54639844
351	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
352	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
353	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
354	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
178	6	BCG	Ostolazas	Positivo	11	0,413243409

356	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
357	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
358	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
359	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
360	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
361	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
362	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
363	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
364	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
365	12	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
366	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
367	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
368	6	BCG	La Invernada	Negativo		
369	12	BCG	La Invernada	Negativo		
370	12	BCG	La Invernada	Negativo		
371	12	BCG	La Invernada	Negativo		
372	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
173	12	Placebo	Ostolazas	Positivo	27	0,454094293
374	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
375	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
376	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
377	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
378	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
379	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
380	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
381	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
382	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
383	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
384	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
385	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
386	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
387	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
388	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
572	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	11	0,297193878
643	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	11	0,40588596
425	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
426	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
427	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
428	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
429	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
430	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		

431	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
432	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
451	12	BCG	La Invernada	Negativo		
452	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
453	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
454	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
455	12	BCG	La Invernada	Negativo		
557	12	BCG	Ostolazas	Positivo	27	0,413151365
457	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
458	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
459	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
649	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	11	0,478234212
461	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
462	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
463	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
464	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
465	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
466	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
467	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
468	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
469	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
470	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
161	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	13	0,427958308
472	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
473	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
474	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
475	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
476	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
477	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
478	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
479	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
480	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
481	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
482	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
483	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
141	12	BCG	Peralillo	Positivo	38	1,162531017
486	12	BCG	Peralillo	Negativo		
487	12	BCG	Peralillo	Negativo		
166	6	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,724708768
172	6	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,642550582
490	12	BCG	Peralillo	Negativo		

491	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
492	6	BCG	La Invernada	Negativo		
493	12	BCG	Peralillo	Negativo		
494	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
495	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
496	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
497	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
498	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
499	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
500	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
647	6	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,488044145
502	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
503	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
504	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
505	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
506	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
507	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
508	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
509	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
510	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
511	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
512	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
513	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
514	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
515	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
516	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
517	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
518	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
519	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
520	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
521	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
522	12	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
523	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
524	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
525	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
526	12	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
527	12	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
528	12	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
529	6	BCG	Santa Cruz	Negativo		
530	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		
531	12	BCG	Santa Cruz	Negativo		

532	6	Placebo	Santa Cruz	Negativo		
550	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
551	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
231	6	Placebo	La Invernada	Positivo	19	0,46722907
556	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
772	6	BCG	Ostolazas	Positivo	19	0,474489796
558	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
560	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
562	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
565	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
174	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	23	0,577559779
101	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	27	0,456161864
175	6	BCG	Ostolazas	Positivo	27	0,491722869
721	12	Placebo	Peralillo	Positivo	53	0,394003156
638	6	BCG	Ostolazas	Positivo	27	0,436541999
576	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
585	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
586	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
587	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
589	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
590	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
163	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	38	0,722256284
593	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
596	6	BCG	Peralillo	Negativo		
599	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
602	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
603	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
569	6	BCG	Ostolazas	Positivo	38	0,564071122
606	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
607	12	BCG	Peralillo	Negativo		
100	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	45	0,600858369
620	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
144	12	Placebo	Peralillo	Positivo	76	1,03049968
625	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
626	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
501	12	Placebo	Ostolazas	Positivo	76	1,436724566
575	6	Placebo	La Invernada	Positivo	45	1,315757204
633	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
112	6	BCG	Ostolazas	Positivo	45	1,316983446
118	6	BCG	Ostolazas	Positivo	45	0,614347026
318	12	Placebo	Santa Cruz	Positivo	91	1,218362283

591	6	BCG	Ostolazas	Positivo	45	0,604537094
634	6	BCG	Ostolazas	Positivo	45	0,505211527
321	12	BCG	Santa Cruz	Positivo	151	1,249379653
640	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
639	6	BCG	Ostolazas	Positivo	45	0,549356223
720	6	Placebo	Peralillo	Positivo	53	1,012755102
119	6	BCG	Ostolazas	Positivo	53	0,555487431
644	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
632	12	Placebo	Ostolazas	Positivo	214	1,568238213
125	6	BCG	Ostolazas	Positivo	53	0,663396689
139	6	BCG	Peralillo	Positivo	53	0,602084611
251	12	BCG	Ostolazas	Positivo	362	1,1567596
718	12	BCG	Peralillo	Positivo	362	0,971593898
650	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
651	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
652	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
653	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
104	6	BCG	Ostolazas	Positivo	76	0,768853464
120	6	BCG	Ostolazas	Positivo	76	0,606989577
660	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
661	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
662	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
664	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
665	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
666	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
667	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
668	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
669	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
670	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
671	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
672	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
673	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
674	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
675	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
676	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
677	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
678	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
679	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
680	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
681	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
682	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		

683	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
685	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
686	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
687	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
688	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
689	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
690	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
691	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
692	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
693	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
694	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
695	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
696	12	BCG	Ostolazas	Negativo		
697	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
698	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
699	12	Placebo	Ostolazas	Negativo		
701	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
702	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
704	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
705	6	BCG	Peralillo	Negativo		
709	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
710	12	Placebo	Peralillo	Negativo		
711	6	Placebo	Peralillo	Negativo		
713	6	BCG	Peralillo	Negativo		
714	6	BCG	Peralillo	Negativo		
715	6	BCG	Peralillo	Negativo		
716	12	BCG	Peralillo	Negativo		
717	12	BCG	Peralillo	Negativo		
646	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	91	1,399141631
236	6	Placebo	La Invernada	Positivo	107	1,309625996
571	6	BCG	Ostolazas	Positivo	107	0,548129982
724	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
725	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
726	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
727	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
728	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
729	12	BCG	La Invernada	Negativo		
489	6	Placebo	Peralillo	Positivo	181	1,28747567
642	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	181	1,809932557
732	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
733	12	Placebo	La Invernada	Negativo		

735	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
736	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
737	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
738	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
739	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
740	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
741	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
742	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
743	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
744	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
745	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
746	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
747	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
749	6	Placebo	La Invernada	Negativo		
751	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
752	12	BCG	La Invernada	Negativo		
753	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
754	12	BCG	La Invernada	Negativo		
756	6	BCG	La Invernada	Negativo		
757	6	BCG	La Invernada	Negativo		
176	6	Placebo	Ostolazas	Positivo	214	1,634580012
759	12	Placebo	La Invernada	Negativo		
760	12	BCG	La Invernada	Negativo		
761	6	BCG	La Invernada	Negativo		
762	6	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
763	6	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
764	12	BCG	Hermanos Carrera	Negativo		
765	12	Placebo	Hermanos Carrera	Negativo		
766	6	BCG	hermanos Carrera	Negativo		
323	6	BCG	Peralillo	Positivo	302	1,03569111
770	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
484	6	BCG	Peralillo	Positivo	302	1,42375081
774	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
775	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
776	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
777	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
779	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
780	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
783	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
784	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
785	6	BCG	Ostolazas	Negativo		

787	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
789	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
790	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
791	6	BCG	Ostolazas	Negativo		
792	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
793	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		
794	6	Placebo	Ostolazas	Negativo		