



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

**EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA VACUNACIÓN
CON LA CEPA BCG DE *Mycobacterium bovis* EN EL DIAGNÓSTICO
DE TUBERCULOSIS EN GANADO LECHERO EN UN PREDIO DE
LA REGIÓN METROPOLITANA, CHILE**

Carolina Andrea Pérez Watt

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

**EVALUACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA VACUNACIÓN
CON LA CEPA BCG DE *Mycobacterium bovis* EN EL DIAGNÓSTICO
DE TUBERCULOSIS EN GANADO LECHERO EN UN PREDIO DE
LA REGIÓN METROPOLITANA, CHILE**

Carolina Andrea Pérez Watt

Nota final _____

Profesor Guía:	Dr. Patricio Retamal Merino	_____
Profesor Corrector:	Dr. Pedro Ábalos Pineda	_____
Profesor Corrector:	Dr. Richard Arancibia Berríos	_____

SANTIAGO, CHILE

2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, un importante apoyo desde el día uno. Gracias por la paciencia, el cariño, la entrega y la confianza...

A mis profesores, gracias por la oportunidad de demostrar lo que valgo, la confianza entregada y la paciencia por enseñarme cada día más...

A mis amigos, un apoyo fundamental de parte de mis pares. Gracias por escucharme cuando más lo necesitaba, y entregarme su apoyo siempre y en cada momento...

A mi equipo de trabajo, gracias por hacer de cada salida a terreno y de cada trabajo en el laboratorio un momento de diversión...

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	II
RESUMEN	III
ABSTRACT.....	IV
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Características microbiológicas de las micobacterias	3
Situación mundial de la tuberculosis bovina	3
Situación Nacional de la Tuberculosis bovina.....	5
Vacuna BCG en ganado bovino	6
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Trabajo en terreno	9
Trabajo en laboratorio	10
Consideraciones de bioética y bioseguridad	13
RESULTADOS.....	14
Toma de muestra	14
Interferencia vacunal	14
Diferencias entre 3 y 6 meses post-vacunación	20
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

INDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS.....	II
TABLA 1: INDIVIDUOS VACUNADOS Y EVALUADOS A LOS TRES MESES POST-VACUNACIÓN.....	14
TABLA 2: INDIVIDUOS NO VACUNADOS A LOS TRES MESES POST-VACUNACIÓN.....	16
TABLA 3: INDIVIDUOS VACUNADOS A LOS SEIS MESES POST-VACUNACIÓN.....	17
TABLA 4: INDIVIDUOS NO VACUNADOS A LOS SEIS MESES POST-VACUNACIÓN.....	19
TABLA 5: TABLA DE CONTINGENCIA DE 2X2 PARA PRUEBA DE MCNEMAR. CONTRASTANDO INDIVIDUOS CON Y SIN CONDICIÓN DE INTERFERENCIA VACUNAL A AMBOS TIEMPOS.	21
TABLA 6A: TABLA DE CONTINGENCIA PARA ÍNDICE KAPPA (K). ENFRENTANDO LOS INDIVIDUOS QUE PRESENTARON Y NO PRESENTARON LA CONDICIÓN DE INTERFERENCIA EN CADA TIEMPO.....	21
TABLA 6B: TABLA DE GRADO DE ACUERDO PARA EL ÍNDICE KAPPA DE CONCORDANCIA (MOLINERO, 2011)	22
TABLA 7A: COMPARACIÓN ENTRE ANTÍGENOS SEGÚN TIEMPO, UTILIZANDO LA PRUEBA DE T DE STUDENT.....	23
TABLA 7B: COMPARACIÓN ENTRE ANTÍGENOS ENTRE TIEMPOS, UTILIZANDO LA PRUEBA DE T DE STUDENT.....	23

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad crónica y zoonótica, producida por *Mycobacterium bovis*. El costo de la enfermedad se relaciona a la disminución en la productividad de los animales severamente infectados, al control de movimiento animal, pruebas de diagnóstico para la detección y eliminación de animales positivos para evitar la propagación del agente, los decomisos y el menor valor de la leche. Se considera como una enfermedad ocupacional, ya que las personas que tienen mayor riesgo de contagiarse con *M. bovis* son quienes pasan largos periodos en contacto cercano con el ganado.

La TBB en Chile se encuentra presente, y para apoyar el plan para su control y erradicación, se está estudiando el uso de la vacuna con cepa BCG de *M. bovis* en el ganado bovino. Fue desarrollada por Calmette y Guérin, quienes informaron la inducción de protección en el ganado contra la exposición a la bacteria. Como esta vacuna corresponde a una cepa atenuada de *M. bovis*, el objetivo de este trabajo es evaluar la interferencia que tiene su aplicación, con el diagnóstico tradicional de la infección en planteles lecheros de la Región Metropolitana.

Para ello, 56 vaquillas fueron vacunadas y 48 fueron inyectadas con NaCl 0,9% a modo de controles. A todas se les tomó muestra de sangre tres y seis meses después de la vacunación las que luego fueron estimuladas con distintos antígenos y se dejaron incubar. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se cosecharon los plasmas y finalmente se procedió a realizar el ensayo diagnóstico, ELISA IFN- γ con antígenos DIVA añadidos. Los antígenos DIVA corresponden a antígenos que fueron eliminados de la cepa vacunal.

Los resultados demostraron un aumento en la cantidad de individuos falsos positivos al diagnóstico tradicional de TBB en los primeros seis meses después de la vacunación. Esto quiere decir, que fueron positivos a la tuberculina bovina, pero negativos a la prueba DIVA (Detecting Infected among Vaccinated Animals), debido a la reacción con la vacuna. Se concluye que se hace necesario utilizar una prueba complementaria para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado, en este caso, la prueba DIVA, durante los primeros meses después de vacunar con la cepa *M. bovis* BCG

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a chronic and zoonotic disease, caused by *Mycobacterium bovis*. The cost of the disease is associated to the decrease in the productivity of severely infected animals, the restrictions for the animal movement, the diagnostic tests for the detection and elimination of positive animals to avoid the spread of the agent, confiscations and the lower price of milk. It is considered an occupational disease, since people who have the highest risk for *M. bovis* zoonotic infection are those who spend long time in close contact with livestock.

Bovine tuberculosis in Chile is an endemic disease, and the plan for the control and eradication of the disease is being supported by the study of the vaccination with the *M. bovis* BCG strain in cattle. It was developed by Calmette and Guerin, who reported the induction of protection in cattle against exposure with *M. bovis*. As this vaccine corresponds to a strain of *M. bovis*, the objective of this work is to evaluate the interference that has its application, with the traditional diagnosis of infection in dairy farms from the Metropolitan Region.

For this, 56 heifers were vaccinated and 48 were injected with NaCl 0,9%. Blood samples were taken at three and six months after the vaccination. Once at the lab, samples were stimulated with different antigens and, after an incubation period, plasmas were harvested and IFN- γ detected by carrying out an ELISA diagnostic assay.--

The results showed an increase in the number of false positive individuals to the traditional diagnosis of bovine tuberculosis in the first six months after vaccination. This means that they were positive to bovine tuberculin, but negative to the DIVA (Detecting Infected among Vaccinated Animals) test, due to the reaction with the vaccine. It is concluded that it is necessary to use a complementary test for the diagnosis of tuberculosis in cattle, in this case, the DIVA test, during the first months after vaccination with the *M. bovis* BCG strain

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad crónica y zoonótica, producida por *Mycobacterium bovis*, bacteria perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, donde además se encuentra la bacteria causante de la tuberculosis humana. Es una enfermedad contagiosa que se disemina a través de las secreciones respiratorias, deposiciones, leche, orina, secreciones vaginales y/o semen. La vía de transmisión más común es la respiratoria, a través de aerosoles inhalados por el animal expuesto. Otra vía común es la oral, mediante la ingestión de leche o calostro contaminado sin pasteurizar. Ésta última es especialmente importante en la infección hacia terneros y hacia el ser humano.

La TBB es un problema importante en la economía y en la salud animal. El costo de la enfermedad se relaciona a la disminución en la productividad de los animales severamente infectados, al control de movimiento animal, pruebas de diagnóstico para la detección y eliminación de animales positivos para evitar la propagación del agente, los decomisos y el menor valor de la leche.

M. bovis tiene potencial zoonótico, es decir, logra infectar al ser humano. No siempre la infección evoluciona a la enfermedad, pero cuando lo hace, tiene signos similares a los de la tuberculosis humana provocada por *M. tuberculosis*, incluyendo fiebre, transpiración nocturna y pérdida de peso, además de otros signos dependiendo del órgano afectado. Actualmente, se considera como una enfermedad ocupacional, ya que las personas que tienen mayor riesgo de contagiarse con *M. bovis* son quienes pasan largos periodos en contacto cercano con el ganado, como los trabajadores de un predio productor de leche. Gracias a la implementación de programas de control de la TBB y a la pasteurización rutinaria de la leche de vaca, se ha logrado disminuir la incidencia de la enfermedad. Por ejemplo, en los Estados Unidos, menos del 2% de los casos de tuberculosis en el país son producidos por *M. bovis*, representando menos de 230 casos de tuberculosis al año en ese país.

La cepa BCG de *M. bovis* se utiliza mundialmente para inmunizar a recién nacidos contra la enfermedad. Fue desarrollada por Calmette y Guérin. En el año 1911, durante la experimentación de la vacuna con animales, se informó por primera vez que ésta indujo

protección en ganado contra la exposición con *M. bovis*. La cepa en humanos se utilizó por primera vez en el año 1921 y se introdujo al Programa Ampliado de Inmunización de la Organización Mundial de la Salud en 1974. Actualmente se administra la vacuna BCG a unos 100 millones de niños cada año.

Tomando en cuenta el antecedente de la protección en ganado informada por Calmette y Guérin y la constante búsqueda de métodos para eliminar la TBB, es que se ha investigado el uso de la vacuna en el ganado doméstico. Como esta vacuna corresponde a una cepa de *M. bovis*, el objetivo de este trabajo es evaluar la interferencia que tiene su aplicación, con el diagnóstico tradicional de la infección en planteles lecheros de la Región Metropolitana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características microbiológicas de las micobacterias

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 3 a 5 µm de longitud, o curvos en forma de maza. Son inmóviles, ácido alcohol resistentes, no esporulados, de crecimiento lento y con abundantes gránulos citoplasmáticos, que le otorgan una resistencia mayor a la tinción por colorantes comunes (Rodríguez, 2006; Godoy *et al.*, 2008). En cuanto a la velocidad de crecimiento algunas especies son de crecimiento rápido y otras lento (Rodríguez, 2006). Se destaca en su estructura una gran riqueza en lípidos (20-60%) (Godoy *et al.*, 2008), los cuales son responsables de la tinción al ácido que toman las bacterias con el colorante rojo carbol fucsina, razón por la que a estos microorganismos se les llama ácido alcohol resistentes (Abbas y Lichtman, 2004). Las micobacterias son altamente resistentes a la desecación y permanecen viables en el esputo desecado de seis a ocho meses cuando están protegidas de la luz solar directa. Son, en general, más resistentes a los agentes desinfectantes que otras formas vegetativas, pero son destruidos por procedimientos de pasteurización (Godoy *et al.*, 2008).

Situación mundial de la tuberculosis bovina

La distribución geográfica de TBB ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Antes de la introducción de medidas de control y la pasteurización de la leche en los países desarrollados, la TBB estaba ampliamente distribuida en todo el mundo (FAO, s.f.). Después de los años 60, al aplicarse de manera generalizada la pasteurización y programas nacionales de control de esta patología, el número de casos de zoonosis en humanos causados por *M. bovis* disminuyó significativamente en Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte (Grange, 2001; Torgerson y Torgerson, 2010; Department for Environment Food & Rural Affairs, 2015). Hoy, muchos países de Europa y América del Norte, así como Australia, están libres de la enfermedad o a punto de erradicarla del ganado doméstico (OIE, 2016). Sin embargo, el mantenimiento de la infección de *M. bovis* en especies silvestres ha comprometido considerablemente los intentos de erradicación en países como Irlanda, Nueva Zelanda, el Reino Unido, y en partes de los Estados Unidos de América (Thoen *et al.*, 2009). En los países en desarrollo, los datos sobre la prevalencia de la TBB son escasos y puede que la información disponible no represente la verdadera situación

epidemiológica de la enfermedad. Aunque la TBB es una enfermedad de declaración obligatoria, a menudo no se notifica lo suficiente, especialmente en países que carecen de sistemas eficaces de vigilancia y notificación de enfermedades. El carácter insidioso de la enfermedad, que no provoca brotes fulminantes con elevadas tasas de mortalidad, probablemente disminuya el reconocimiento y notificación, lo que se traduce en una falta de medidas de control (FAO, s.f.). Sin embargo, la literatura indica que la prevalencia es mayor en las naciones, especialmente de África, Asia y América Latina (Thoen *et al.*, 2009).

Según la base de datos mundial de información zoonosaria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la TBB se encuentra clínicamente demostrada en países como Brasil, Colombia y Ecuador, dentro del continente sudamericano. En cuanto a los países colindantes a nuestro territorio nacional, la enfermedad se encuentra presente en Argentina, Bolivia y Perú. En el primer caso, está limitada a ciertas zonas dentro del país; Bolivia y Perú, al igual que Chile, tienen situación zoonosaria de “enfermedad clínica demostrada”, sin embargo, Perú no notificó casos en el segundo semestre del año 2016 (OIE, 2016).

El control de *M. bovis* atrae interés político, de salud pública y de los medios de comunicación debido a su poder zoonótico, efectos sobre la salud y el comercio animal (Torgerson y Torgerson, 2010), y el papel de la vida silvestre en el ciclo de transmisión (Corner *et al.*, 2014). Las actividades de prevención, control y erradicación de la TBB debieran estar basadas en el conocimiento de las relaciones complejas y dinámicas entre el agente, el hospedero y el medio ambiente, en lo que se conoce como la triada epidemiológica (Dargatz *et al.*, 2002). Cada elemento de esta triada influye en el riesgo de que ingrese, se mantenga y/o se disemine una infección, por lo tanto, tener una idea de los factores asociados a dicho riesgo, permite maximizar la salud, el bienestar y la productividad de los animales (Dohoo *et al.*, 2009).

Los factores de riesgo de la infección por *M. bovis*, están principalmente asociados al contacto directo entre los animales y a las condiciones de manejo que lo favorecen (Collins, 2006). Entre estos factores de riesgo se encuentran aquellos asociados a la introducción de la TBB como el agente y su sobrevivencia en el medio ambiente, y factores asociados al

riesgo de exposición-diseminación de la enfermedad, como las características del rebaño (Reyes, 2012).

Situación Nacional de la Tuberculosis bovina

Según la base de datos mundial de información zoonosológica de la OIE, la TBB se encuentra clasificada como “enfermedad clínica demostrada” en Chile (OIE, 2016). Así mismo, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), la clasifica como “enfermedad presente” (Chile, 2014), con presentación periódica dentro del año y de denuncia obligatoria (SAG, 2015). A pesar de esto, la presentación de la enfermedad no es homogénea en todo el país, compartimentándose en cuatro zonas de ocurrencia epidemiológica distintas (SAG, s.f.; Quezada y Retamal, 2010):

- Zona I: Incluye desde la Región de Arica y Parinacota, hasta la Región de Coquimbo. En esta zona la presentación es esporádica.
- Zona II: Incluye desde la Región de Valparaíso, hasta la Región del Biobío. La presentación de la enfermedad en esta zona es endémica, con prevalencias inter-rebaño media a alta y niveles de infección intra-rebaño altos.
- Zona III: Incluye las regiones de la Araucanía y de los Lagos, exceptuando las provincias de Chiloé y Palena. Con presentación endémica, pero prevalencia predial e intra-rebaño bajas.
- Zona IV: Provincias de Chiloé y Palena de la Región de los Lagos, y las regiones de Aysén y Magallanes y de la Antártica Chilena. Con presentación esporádica con muy baja prevalencia, tanto inter como intra-rebaños, existiendo incluso áreas sin infección.

El control de la enfermedad, primero en los 90 en la zona lechera y desde 2011 con alcance nacional, ha avanzado junto a los ganaderos, médicos veterinarios autorizados y SAG, decididos a trabajar en conjunto para controlar y sanear rebaños infectados por TBB (SAG, 2016). Es por esto por lo que el SAG ha implementado un Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina. Dicho plan divide al país en tres zonas

epidemiológicas: Zona de erradicación Norte (Regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta), Zona de control (Regiones de Atacama, Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins, Maule y Biobío, exceptuándose la Provincia de Arauco) y Zona de erradicación Sur (Provincia de Arauco, Regiones de La Araucanía, Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes y Antártica Chilena) (Chile, 2015). Como sus nombres lo indican, en las Zonas de Erradicación se busca la eliminación completa de la enfermedad, mientras que en la zona de control se busca lograr la disminución de la prevalencia predial de la TBB, basados en la detección de predios y animales infectados, el saneamiento de estos predios y la restricción de movimiento de ganado para evitar la propagación de la infección (Quezada y Retamal, 2010). Lamentablemente, no se han logrado los resultados esperados con la implementación del plan mencionado anteriormente, por lo que se están estudiando otras maneras para lograr el control de la TBB, siendo una de ellas el uso de la vacuna con cepa BCG de *M. bovis* en el ganado bovino.

Vacuna BCG en ganado bovino

En el año 1911, Calmette y Guérin informaron por primera vez que la vacuna BCG (Bacilo Calmette Guérin) indujo protección en el ganado contra la exposición a *M. bovis* (Vordermeier *et al.*, 2016). Para evaluar su eficacia se han utilizado modelos de exposición con dosis de bajo riesgo de 10^3 a 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. bovis*, administradas en forma de aerosol, con el objetivo de reproducir la enfermedad de forma natural en el tracto respiratorio (Buddle *et al.*, 1995a; Buddle *et al.*, 1995b; Vordermeier *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2002).

De los estudios realizados para evaluar la vacuna BCG, se han informado diversas características de esta para tener en consideración:

1. La vacunación en terneros muy jóvenes (<1 mes de edad) indujo mayores niveles de protección que la vacunación a los seis meses de edad (Buddle *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2005a).
2. La sensibilización previa con micobacterias ambientales evita la inducción de la protección de la vacuna en terneros (Buddle *et al.*, 2002; Hope *et al.*, 2005a). Sin

embargo, en otro estudio hubo evidencia de que la exposición a *M. avium* indujo un nivel de protección contra la infección por *M. bovis*, enmascarando posiblemente la inmunidad inducida por la vacuna BCG (Hope *et al.*, 2005b).

3. La inmunidad puede no ser de larga duración, con protección inducida en terneros vacunados al primer mes de edad y expuestos a la enfermedad 12 meses después, mientras que no se observó protección significativa a la exposición 24 meses después de la vacunación (Thom *et al.*, 2012).
4. Terneros vacunados con BCG neonatalmente y revacunados seis semanas más tarde tuvieron una protección reducida en comparación con los terneros no revacunados (Buddle *et al.*, 2003).
5. Se ha demostrado la eficacia de la vacuna al ser administrada a dosis bajas (10^4 a 10^6 UFC) por vía subcutánea (Buddle *et al.*, 1995a) o a dosis altas (10^8 UFC) por vía oral (Wedlock *et al.*, 2011).

Como desventaja, la vacunación con BCG sensibiliza al ganado bovino a la prueba de tuberculina, lo que compromete el uso de los ensayos de vigilancia de la tuberculosis bovina (Berggren, 1981; Buddle *et al.*, 1995a; Buddle *et al.*, 1999; Vordermeier *et al.*, 1999). Esta sensibilización se presenta en todos los animales vacunados hasta los seis meses post vacunación. Luego los individuos pueden volverse negativos a la prueba cutánea nueve meses post vacunación, pero una proporción permanece sensibilizada durante al menos dos años (EFSA, 2013). Considerando que en Chile la vacunación del ganado podría ser una alternativa de prevención a futuro, el objetivo de esta memoria es evaluar la interferencia que tiene la aplicación de la vacuna BCG al ganado bovino de la Región Metropolitana, con el diagnóstico de la infección propiamente tal, en condiciones de terreno, ya que toda la evidencia existente se ha realizado bajo condiciones experimentales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interferencia de la vacunación con la cepa BCG de *M. bovis* en el diagnóstico tradicional de la tuberculosis en ganado bovino lechero de la Región Metropolitana de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la interferencia de la vacunación con el diagnóstico tradicional de la infección por *M. bovis* a los tres meses post vacunación.
2. Determinar la interferencia de la vacunación con el diagnóstico tradicional de la infección por *M. bovis* a los seis meses post vacunación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo en terreno

El estudio se llevó a cabo en un predio lechero ubicado en la comuna de María Pinto, provincia de Melipilla, Región Metropolitana. Este predio se caracteriza por mantener a todas sus terneras y vaquillas negativas a tuberculosis bovina, hasta que entran a la etapa productiva. En el predio se realizan pruebas de tuberculina ano-caudal cada tres meses, y se eliminan los animales positivos. Una vez que las vaquillas tienen su primer parto y entran a la etapa productiva, tienen contacto con los animales de mayor edad en la lechería, al momento de la ordeña, y de estos individuos existen algunos que son positivos a la infección con *M. bovis*, contagiando a las vacas primerizas que han sido negativas a la infección toda su vida.

Sujetos de estudio

Se consideraron como sujeto de estudio a todas las vaquillas de 11 meses de edad, en etapa de pre-encaste, obteniéndose un tamaño muestral total de 104, que es el número total de animales bajo dichos criterios que alcanza a tener el predio en un período acorde al desarrollo de esta memoria de título. Se estudiaron las vaquillas, entendiendo que éstas han sido negativas a la infección por *M. bovis* toda su vida, y que al momento de entrar a la producción como tal se enfrentan a la carga infecciosa de sus antecesoras. Además, hay que tener en cuenta que la protección que genera la vacuna dura aproximadamente 12 meses (Thom *et al.*, 2012), por lo tanto, en terneras no tiene sentido el estudio, ya que no tendrán contacto con la carga infecciosa hasta más allá de cumplir un año de vida.

Muestra

Para la toma de muestra sanguínea se utilizaron tubos colectores de sangre de 10 mL con heparina de litio como anticoagulante y aguja múltiple de 21G x 1,5". Se recolectó sangre periférica de la vena coccígea, con el sistema de tubos al vacío (Venoject®). Este procedimiento se realizó al tiempo cero, a los tres meses y a los seis meses post vacunación, registrándose cada tubo con el número de identificación DIIO (Dispositivo de Identificación Individual Oficial) de cada individuo. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{C}$) hasta su procesamiento en el laboratorio.

Vacunación

Se utilizó la vacuna BCG liofilizada para vacunar a la mitad del grupo, en una dosis de 0,1mL/individuo por vía subcutánea en la tabla del cuello. A la mitad restante se les inyectó suero fisiológico como placebo, considerándolas como grupo control dentro del estudio. En una planilla se registró cada individuo con su DIIO, el número de inyección utilizada y cualquier tipo de observación con respecto al animal muestreado. La inyección de vacuna o placebo fue a ciegas para el dueño y los trabajadores del fundo.

Trabajo en laboratorio

Una vez obtenidas las muestras de sangre, se trasladaron a temperatura ambiente (22 ± 3 °C) al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET) de la Universidad de Chile para su procesamiento.

Antígenos y reactivos

En placas de cultivo celular estériles de 96 pocillos con fondo plano se dispensaron seis alícuotas de 250 μ L de sangre de cada muestra, una alícuota por pocillo. Luego a cada alícuota se le adicionó de manera aseptica 25 μ L de cada antígeno estimulador, de acuerdo con el esquema presentado en el Anexo 1.

Los antígenos de estimulación y reactivos utilizados en el estudio son:

- PPD b: Derivado protéico purificado, antígeno de estimulación Prionics®.
- PPD a: Derivado protéico purificado, antígeno de estimulación Prionics®.
- PC-EC®: Cóctel de péptidos Prionics®, antígeno de estimulación, basado en ESAT-6 y CFP-10.
- Rv3615c: Cóctel de péptidos UK, antígeno de estimulación.
- PBS (NIL): Tampón Solución Fosfato Salina como control basal del estado sanitario de los animales muestreados.
- Pokeweed (PW): Mitógeno, control de estimulación que evalúa la viabilidad de las células.

Los antígenos contenidos en PC-EC® y Rv3615c son expresados por la cepa patógena de *M. bovis*, pero no por la cepa vacunal (BCG), y se utilizaron con el objetivo de identificar si el individuo muestreado está verdaderamente infectado independientemente de su estado de vacunación. Es decir, conforman una prueba DIVA o “Detecting Infected among Vaccinated Animals”. Este ensayo se realiza mediante la detección de IFN- γ en la muestra, a través de técnicas inmunoenzimáticas o ELISA (Vordermeier *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2010; Vordermeier *et al.*, 2011a; Vordermeier *et al.*, 2011b).

Una vez dispensadas las muestras y los antígenos se mezclaron en agitador durante un minuto y se dejaron en incubación a 37° C por 16 a 24 horas, en cámara húmeda.

Cosecha de plasmas

Una vez acabado el tiempo de incubación, cada placa fue centrifugada a 2000 rpm, por 15 minutos a T° ambiente ($22 \pm 3^\circ$ C), con el objetivo de separar el plasma del detrito celular. Se cosecharon al menos 100 μ L de plasma de cada pocillo, en placas de cultivo celular no estériles de 96 pocillos. Cada placa se guardó en congelación a -20° C hasta la realización del ensayo.

Ensayo ELISA IFN- γ

Una vez descongelados los plasmas, se procedió a realizar el ensayo con el kit BOVIGAM 2G® según recomendaciones del fabricante, mediante el cual se buscó la detección de IFN- γ como respuesta de la inmunidad celular ante la presencia de los antígenos. Este ensayo contiene nueve componentes necesarios para su realización: Una placa tapizada con anticuerpos específicos de IFN- γ , control positivo, control negativo, diluyente verde, solución de lavado concentrada 20X, conjugado concentrado 250X, diluyente azul, solución sustrato y solución de frenado. Se siguió un protocolo entregado por el fabricante para finalmente conseguir una placa ELISA en el que la estimulación del plasma con los distintos antígenos utilizados se ve representada por un color amarillo brillante según la intensidad de la reacción. Estas placas se leyeron en el espectrofotómetro, registrándose la lectura de densidades ópticas (DO) en una planilla Excel, que es la que se utilizó para interpretar los resultados.

Análisis de los datos

Entendemos por interferencia en el diagnóstico a la evidencia de la sensibilización que genera la vacuna BCG en el ganado al PPD b, es decir, que un animal resulte positivo a la infección por *M. bovis*, siendo en realidad negativo. Esto se ve reflejado en el ensayo ELISA INF- γ con un resultado positivo a PPD b (PPD b pos), y negativo a los antígenos DIVA (DIVA neg).

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de la interferencia vacunal:

$$((\text{PPD b pos y DIVA neg})_{\text{grupo vacunado}} \times 100) - ((\text{PPD b pos y DIVA neg})_{\text{grupo control}} \times 100)$$

El primer caso (grupo vacunado) corresponde, la mayoría de las veces, a una interferencia de la vacunación en el diagnóstico. Sin embargo, ya que la prueba DIVA tiene una sensibilidad cercana al 60%, algunos de estos resultados podrían deberse a un problema de sensibilidad de la técnica y no a la interferencia vacunal. Es por esto, que se hace la diferencia con el grupo control obteniendo la fórmula mencionada. El valor final expresa la interferencia real de la vacunación en el diagnóstico de la infección.

Además, se determinó la presencia de diferencias significativas entre el diagnóstico tradicional (PPD b y PPD a) y los antígenos DIVA (PC-EC® y Rv3615v) mediante el análisis de una variable cualitativa (resultado positivo o negativo) y una variable cuantitativa (lecturas de DO).

Para el análisis de la variable cualitativa, los ensayos se compararon a través de una tabla de contingencia de 2x2 y se determinó la presencia de diferencias significativas mediante la prueba de McNemar. Además, se determinó también el nivel de concordancia a través del estadístico Kappa.

Para el análisis de la variable cuantitativa, se utilizó una prueba de T de Student para la comparación de medias, utilizando el programa INFOSTAT®. Con esta prueba lo que se busca es evaluar si hay alguna diferencia estadísticamente significativa entre la reacción ante cada antígeno con los cuales se estimuló la muestra.

Consideraciones de bioética y bioseguridad

Este trabajo se realizó bajo normas de bioseguridad, con el objetivo de mantener la seguridad tanto propia como de los animales utilizados dentro del ensayo. En el trabajo en terreno estas normas incluyen un manejo apropiado de los animales dentro de mangas para facilitar el trabajo, el uso de material estéril y alcohol para la desinfección de la zona de punción. También el uso de indumentaria apropiada, como overoles, botas de goma y guantes. Es importante recalcar que el trabajo con los animales se realizó con el consentimiento de los dueños del predio y los encargados.

Dentro del trabajo en el laboratorio también se consideraron normas básicas de bioseguridad, que incluyeron el uso de delantal y guantes, desinfección de los materiales y superficies con alcohol al 70%, depósito de material contaminado en recipientes cerrados dispuestos específicamente para ello, y el lavado de manos, con el objetivo de resguardar la seguridad de cada operador y el orden del laboratorio.

RESULTADOS

Toma de muestra

Tres meses después de la vacunación se contó con un tamaño muestral de 104 animales, de los cuales 56 fueron vacunados con la cepa *M. bovis* BCG, y 48 no vacunados o controles. A los seis meses después de la vacunación, hubo un total de 97 animales, 56 de los cuales fueron vacunados con la cepa, y 41 controles. A todos ellos se les tomó muestra de sangre. El detalle se puede apreciar en el Anexo 2.

Interferencia vacunal

Tres meses después de la vacunación

Al hacer el cálculo de la interferencia vacunal a los tres meses después de la vacunación, se consideró un total de 56 individuos vacunados, de los cuales 10 presentaron la condición de ser positivos a PPD b y negativos a DIVA (Tabla 1), lo que corresponde al 17,9%. Luego, en el grupo de animales no vacunados, se consideró una totalidad de 48 vaquillas, de las cuales 7 presentaron la condición (Tabla 2), siendo un 14,6%. Al realizar la respectiva diferencia entre ambos grupos, se obtuvo una interferencia vacunal real de 3,3%.

Tabla 1: Individuos vacunados y evaluados a los tres meses post-vacunación.

ID	3 MESES				Interpretación
	Bov-Av	Bov-Ñil	PC-EC-Ñil	Rv3615-Ñil	
118	-0.161	0.392	-0.003	0.004	Neg
119	-0.057	0.177	0.072	0.034	Neg
120	0.231	0.581	0.006	0.002	IV
121	0.002	0.201	0.01	-0.001	Neg
122	0.007	0.618	-0.004	-0.005	Neg
123	-0.173	0.015	0	0.003	Neg
126	-0.057	0.228	0.039	0.013	Neg
197	-0.155	1.167	0.081	0.011	Neg
198	0.057	0.357	0.011	0.003	IV
199	-0.461	3.047	0.034	0.018	Neg
203	0.308	1.123	0.049	0.031	IV
258	0.187	0.36	-0.004	0.001	IV
260	0.025	0.086	0.004	0.002	Neg

262	-0.207	0.681	-0.009	0.076	Neg
331	-0.056	0.089	0.036	0.015	Neg
333	-2.269	0.647	0.042	0.014	Neg
383	0.019	0.033	0.003	0.001	Neg
387	-0.05	0.058	-0.003	0.003	Neg
388	0.068	0.122	0.039	0.008	IV
486	0.018	0.126	0.028	0.031	Neg
490	-0.133	0.771	0.004	0.002	Neg
492	-0.106	0.274	0	0.001	Neg
536	0.003	0.782	0.007	0.005	Neg
538	-0.171	0.075	0.03	0.007	Neg
645	-0.022	0.035	0.026	0.025	Neg
647	-0.115	0.370	-0.002	0.043	Neg
649	0.017	0.105	0.007	-0.002	Neg
651	0.021	0.098	0.019	0.003	Neg
653	0.008	0.008	-0.001	-0.005	Neg
756	0.067	0.831	0.031	0.003	IV
758	-0.027	0.041	0.030	-0.007	Neg
759	-0.212	0.87	0.074	0.052	Neg
760	0.407	0.547	0.031	0.016	IV
763	0.089	0.129	-0.104	-0.097	IV
836	-0.057	0.096	-0.002	-0.009	Neg
844	0.073	0.185	0.013	0.015	IV
847	0.020	0.356	0.003	0.025	Neg
848	0.027	0.098	0.009	0.000	Neg
849	0.078	0.139	0.001	0.023	IV
850	0.037	0.088	0.017	0.064	Neg
851	-0.685	0.244	0.012	0.028	Neg
853	-0.292	0.114	0.032	0.006	Neg
855	-0.911	0.176	0.005	-0.004	Neg
856	-0.076	0.721	0.096	-0.010	Neg
919	-2.744	0.561	0.011	-0.006	Neg
920	-0.539	0.291	0.003	-0.01	Neg
921	0.019	0.11	-0.025	-0.029	Neg
925	-0.25	-0.01	0.009	0.021	Neg
927	-0.058	0.125	0.016	0	Neg
930	-0.263	0.391	0.034	-0.017	Neg
981	0.619	1.038	-0.003	0.005	Neg
983	-0.618	2.095	0.018	0.065	Neg
985	0.244	0.552	-0.002	0.003	Neg
986	1.15	1.339	-0.003	0.004	Neg
988	-0.004	0.011	-0.012	-0.011	Neg

990	0.383	0.793	0.038	0.015	Neg
-----	-------	-------	-------	-------	-----

En color se encuentran destacados los animales que presentaron la condición de ser positivos de PPD b (Bov-Av > 0,05) y negativos a DIVA (PC-EC-NIL < 0,1 y Rv3615-Nil < 0,1). Neg: Negativos. IV: Interferencia vacunal.

Tabla 2: Individuos no vacunados a los tres meses post-vacunación.

ID	3 MESES				Interpretación
	Bov-Av	Bov-Nil	PC-EC-Nil	Rv3615-Nil	
129	-0.07	0.094	0.01	0.004	Neg
130	-0.044	0.029	0.002	0.001	Neg
132	-0.024	0.036	-0.005	-0.004	Neg
133	-0.016	0.042	0.019	0.003	Neg
196	0.687	3.039	0.016	0.018	Pos
200	-0.162	3.201	0.043	0.03	Neg
201	-0.247	0.427	0.074	0.028	Neg
202	0.243	0.806	0.012	0.065	Pos
259	-0.367	0.288	0.016	0.009	Neg
261	0.106	0.341	0.008	0.005	Pos
263	-0.251	0.319	0.016	0	Neg
332	-0.012	0.085	0.045	0.026	Neg
384	-0.017	0.014	0.007	0.002	Neg
386	-0.028	0.006	0.001	-0.005	Neg
390	0.021	0.022	-0.001	-0.001	Neg
493	-0.074	0.17	0.009	-0.008	Neg
533	-0.049	-0.006	-0.007	-0.002	Neg
535	-0.014	-0.009	-0.004	-0.012	Neg
537	-0.055	0.014	0.087	0.041	Neg
646	0.003	-0.050	-0.056	-0.059	Neg
648	-0.008	0.007	-0.018	-0.017	Neg
650	-0.002	0.017	0.011	0.005	Neg
652	-0.009	0.004	0.003	0.000	Neg
755	-0.158	0.086	0.035	0.005	Neg
757	-0.009	0.043	0.018	0.006	Neg
761	-0.047	0.257	0.065	0.026	Neg
762	0.032	0.124	0.027	-0.002	Neg
764	-0.021	0.213	0.01	0.001	Neg
837	-0.251	0.229	0.017	0.009	Neg
840	-0.559	0.289	0.007	0.008	Neg
843	0.083	0.057	0.027	0.018	Pos
845	0.011	0.051	0.003	0.000	Neg

846	-0.024	0.030	0.006	-0.001	Neg
854	-0.071	0.091	-0.020	-0.020	Neg
858	0.293	0.828	0.098	0.036	Pos
859	-0.282	0.272	0.008	0.023	Neg
916	-0.099	0.116	0.027	0.007	Neg
918	-2.737	0.591	-0.048	-0.031	Neg
922	-0.849	0.132	-0.032	-0.069	Neg
923	-0.063	0.242	0.01	0.006	Neg
924	-2.507	0.67	0.07	-0.07	Neg
926	-0.111	0.019	-0.005	-0.003	Neg
928	-0.167	0.15	-0.102	-0.096	Neg
982	0.03	0.14	0.02	0.002	Neg
984	0.265	0.812	0.011	0.015	Pos
987	0.028	0.077	0.002	0.008	Neg
989	0.057	0.159	0.004	0.016	Pos
991	-0.023	0.01	0.001	0.011	Neg

En color se encuentran destacados los animales que presentaron la condición de ser positivos de PPD b (Bov-Av > 0,05) y negativos a DIVA (PC-EC-NIL < 0,1 y Rv3615-Nil < 0,1). Neg: Negativos. Pos: Positivos a *M. bovis* por la prueba diagnóstica tradicional (PPD b). DIVA: Positivos a *M. bovis* por la prueba diagnóstica DIVA.

Seis meses después de la vacunación

Al hacer el cálculo de la interferencia seis meses después de la vacunación, en el grupo vacunado se obtuvo un total 56 vaquillas, de las cuales 14 presentaron la condición de interferencia (Tabla 3), lo que corresponde a un 25%. Luego, en el grupo no vacunado, se obtuvo un total de 41 animales, de los cuales 5 presentaron la condición de ser positivos a PPD b y negativos a DIVA (Tabla 4), siendo un 12,2%. Finalmente, al realizar la diferencia según la fórmula expresada más arriba, se obtuvo una interferencia vacunal real de 12,8%.

Tabla 3: Individuos vacunados a los seis meses post-vacunación.

ID	6 MESES				Interpretación
	Bov-Av	Bov-Nil	PC-EC-Nil	Rv3615-Nil	
118	-0.001	0.016	0.005	0.001	Neg
119	0.089	0.195	0.028	-0.004	IV
120	-0.076	0.156	0.065	0.02	Neg
121	0.005	0.061	0.01	0.004	Neg

122	0.009	0.073	0.001	-0.006	Neg
123	-0.001	0.004	-0.005	-0.003	Neg
126	0.013	0.014	0.011	0.005	Neg
197	-0.04	0.054	0.007	0.003	Neg
198	-0.051	0.335	0.028	0.022	Neg
199	0.746	1.735	0.053	0.013	IV
203	0.003	0.172	0.02	-0.004	Neg
258	-0.01	0.089	0.004	0.002	Neg
260	-0.041	0.118	0.007	0.005	Neg
262	-0.023	0.025	0.003	0.002	Neg
331	-0.007	0.054	0.039	0.007	Neg
333	-0.3	0.263	0.014	-0.006	Neg
383	-0.004	-0.016	-0.014	-0.014	Neg
387	-0.016	0.025	0.004	0.002	Neg
388	-0.002	0.002	0.003	-0.001	Neg
486	-0.337	0.549	0.07	0.007	Neg
490	-0.003	0.122	0.026	0.003	Neg
492	-0.214	0.129	0.025	0.011	Neg
536	-0.087	0.726	0.045	0.013	Neg
538	-0.014	0.028	0.003	0.002	Neg
645	-0.010	0.060	-0.051	-0.041	Neg
647	-1.576	0.283	0.179	0.006	DIVA
649	-0.093	0.383	0.008	0.001	Neg
651	0.003	0.036	0.010	0.000	Neg
653	-1.378	0.218	0.016	-0.013	Neg
756	-0.145	0.057	0.006	0.003	Neg
758	-0.16	0.098	-0.002	0.003	Neg
759	0.133	0.379	0.007	0.003	IV
760	-0.095	0.145	0	0	Neg
763	-0.203	0.077	0.058	0.051	Neg
836	-0.629	0.8	0.027	0.004	Neg
844	0.318	1.466	0.05	-0.014	IV
847	-0.2	1.854	0.336	0.087	DIVA
848	0.127	0.21	0.056	0.068	IV
849	0.261	0.435	0.029	0.005	IV
850	0.266	0.336	0.013	0.004	IV
851	0.25	0.418	0.027	0.001	IV
853	0.097	0.753	0.227	0.263	DIVA
855	0.109	0.432	0.044	0.007	IV
856	-0.067	0.402	0.03	0.02	Neg
919	0.155	0.233	0.007	0	IV
920	-0.042	0.178	0.005	0.003	Neg

921	0.04	0.097	0.007	0.002	Neg
925	-0.227	0.09	0.079	0.023	Neg
927	0.026	0.14	0.014	0.001	Neg
930	0.054	0.224	0.016	0.004	IV
981	-0.145	0.252	0.017	0.007	Neg
983	0.119	0.358	0.035	0.03	IV
985	0.055	0.445	0.016	0.002	IV
986	0.043	0.161	0.003	-0.011	Neg
988	0.012	0.038	0.01	0.004	Neg
990	0.203	0.424	0.002	-0.011	IV

En color se encuentran destacados los animales que presentaron la condición de ser positivos de PPD b (Bov-Av > 0,05) y negativos a DIVA (PC-EC-NIL < 0,1 y Rv3615-Nil < 0,1). Neg: Negativos. IV: Interferencia vacunal. DIVA: Positivos a *M. bovis* por la prueba diagnóstica DIVA.

Tabla 4: Individuos no vacunados a los seis meses post-vacunación.

ID	6 MESES				Interpretación
	Bov-Av	Bov-Nil	PC-EC-Nil	Rv3615-Nil	
129	0.021	0.073	0.035	0.004	Neg
130	0.009	0.023	0.011	0.008	Neg
132	0.002	0.009	0.014	0.009	Neg
133	0.007	0.026	0.02	0.039	Neg
196			ELIMINADA		
200	-0.06	0.107	-0.005	-0.004	Neg
201	-0.156	0.163	0.004	0.027	Neg
202			ELIMINADA		
259	-0.225	0.382	0.031	-0.003	Neg
261			ELIMINADA		
263	-0.881	0.158	0.034	-0.004	Neg
332	-0.032	0.054	0.078	0.033	Neg
384	-0.017	-0.004	-0.014	-0.011	Neg
386	-0.009	0.000	-0.006	-0.006	Neg
390	-0.004	0.011	0.000	-0.003	Neg
493	-0.113	0.026	0.004	-0.002	Neg
533	0.006	0.035	0.008	0.002	Neg
535	-0.032	0.049	0.008	0.009	Neg
537	-0.230	0.137	0.004	-0.002	Neg
646	-0.006	0.031	0.009	0.004	Neg
648	-0.041	0.003	-0.026	-0.033	Neg
650	-0.125	-0.037	-0.087	-0.100	Neg
652	0.007	0.038	0.003	0.038	Neg
755	0.091	0.373	0.046	0.021	Pos

757	0.008	0.018	0	0	Neg
761	-0.01	0.045	0.012	0.007	Neg
762	-0.048	0.053	-0.007	-0.007	Neg
764	0.206	0.986	0.271	0.011	DIVA
837	-0.793	0.626	0.034	0.043	Neg
840	0.063	1.637	0.032	-0.02	Pos
843			ELIMINADA		
845	-0.234	0.614	0.03	0.153	DIVA
846	-0.135	0.292	0.041	-0.029	Neg
854	0.006	0.091	0.013	0.002	Neg
858			ELIMINADA		
859	0.112	0.369	0.023	0.003	Pos
916	0.003	0.058	0.013	0	Neg
918	0.012	0.138	0.008	0.003	Neg
922	-0.042	0.046	0.005	0.002	Neg
923	0.006	0.035	0.002	0.005	Neg
924	-0.128	0.041	0.014	0.016	Neg
926	-0.409	0.399	0.009	0.004	Neg
928	0.009	0.024	0.001	0.003	Neg
982	0.3	0.33	0.028	0.024	Pos
984			ELIMINADA		
987	0.005	0.005	-0.003	-0.002	Neg
989			ELIMINADA		
991	0.324	0.366	0.011	0	Pos

En color se encuentran destacados los animales que presentaron la condición de ser positivos de PPD b ($Bov-Av > 0,05$) y negativos a DIVA ($PC-EC-NIL < 0,1$ y $Rv3615-Nil < 0,1$). Se señalan, también, las vaquillas que fueron eliminadas del predio por ser positivas a tuberculosis bovina. Neg: Negativos. Pos: Positivos a *M. bovis* según la prueba diagnóstica tradicional (PPD b). DIVA: Positivos a *M. bovis* según la prueba diagnóstica DIVA.

Diferencias entre 3 y 6 meses post-vacunación

También se evaluó la presencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos momentos post vacuna. Para eso, se tomó una variable cualitativa, que es la cantidad de individuos que presentaron o no presentaron interferencia vacunal en alguno de los dos tiempos. Y una variable cuantitativa, la cual corresponde a los valores de densidad óptica obtenidos por el espectrofotómetro, que representan de forma cuantitativa la reacción de la muestra ante los antígenos. Es decir, cuánto INF- γ se liberó ante la estimulación con los respectivos antígenos.

Variable cualitativa

Aquí se consideraron solamente los animales que fueron vacunados, enfrentando los individuos que presentaron condición de interferencia, y los que no la presentaron en cada momento del estudio (Anexo 3). Con esta información, se construyó la Tabla 5. Al hacer el cálculo correspondiente, no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre la cantidad de vaquillas que demostraron interferencia vacunal a los tres meses y a los seis meses después de la vacunación.

Tabla 5: Tabla de contingencia de 2x2 para Prueba de McNemar. Contrastando individuos con y sin condición de interferencia vacunal a ambos tiempos.

		6 meses		
		Sí	No	Total
3 meses	Sí	2	8	10
	No	12	34	46
	Total	14	42	56

Sí: Presenta la condición de Interferencia vacunal en el diagnóstico. No: No presenta la condición de Interferencia vacunal en el diagnóstico.

Para el análisis de concordancia se utilizaron los datos del Anexo 3, se construyó la Tabla 6a. Al hacer el cálculo se obtuvo un K de -0,05, resultado que, al llevarlo a la Tabla 6b, indica un grado de acuerdo “sin acuerdo”, es decir, que no hay concordancia entre los individuos que presentan interferencia a ambos tiempos.

Tabla 6a: Tabla de contingencia para Índice Kappa (K). Enfrentando los individuos que presentaron y no presentaron la condición de interferencia en cada tiempo.

		6 meses		
		Sí	No	Total
3 meses	Sí	2	8	10
	No	12	34	46
	Total	14	42	56

Sí: Presenta la condición de Interferencia vacunal en el diagnóstico. No: No presenta la condición de Interferencia vacunal en el diagnóstico

Tabla 6b: Tabla de grado de acuerdo para el Índice Kappa de Concordancia (Molinero, 2011)

Kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0 – 0,2	Insignificante
0,2 – 0,4	Bajo
0,4 – 0,6	Moderado
0,6 – 0,8	Bueno
0,8 - 1	Muy bueno

Variable cuantitativa

Se hizo una comparación entre los resultados de densidad óptica que se obtuvieron al analizar la reacción ante los antígenos (Anexo 4), dentro de cada momento y una comparación entre los mismos antígenos entre tiempos. En el primer caso (Tabla 7a) existe una diferencia estadísticamente significativa entre la tuberculina bovina (PPD b) y los antígenos DIVA, independiente del mes. Al comparar entre los antígenos DIVA, en cambio, a los tres meses después de la vacunación no existe diferencia alguna, pero a los seis meses se destaca una diferencia estadísticamente significativa. En el segundo caso (Tabla 7b), al hacer la comparación de los antígenos entre tiempos, no existe diferencia significativa.

Tabla 7a: Comparación entre antígenos según tiempo, utilizando la prueba de T de Student.

3 MESES			
Obs (1)	Obs (2)	N	p-valor
PPD b	ESAT-6/CFP-10	56	0,000000023
PPD b	RV3615c	56	0,000000016
ESAT-6/CFP-10	RV3615c	56	0,08
6 MESES			
Obs (1)	Obs (2)	N	p-valor
PPD b	ESAT-6/CFP-10	56	0,000000063
PPD b	RV3615c	56	0,000000047
ESAT-6/CFP-10	RV3615c	56	0,00043

Obs: Observación. N: Número de individuos

Tabla 7b: Comparación entre antígenos entre tiempos, utilizando la prueba de T de Student.

3 meses	6 meses	N	p-valor
PPD b	PPD b	56	0.14856
ESAT-6/CFP-10	ESAT-6/CFP-10	56	0.24683
RV3615c	RV3615c	56	0.49430

N: Número de individuos

DISCUSIÓN

La interferencia vacunal evaluada en este estudio se relaciona con las características antigénicas de la cepa BCG y la cepa patógena de *M. bovis*. La principal diferencia entre ambas radica en la ausencia de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 por parte de la cepa vacunal, debido a que son proteínas localizadas en la región RD1 de *M. bovis*, que producto de mutaciones se eliminó del genoma de todas las cepas BCG (Mahairas *et al.*, 1996). Como la sensibilidad del conjunto de péptidos ESAT-6/CFP-10 para la prueba DIVA es inferior a la tuberculina (Vordermeier *et al.*, 2016), se identificó otro antígeno: Rv3615c. Este último fue reconocido en una proporción significativa (37%) de animales infectados no vacunados con BCG (Sidders *et al.*, 2008), y que además no fueron detectados por ESAT-6/CFP-10, lo que aumenta la sensibilidad de la prueba. El gen de Rv3615c está presente en el genoma de BCG, pero su secreción depende del producto de *esx1* (Millington *et al.*, 2011), codificado en la región RD1, que es eliminada de la cepa vacunal como se mencionó anteriormente. La ausencia de estos antígenos permite hacer la diferencia entre falso positivo y verdadero positivo a la infección por *M. bovis* al momento de hacer el diagnóstico. Es decir, en individuos vacunados se espera reacción ante el PPD b debido a la vacuna, mientras que, en individuos no vacunados e infectados, se espera una reacción ante el PPD b y los antígenos ESAT-6/CFP-10 y Rv3615c.

Al hacer la evaluación de la interferencia calculada en cada tiempo se evidencia un aumento en el porcentaje resultante. Tres meses después de la vacunación existe un 3,3% de interferencia, mientras que a los seis meses después de la vacunación hay un 12,8%. Al hacer el análisis mediante la prueba de McNemar resulta no ser una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 5). Esto tiene sentido ya que la diferencia en la cantidad de animales falsos positivos al diagnóstico es de solo cuatro animales. Sin embargo, también hay que considerar el resultado del Índice Kappa de concordancia, ya que indica que no hay un grado de acuerdo entre los animales falsos positivos al diagnóstico tradicional en cada momento (Tabla 6a). Es decir, no son las mismas vaquillas las que presentan la condición. Hay animales que en un principio no mostraban reacción alguna a la vacuna, pero tres meses después si lo hicieron.

Los resultados obtenidos en este estudio se asemejan con los obtenidos en las investigaciones de Berggren (1981), y Whelan *et al.* (2011). En el primero se evaluó la reacción a tuberculina en individuos vacunados y no vacunados con BCG. Se seleccionaron bovinos Zebú con edades de 3 meses hasta 12 años, a los cuales se les inoculó la vacuna BCG y se les realizó la Prueba Cervical Comparada a intervalos de seis meses. Seis meses post vacunación, resultó un 55% de animales reaccionantes; doce meses después de la vacunación, aumentó a un 93,4%; a los 18 meses después de la vacunación, la reacción disminuyó a 38,5%, y posteriormente fue disminuyendo hasta que a los dos años post vacunación la reacción a la tuberculina fue similar entre individuos vacunados y no vacunados. Algo similar ocurrió en el más reciente estudio de Whelan *et al.* (2011) en el que se vacunaron terneros en sus primeras seis semanas de edad, y se les hizo la Prueba Cervical Comparada a intervalos de tres meses. Tres meses después de la vacunación, el porcentaje de terneros positivos fue de 60%. Luego a los seis meses, fue un 80%. A los nueve meses hubo una caída brusca hasta un 0,8%.

Los resultados difieren con los obtenidos en la investigación de Moodie (1977), donde se vacunaron individuos Zebú con edades entre 3 meses y 13 años, con la vacuna BCG. Luego se les realizó la prueba de tuberculina cervical comparada a intervalos de tres meses. Moodie evidenció una disminución en el porcentaje de interferencia a cada tiempo, siendo a los tres meses de 55%, mientras que a los seis meses fue de 25,5%. Aquí hubo una disminución de casi 50%. La reacción disminuyó a 0,8% a los 15 meses, ausentándose a los 18 meses después de la vacunación.

Hay que tomar en cuenta que, en los estudios mencionados, se está evaluando la cantidad de individuos reaccionantes a la prueba cutánea, mientras que, en el presente trabajo, se evalúa la cantidad de individuos reaccionantes a un ensayo ELISA IFN- γ modificado, es decir, con antígenos DIVA añadidos. Esto genera una diferencia, ya que aquí se logra evaluar específicamente si la reacción ante la tuberculina es por la vacuna o por una real infección. Mientras que, en los estudios anteriormente mencionados, se consideran todos los “positivos” como reaccionantes a la vacuna. Es importante destacar eso, ya que dentro de los individuos que tienen una Prueba Cervical “positiva”, puede existir una real infección que altere el resultado. También es relevante mencionar que en los estudios de

Moodie (1977) y Berggren (1981) se utilizó la cepa Glaxo 1077, mientras que en el estudio de Whelan *et al.* (2011) se utilizó la cepa Danesa 1331, y en el presente trabajo se utilizó la cepa Sofía o cepa Rusa. Un último punto importante para destacar, son las diferentes dosis que se utilizaron en cada estudio: Moodie (1977) y Berggren (1981) utilizaron 2 ml de vacuna, lo que corresponde a 8 a 26×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias). En el estudio de Whelan *et al.* (2011) se utilizaron dosis de 0,5 ml, con 10^6 UFC. Y, finalmente en el presente estudio, se utilizó una dosis de 0,1 ml, con 8 a 20×10^5 UFC.

Al analizar los resultados dados por la prueba T de Student dentro de ambos tiempos (tres y seis meses), es esperable que exista diferencia significativa entre los antígenos PPD b y DIVA, ya que refleja una mayor reacción por parte de la tuberculina bovina ante la vacuna. Por otro lado, al momento de evaluar los antígenos DIVA en el segundo tiempo, es decir, a los seis meses después de la vacuna, también resulta en una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 7a). Esto puede deberse a que uno de los antígenos es más sensible que el otro. En efecto, en la investigación de Sidders, *et al.* (2008) se describe que el uso de Rv3615c en combinación con ESAT-6/CFP-10 tiene el potencial de aumentar de forma significativa la sensibilidad diagnóstica. Aunque los mismos autores señalan que se requiere un ensayo más largo para confirmar eso. Sin embargo, en el presente trabajo al hacer la comparación de los promedios de densidad óptica para los antígenos DIVA, se ve que el promedio mayor es por parte del cóctel PC-EC®. Esto por sí solo no es concluyente, por lo que se necesita un estudio más exhaustivo para evaluar la sensibilidad de cada antígeno DIVA para el diagnóstico. Al hacer la comparación entre los antígenos a cada tiempo, se ve que no hay diferencias ($p > 0,05$) entre los promedios de densidad óptica calculados, por lo tanto, la inmunogenicidad se mantiene constante en el intervalo de tres meses (Tabla 7b).

CONCLUSIÓN

En resumen, en este estudio se ha demostrado que en los primeros meses después de la vacunación con la cepa *M. bovis* BCG, existe una reacción inmune en el individuo que se confunde con la infección por tuberculosis, mediante el método tradicional. A esto le denominamos “Interferencia vacunal”. Haciendo el análisis retrospectivo con relación a los objetivos de este trabajo, se puede concluir que en los primeros seis meses después de inoculada la vacuna, hay un aumento de los individuos reaccionantes a la tuberculina bovina. Lo que se evidencia al momento de evaluar la reacción de forma cuantitativa con las lecturas del espectrofotómetro. Esto, según las investigaciones contrastadas, iría disminuyendo hasta aproximadamente los dos años después de la vacunación, por lo que sería ideal hacerles el seguimiento a los animales del estudio para evaluar la progresión de la interferencia.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sumados a los estudios anteriores, permiten concluir que se hace necesario utilizar una prueba complementaria para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado, en este caso, la prueba DIVA, durante los primeros meses después de vacunar con la cepa *M. bovis* BCG.

BIBLIOGRAFÍA

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. 2004. Inmunidad frente a los microbios. **In:** Inmunología celular y molecular. Elsevier. Madrid, España. p. 354.

BERGGREN, S. 1981. Field experiment with BCG vaccine in Malawi. *Br. Vet. J.* 137(1): 88-94.

BUDDLE, B.; DE LISLE, G.; PFEFFER, A.; ALDWELL, F. 1995a. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 13(12): 1123-1130.

BUDDLE, B.; KEEN, D.; THOMSON, A.; JOWETT, G.; McCARTHY, A; HESLOP, J.; DELISLE, W.; STANFORD, J.; ALDWELL, F. 1995b. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. *Res. Vet. Sci.* 59(1): 10-16.

BUDDLE, B.; PARLANE, N.; KEEN, D.; ALDWELL, F.; POLLOCK, J.; LIGHTBODY, K.; ANDERSEN, P. 1999. Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6(1): 1-5.

BUDDLE, D.; WARDS, B.; ALDWELL, F.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; 2002. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20(7-8): 1126-1133.

BUDDLE, B.; WEDLOCK, D.; PARLANE, N.; CORNER, L.; DE LISLE, G.; SKINNER, M. 2003. Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by single vaccination. *Infect. Immun.* 71(11): 6411-6419.

CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2015. Resolución N° 2845 Modificación Resolución N° 2762 Establece control obligatorio y medidas sanitarias para el control y erradicación de tuberculosis bovina. 29-04-2015.

CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2014. Decreto N° 389 Establece enfermedades de declaración obligatoria para la aplicación de medidas sanitarias y deroga decretos que indica. 21-11-2014.

COLLINS, J. 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.* 112(2-4): 369-381.

- CORNER, L.; NI BHUACHALLA, D.; GORMLEY, E.; MORE, S.** 2014. The role of badgers in the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection (tuberculosis) in cattle in the United Kingdom and the Republic of Ireland: current perspectives on control strategies. *Vet. Med. Res. Rep.* 6: 27-38.
- DARGATZ, D.; GARRY, F.; TRAUB-DARGATZ, J.** 2002. An introduction to biosecurity of cattle operations. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 18: 1-5.
- DEPARTMENT FOR ENVIRONMENT FOOD & RURAL AFFAIRS.** 2015. 2010 to 2015 government policy: bovine tuberculosis (bovine TB). [en línea] <<https://www.gov.uk/government/publications/2010-to-2015-government-policy-bovine-tuberculosis-bovine-tb/2010-to-2015-government-policy-bovine-tuberculosis-bovine-tb>> [consulta: 08-06-2017]
- DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H.** 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2° Eds. VER Inc. Canadá. 865 p.
- EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2013. Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. *EFSA Journal* 11(12): 3475-3509.
- FAO.** s.f. Tuberculosis. [en línea]. **In:** Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. <<http://www.fao.org/3/a-i2811s/i2811s01.pdf>> [consulta: 01-06-2017].
- GODOY, M.; OROZCO, L.; HERNÁNDEZ, C.; DA MATA, O.; DE WAARD, J.; GONZÁLEZ, S.** 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: Comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 28(2): 1315-2556.
- GRANGE J.** 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2): 71-77.
- HOPE, J.; THOM, M.; VILLARREAL-RAMOS, B.; VORDERMEIER, H.; HEWINSON, R.; HOWARD, C.** 2005a. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immunol.* 139(1): 48-56.
- HOPE, J.; THOM, M.; VILLARREAL-RAMOS, B.; VORDERMEIER, H.; HEWINSON, R.; HOWARD, C.** 2005b. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141(3): 432-439

- JONES, G.; HEWINSON, R.; VORDERMEIER, H.** 2010. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin. Vaccine Immunol.*, 17: 1344–1348.
- MAHAIRAS, G.; SABO, P.; HINCKEY, M.; SINGH, D.; STOVER, C.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178(5): 1274-1282.
- MILLINGTON, K.; FORTUNE, S.; LOW, L.; GARCES, A.; HINGLEY, S.; WICKREMASINGHE, M.; KON, O.; LALVANI, A.** 2011. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PNAS* 108(14): 5730-5735.
- MOLINERO, L.** 2011. Medidas de concordancia para variables cualitativas. [en línea]. <<http://www.seh-lelha.org/pdf/concor2.pdf>> [consulta: 07-10-2018]
- MOODIE, B.** 1977. Tuberculin Reactions in BCG-Vaccinated Cattle. *Br. Vet. J.* Vol. 133: 642-645.
- OIE.** 2016. Lista de países por situación sanitaria de la enfermedad. [en línea] <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist> [consulta: 08-06-2017]
- PALMER, M.; WATERS, W.; WHIPPLE, D.** 2002. Aerosol delivery of virulent *Mycobacterium bovis* to cattle. *Tuberculosis* 82(6): 275-282.
- QUEZADA, N.; RETAMAL, P.** 2010. La tuberculosis bovina: El desafío sanitario de Chile. *TecnoVet.* Vol. 16(1).
- REYES, P.** 2012. Tuberculosis Bovinas: La importancia de los factores de riesgo en la introducción y exposición-diseminación de *M. bovis* en el rebaño bovino. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69 p.
- RODRÍGUEZ, G.** 2006. **In:** Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2° ed. [en línea] <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>> [consulta: 25-05-2017]
- SAG.** s.f. Tuberculosis Bovina. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/tuberculosis-bovina-tb>> [consulta: 16-06-2017]
- SAG.** 2015. Lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG. [en línea] <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/enfermedades_denuncia_obligatoria_sag_8-6-2015.pdf> [consulta: 16-06-2017]

- SAG.** 2016. Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/tuberculosis-bovina-tb>> [consulta: 19-06-2017]
- SIDDERS, B.; PIRSON, C.; HOGARTH, P.; HEWINSON, G.; STOKER, N.; VORDERMEIER, H.; EWER, K.** 2008. Screening of Highly Expressed Mycobacterial Genes Identifies Rv3615c as Useful Differential Diagnostic Antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Infect Immun.* Vol. 76(9): 3932-3939.
- THOEN, C.; LOBUE, P.; ENARSON, D.; KANEENE, J.; DE KANTOR, I.** 2009. Tuberculosis: A re-emerging disease of animals and humans. *Vet. Ital.*, 45(1): 135-181.
- THOM, M.; McAULAY, M.; VORDERMEIER, H.; CLIFFORD, D.; HEWINSON, R.; VILLARREAL-RAMOS, B.; HOPE, J.** 2012. Duration of immunity against *Mycobacterium bovis* following neonatal vaccination with bacillus Calmette-Guerin Danish: significant protection against infection at 12, but not 24. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(8): 1254-1260.
- TORGERSON, P.; TORGERSON, D.** 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends Microbiol.* 18(2): 67-72.
- VORDERMEIER, H.; CHAMBERS, M.; COCKLE, P.; WHELAN, A.; SIMMONS, J.; HEWINSON, R.** 2002. Correlation of ESAR-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 70(6): 3026-3032.
- VORDERMEIER, H.; COCKLE, P.; WHELAN, A.; RHODES, S.; PALMER, N.; BAKKER, D.; HEWINSON, R.** 1999. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab.* 6(5): 675-682.
- VORDERMEIER, M.; GORDON, S.; HEWINSON, A.** 2009. Antigen mining to define *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected animals: A VLA perspective. *Transbound. Emerg. Dis.*, 56: 240-247.
- VORDERMEIER, M.; GORDON, S.; HEWINSON, R.** 2011a. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Vet. Microbiol.*, 151: 8-13.

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

VORDERMEIER, M.; JONES, G.; WHELAN, A. 2011b. DIVA reagents for bovine tuberculosis vaccines in cattle. *Expert. Rev. Vacc.*, 10: 1083–1091.

WEDLOCK, D.; ALDWELL, F.; VORDEMEIER, H.; HEWINSON, R.; BUDDLE, B. 2011. Protection against bovine tuberculosis induced by oral vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* BCG is not enhanced by co-administration of mycobacterial protein vaccines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144(3-4): 220-227.

WHELAN, A.; COAD, M.; UPADHYAY, B.; CLIFFORD, D.; HEWINSON, R.; VORDERMEIER, H. 2011. Lack of correlation between BCG-induced tuberculin skin test sensitization and protective immunity in cattle. *Vaccine*. Vol. 29(33): 5453-5358.

ANEXOS

Anexo 1. Disposición de los antígenos y componentes para el cultivo celular y el posterior ensayo ELISA BOVIGAM. CP: Control positivo; CN: Control negativo; CC: Control de conjugado; PPDb: Derivado protéico purificado bovino/Tuberculina Bovina; PPDa: Derivado protéico purificado aviar/Tuberculina Aviar; PC-EC: Cóctel de péptidos; Rv3615: Cóctel de péptidos UK; NIL: PBS/Tampón Solución Fosfato Salina; PW: Mitógeno Pokeweed.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP (+)	PPDb A1	PPDb A2	PPDb A3	PPDb A4	PPDb A5	PPDb A6	PPDb A7	PPDb A8	PPDb A9	PPDb A10	PPDb A11
B	CP (+)	PPDa A1	PPDa A2	PPDa A3	PPDa A4	PPDa A5	PPDa A6	PPDa A7	PPDa A8	PPDa A9	PPDa A10	PPDa A11
C	CN (-)	PC-EC A1	PC-EC A2	PC-EC A3	PC-EC A4	PC-EC A5	PC-EC A6	PC-EC A7	PC-EC A8	PC-EC A9	PC-EC A10	PC-EC A11
D	CN (-)	Rv3615 A1	Rv3615 A2	Rv3615 A3	Rv3615 A4	Rv3615 A5	Rv3615 A6	Rv3615 A7	Rv3615 A8	Rv3615 A9	Rv3615 A10	Rv3615 A11
E	CC	Nil A1	Nil A2	Nil A3	Nil A4	Nil A5	Nil A6	Nil A7	Nil A8	Nil A9	Nil A10	Nil A11
F	CC	PW A1	PW A2	PW A3	PW A4	PW A5	PW A6	PW A7	PW A8	PW A9	PW A10	PW A11
G	PPDb A12	PPDa A12	PC-EC A12	Rv3615 A12	Nil A12	PW A12	PPDb A13	PPDa A13	PC-EC A13	Rv3615 A13	Nil A13	PW A13
H	PPDb A14	PPDa A14	PC-EC A14	Rv3615 A14	Nil A14	PW A14	PPDb A15	PPDa A15	PC-EC A15	Rv3615 A15	Nil A15	PW A15

Anexo 2. Detalle de los individuos incluidos dentro del estudio. Identificados con un número interno, se señala el diagnóstico obtenido mediante ensayo ELISA IFN- γ a los tres y seis meses después de la vacunación. Neg: Negativo. IV: Interferencia vacunal. DIVA: Positivos a *M. bovis* por la prueba DIVA. Pos: Positivo a *M. bovis* por diagnóstico tradicional. En blanco: Animal eliminado del predio.

a. Animales Vacunados

ID	3 meses	6 meses	ID	3 meses	6 meses
	Interpretación	Interpretación		Interpretación	Interpretación
118	Neg	Neg	653	Neg	Neg
119	Neg	IV	756	IV	Neg
120	IV	Neg	758	Neg	Neg
121	Neg	Neg	759	Neg	IV
122	Neg	Neg	760	IV	Neg
123	Neg	Neg	763	IV	Neg
126	Neg	Neg	836	Neg	Neg
197	Neg	Neg	844	IV	IV
198	IV	Neg	847	Neg	DIVA
199	Neg	IV	848	Neg	IV
203	IV	Neg	849	IV	IV
258	IV	Neg	850	Neg	IV
260	Neg	Neg	851	Neg	IV
262	Neg	Neg	853	Neg	DIVA
331	Neg	Neg	855	Neg	IV
333	Neg	Neg	856	Neg	Neg
383	Neg	Neg	919	Neg	IV
387	Neg	Neg	920	Neg	Neg
388	IV	Neg	921	Neg	Neg
486	Neg	Neg	925	Neg	Neg
490	Neg	Neg	927	Neg	Neg
492	Neg	Neg	930	Neg	IV
536	Neg	Neg	981	Neg	Neg
538	Neg	Neg	983	Neg	IV
645	Neg	Neg	985	Neg	IV
647	Neg	DIVA	986	Neg	Neg
649	Neg	Neg	988	Neg	Neg
651	Neg	Neg	990	Neg	IV

b. Animales no vacunados

ID	3 meses	6 meses	ID	3 meses	6 meses
	Interpret	Interpret		Interpret	Interpret
129	Neg	Neg	757	Neg	Neg
130	Neg	Neg	761	Neg	Neg
132	Neg	Neg	762	Neg	Neg
133	Neg	Neg	764	Neg	DIVA
196	Pos		837	Neg	Neg
200	Neg	Neg	840	Neg	Pos
201	Neg	Neg	843	Pos	
202	Pos		845	Neg	DIVA
259	Neg	Neg	846	Neg	Neg
261	Pos		854	Neg	Neg
263	Neg	Neg	858	Pos	
332	Neg	Neg	859	Neg	Pos
384	Neg	Neg	916	Neg	Neg
386	Neg	Neg	918	Neg	Neg
390	Neg	Neg	922	Neg	Neg
493	Neg	Neg	923	Neg	Neg
533	Neg	Neg	924	Neg	Neg
535	Neg	Neg	926	Neg	Neg
537	Neg	Neg	928	Neg	Neg
646	Neg	Neg	982	Neg	Pos
648	Neg	Neg	984	Pos	
650	Neg	Neg	987	Neg	Neg
652	Neg	Neg	989	Pos	
755	Neg	Pos	991	Neg	Pos

Anexo 3. Condición de cada individuo según momento al que fue evaluado. Sí: Presenta condición de interferencia en el diagnóstico debido a la vacuna / No: No presenta la condición de interferencia en el diagnóstico debido a la vacuna.

ID	INTERFERENCIA		ID	INTERFERENCIA	
	3 meses	6 meses		3 meses	6 meses
118	No	No	653	No	No
119	No	Sí	756	Sí	No
120	Sí	No	758	No	No
121	No	No	759	No	Sí
122	No	No	760	Sí	No
123	No	No	763	Sí	No
126	No	No	836	No	No
197	No	No	844	Sí	Sí
198	Sí	No	847	No	No
199	No	Sí	848	No	Sí
203	Sí	No	849	Sí	Sí
258	Sí	No	850	No	Sí
260	No	No	851	No	Sí
262	No	No	853	No	No
331	No	No	855	No	Sí
333	No	No	856	No	No
383	No	No	919	No	Sí
387	No	No	920	No	No
388	Sí	No	921	No	No
486	No	No	925	No	No
490	No	No	927	No	No
492	No	No	930	No	Sí
536	No	No	981	No	No
538	No	No	983	No	Sí
645	No	No	985	No	Sí
647	No	No	986	No	No
649	No	No	988	No	No
651	No	No	990	No	Sí

Anexo 4. Detalle de resultados de densidad óptica por antígeno/animal/mes. Abajo, el promedio de densidad óptica por antígeno/mes.

ID	3 MESES			6 MESES		
	PPD B	ESAT-6/CFP-10	RV3615c	PPD B	ESAT-6/CFP-10	RV3615c
118	0.418	0.023	0.03	0.034	0.023	0.019
119	0.236	0.131	0.093	0.282	0.115	0.083
120	0.629	0.054	0.05	0.465	0.374	0.329
121	0.222	0.031	0.02	0.096	0.045	0.039
122	0.651	0.029	0.028	0.116	0.044	0.037
123	0.031	0.016	0.019	0.047	0.038	0.04
126	0.249	0.06	0.034	0.059	0.056	0.05
197	1.241	0.155	0.085	0.092	0.045	0.041
198	0.406	0.06	0.052	0.361	0.054	0.048
199	3.071	0.058	0.042	1.76	0.078	0.038
203	1.217	0.143	0.125	0.207	0.055	0.031
258	0.404	0.04	0.045	0.112	0.027	0.025
260	0.124	0.042	0.04	0.157	0.046	0.044
262	0.759	0.069	0.154	0.056	0.034	0.033
331	0.101	0.048	0.027	0.13	0.115	0.083
333	0.665	0.06	0.032	0.349	0.1	0.08
383	0.029	0.031	0.031	0.261	0.056	0.025
387	0.092	0.031	0.037	0.036	0.015	0.013
388	0.152	0.069	0.038	0.017	0.018	0.014
486	0.179	0.081	0.084	0.639	0.16	0.097
490	0.795	0.028	0.026	0.172	0.076	0.053
492	0.321	0.047	0.048	0.202	0.098	0.084
536	0.843	0.068	0.066	0.799	0.118	0.086
538	0.147	0.102	0.079	0.039	0.014	0.013
645	0.083	0.074	0.073	0.424	0.313	0.323

647	0.451	0.079	0.124	0.395	0.291	0.118
649	0.123	0.025	0.016	0.436	0.061	0.054
651	0.124	0.045	0.029	0.089	0.063	0.053
653	0.039	0.03	0.026	0.266	0.064	0.035
756	0.875	0.075	0.047	0.083	0.032	0.029
758	0.105	0.094	0.057	0.127	0.027	0.032
759	1.058	0.262	0.24	0.413	0.041	0.037
760	0.619	0.103	0.088	0.16	0.015	0.015
763	1.228	0.995	1.002	0.549	0.53	0.523
836	0.124	0.026	0.019	0.834	0.061	0.038
844	0.229	0.057	0.059	1.521	0.105	0.041
847	0.484	0.131	0.153	2.254	0.736	0.487
848	0.132	0.043	0.034	0.547	0.393	0.405
849	0.22	0.082	0.104	0.498	0.092	0.068
850	0.173	0.102	0.149	0.361	0.038	0.029
851	0.277	0.045	0.061	0.487	0.096	0.07
853	0.241	0.159	0.133	1.945	1.419	1.455
855	0.225	0.054	0.045	0.465	0.077	0.04
856	0.773	0.148	0.042	0.51	0.138	0.128
919	0.606	0.056	0.039	0.261	0.035	0.028
920	0.347	0.059	0.046	0.214	0.041	0.039
921	0.195	0.06	0.056	0.114	0.024	0.019
925	0.073	0.092	0.104	0.124	0.113	0.057
927	0.185	0.076	0.06	0.192	0.066	0.053
930	0.474	0.117	0.066	0.26	0.052	0.04
981	1.062	0.021	0.029	0.28	0.045	0.035
983	2.217	0.14	0.187	0.401	0.078	0.073
985	0.586	0.032	0.037	0.481	0.052	0.038
986	1.505	0.163	0.17	0.239	0.081	0.067

988	0.105	0.082	0.083	0.064	0.036	0.03
990	0.914	0.159	0.136	0.468	0.046	0.033
Promedio	0.51489286	0.092178571	0.085696429	0.39196429	0.126160714	0.105303571