



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

**EXPRESIÓN DE INTERFERÓN GAMMA BOVINO FRENTE A
ANTÍGENOS DE *MYCOBACTERIUM* SPP., EN TERNERAS ANTES Y
DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN CON CEPA *M. BOVIS* BCG**

Mathias Esteban Wistuba Flores

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA
Universidad de Chile

Financiamiento: Convenio SAG - FAVET

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2019



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

**EXPRESIÓN DE INTERFERÓN GAMMA BOVINO FRENTE A
ANTÍGENOS DE *MYCOBACTERIUM* SPP., EN TERNERAS ANTES Y
DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN CON CEPA *M. BOVIS* BCG**

Mathias Esteban Wistuba Flores

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

PROFESOR GUÍA: PEDRO ÁBALOS PINEDA
Universidad de Chile

Financiamiento: Convenio SAG - FAVET

Nota Final

Prof. Guía

Profesor Corrector

Profesor Corrector

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, gracias.

A mi madre, hasta luego.

Y a todos los niños... ¡Felicidades!

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar la presencia de interferón gamma (INF γ) bovino en terneras, frente a la estimulación de sangre entera con diferentes antígenos de *Mycobacterium* spp: PPD bovino, PPD aviar, ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c. Para ello, se tomaron muestras de sangre entera de terneras de hasta 30 días de edad para cuantificar los niveles de INF γ basales por medio de un ensayo de ELISA y que luego fueron vacunadas con una dosis efectiva de la vacuna viva BCG. Luego de un periodo de 6 meses, a los mismos individuos se les tomó una segunda muestra de sangre y se repitió el ensayo de ELISA, con el objetivo de cuantificar, una vez más, los niveles de INF γ y compararlos con los resultados anteriores. Un total de 219 terneras fueron consideradas, de las cuales a 121 se les administró la vacuna BCG y a 98 una solución placebo. Los resultados mostraron diferencias significativas en los niveles de INF γ medido para los antígenos PPD bovino y PPD aviar en el primer muestreo, tanto como para animales vacunados y el grupo control. Los animales vacunados mostraron valores de PPD bovino superiores a los del grupo sin vacuna, una vez pasado el periodo de 6 meses. Estos resultados sugieren que la vacunación con cepa BCG impacta en la secreción de INF γ bovino de terneras jóvenes hasta por lo menos 6 meses. Adicionalmente, se evidenciaron valores altos de PPD aviar basales en la población de terneras, sugiriendo una interferencia de micobacterias ambientales en la cuantificación de INF γ .

Palabras clave: Tuberculosis, Interferón gamma, Vacuna BCG

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the presence of bovine interferon gamma (INF γ) in calves, after a stimulation of whole blood with different antigens from the *Mycobacterium* spp: bovine PPD, avian PPD, ESAT-6, CFP-10 and Rv3615c. Whole blood samples were taken from calves up to 30 days of age to quantify baseline INF γ levels by means of an ELISA assay and vaccination of the animals with effective dose of the live BCG vaccine. After a period of 6 months, the same calves were taken a second blood sample and the ELISA test was repeated, with the aim of quantifying, once again, the INF γ levels and comparing them with the previous results. A total of 219 calves were considered, of which 121 were given the BCG vaccine and 98 a placebo solution. The results showed significant differences in the levels of INF γ measured for the bovine PPD antigens, avian PPD and the Pokeweed in the first sampling, as for both vaccinated animals and the control group. Once the period of 6 months had passed, the vaccinated animals showed values of bovine PPD higher than those of the group without a BCG vaccination. These results suggest that vaccination with BCG strain impacts the bovine INF γ secretion from young calves for at least 6 months. Additionally, high values of baseline avian PPD were evident in the population of calves, suggesting an interference of environmental mycobacteria in the quantification of INF γ .

Key words: Tuberculosis, Interferon gamma, BCG Vaccine

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas y responsable tanto de epidemias descritas en poblaciones humanas, como de la generación de conocimiento aplicable a las variadas ramas de la medicina contemporánea (Daniel, 2006). Se expresa como una enfermedad bacteriana de carácter crónico en hospederos mamíferos, producida por una amplia variedad de agentes patógenos específicos, relacionados filogenéticamente, constituyendo en su conjunto el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Romha *et al.*, 2018). Las micobacterias que constituyen dicho complejo exhiben tropismos particulares para diferentes hospederos, destacando *M. caprae*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* y *M. orygis* como patógenos de elección en algunos países al momento de evaluar lesiones granulomatosas en distintos tipos de ganado (Vordermeier *et al.*, 2016). No obstante, las lesiones producidas por estos agentes en particular son de rara ocurrencia en la especie bovina. La bacteria más frecuentemente asociada a cuadros de tuberculosis es *Mycobacterium bovis*, el patógeno objetivo de la mayoría de las medidas de manejo, prevención y tratamiento en los países con mayor desarrollo en políticas sanitarias (Vordermeier *et al.*, 2016; Romha *et al.*, 2018).

Los cuadros infecciosos desencadenados por *M. bovis* son los más relevantes desde un punto de vista epidemiológico, destacando su alta patogenicidad en especies de animales de abasto y por ser una de las principales micobacterias responsables de causar brotes de tuberculosis humana en poblaciones de alto riesgo (Romha *et al.*, 2018). La naturaleza zoonótica de la enfermedad cobra una particular importancia histórica, provocando los mayores números de muertes adultas en países con menores condiciones de desarrollo, con una estimación de 1,45 millones de fallecidos y 8,7 millones de enfermos registrados el año 2011 (Ghodbane y Drancourt, 2013). Esto se favorece gracias a las características de las poblaciones humanas mayormente afectadas, tales como situaciones de pobreza, sobrepoblación y una vulnerabilidad tanto económica como social, siendo ésta una infección oportunista particularmente peligrosa en conjunto con casos activos de VIH (Perrin, 2015). Además, el consumo de leche no pasteurizada y el contacto directo con animales enfermos aumentan el riesgo en contraer la enfermedad por parte de los

empleados de las granjas, contribuyendo a significativas pérdidas económicas y reafirmando el peligro en las zonas más vulnerables (Vordemeier *et al.*, 2016).

La tuberculosis bovina se encuentra dentro de las 14 enfermedades con mayor impacto económico dentro de la producción animal de África y el sur de Asia, alcanzando éstas los 300 millones de dólares anuales. Por otro lado, a un nivel global, el impacto económico de la enfermedad alcanza los 3 billones de dólares, con más de 50 millones anuales de bovinos infectados en el conjunto de plantales (Waters *et al.*, 2012). La tuberculosis se expresa en los bovinos como una enfermedad de carácter crónico y debilitante, evidenciándose a través una signología clínica que repercute directamente en valores productivos y en la salud de los rebaños. Sus costos se relacionan a una disminución en la producción láctea, un aumento en los recursos humanos utilizados en el control de movimiento animal, la implementación de técnicas diagnósticas, la eliminación de animales enfermos de los plantales y restricciones comerciales entre países. (Vordermeier, 2016).

La manifestación clínica depende de las vías de ingreso al organismo, usualmente provocando granulomas como consecuencia de un proceso inflamatorio caseoso-necrotizante que afecta de manera más prevalente nasofaringe, pulmones y linfonodos aledaños a estas estructuras (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006; Domingo *et al.*, 2014). La inhalación corresponde a la ruta más frecuente de ingreso al organismo en de los plantales infectados, generando lesiones en linfonodos retrofaríngeos mediales, mediastinales y traqueobronquiales. Los linfonodos mesentéricos pueden presentar de igual manera lesiones por consumo de alimento contaminado con altas cargas bacterianas (OIE, 2016). La infección suele ser subclínica por meses, hasta que factores estresantes, en conjunto al daño de los órganos mencionados, desencadenen la signología clínica de la enfermedad. Bajo estas condiciones se presentan signos clínicos de carácter inespecíficos como debilidad física, anorexia, disnea, tos y diarrea intermitente, en conjunto a un aumento de tamaño de los linfonodos abordables en el examen físico (Domingo *et al.*, 2014).

En respuesta a lo anterior, los gobiernos han instaurado programas de control y prevención en sus respectivos territorios pero que se han visto obstaculizados al momento de minimizar los daños dentro del comercio. Entre estos obstáculos se describe el contacto de animales domésticos mantenidos en las granjas y con contacto con poblaciones de vida

silvestre en zonas aledañas, aumentando, no sólo poniendo en riesgo ambas poblaciones involucradas, sino también elevando el potencial de mantener latente la enfermedad en el ambiente productivo cuando el contacto entre dichas poblaciones se favorece (Rodríguez-Campos *et al.*, 2014; Vordemeier *et al.*, 2016). Éstas poblaciones silvestres actúan como hospederos del agente patógeno donde la infección persiste a través de transmisiones intra especies, facilitando el proceso de reinfección (Buddle *et al.*, 2011). En este contexto, algunos de los reservorios más importantes en territorios europeos son el tejón (*Meles meles*) en Irlanda y Reino Unido, el oposum cola de cepillo ó zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda y el jabalí (*Sus scrofa*) en España (Waters *et al.*, 2012).

La situación sanitaria en países desarrollados, como algunos pertenecientes a la Unión Europea, deriva a una disminución de la incidencia a nivel predial gracias a los programas de control obligatorios, cuyos gobiernos han impuesto en su industria láctea (OIE, 2016). El chequeo de animales, la restricción del movimiento de éstos y la eliminación de individuos infectados en el sistema productivo forman parte de los mecanismos por el cual se ha controlado la presencia de la tuberculosis en estos sectores (Thoen *et al.*, 2009). En el caso de países en vías de desarrollo, estas prácticas se ven deterioradas por la inaccesibilidad de la información y de la educación formal en zonas rurales, en conjunto con la incapacidad económica a modo de compensación monetaria a los productores (Reyes, 2012).

El año 2011 comenzó a operar en Chile el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina, con el fin de poder establecer lineamientos para instaurar medidas sanitarias contra la enfermedad en la población bovina nacional. Este plan divide estratégicamente el país en distintas zonas epidemiológicas: zona de erradicación norte (Región de Arica-Parinacota, Tarapacá y Antofagasta), zona de erradicación sur (desde la Región de La Araucanía hasta Magallanes) y la zona de control (entre la Región Atacama y la Región del Biobío, exceptuando la Provincia de Arauco). Las medidas sanitarias a seguir dentro de cada plantel dependerán de la zona a la cuál éste se encuentre localizado (SAG, 2015). La gran mayoría de la masa ganadera dedicada a la industria láctea se localiza en la Zona de Erradicación sur, con mayor concentración en la Región de Los Lagos y de Los

Ríos (INE, 2007). Además, la Zona de Control destaca por la distribución de la población ganadera que se describen, con una presentación endémica con altas prevalencias prediales e intra-rebaños en la zona (Quezada y Retamal, 2010). Junto a esta segregación, la Región Metropolitana y del Maule presentan los valores de incidencia intra predial de tuberculosis bovina más altos de la zona de control (Rivera y Vega, 2014). El análisis del universo bovino realizados por el Servicio Agrícola y Ganadero, (2012), demostró que un 79,3% del número de bovinos sometidos a la prueba tuberculínica ano- caudal en predios de la Región Metropolitana respondieron de forma positiva, siendo la tasa de animales reactivos a la prueba más alta del país. Esta región también obtuvo la tasa de animales reactivos a la prueba tuberculínica cervical simple más alta, con un 17,59%. Adicionalmente, un estudio de incidencias acumuladas entre los años 2000 y 2014 realizado por Rivera y Vega, (2014), propone que el riesgo observado de contraer la infección en bovinos sobre 18 meses de edad triplica el riesgo esperado para el mismo evento en la Región Metropolitana.

El diagnóstico de la enfermedad en terreno cobra relevancia en este tipo de escenarios. Éste se realiza por medio de una inyección intradérmica de tuberculina o derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium* spp., con la intención de generar una reacción de hipersensibilidad tardía observable 72 horas después de su aplicación (OIE, 2016). Esta prueba cuenta con la capacidad de detectar, en una primera aproximación al rebaño, la presencia de *M. bovis* y diferenciarla de reacciones similares ocasionadas por *M. avium*, pudiendo esta última enmascarar el diagnóstico en terreno de *M. bovis* (OIE, 2016; Norby et al., 2004). La sensibilidad, tanto de la prueba a nivel cervical como caudal, se estima entre 63,2% hasta 100% mientras que la especificidad denota valores circulando entre 75,5% y 99%. Estos valores la convierten en una herramienta insuficiente si se aplica por sí sola en un programa de control y erradicación nacional, pero útil como complemento diagnóstico (De la Rúa-Domenech et al., 2006). Como técnicas de diagnóstico adicional y complementaria se adhieren pruebas de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para la detección de interferón *gamma* (ELISA-INF γ) bovino, citoquina secretada por los linfocitos T luego de una estimulación antigénica, siendo el PPD bovino y aviar en este caso, fundamentalmente considerada como una de los factores principales en la activación de macrófagos (Pollock et al., 2005). El diagnóstico de la enfermedad en lecherías chilenas se lleva a cabo por medio del ensayo de ELISA, con individuos por sobre 18 meses de edad

y como complemento a la prueba de tuberculina de campo (SAG, 2015). Se sustenta en la liberación de INF γ por parte de linfocitos sensibilizados en un periodo de incubación determinado con un antígeno de estimulación específico (PPD), tanto bovino como aviar, cuya presencia se detecta por medio de anticuerpos monoclonales para INF γ (OIE, 2016). No obstante, tanto la prueba de tuberculina como el ensayo ELISA INF γ tienen la desventaja de presentar una baja probabilidad de detectar ganado infectado en un estado de inmunosupresión, particularmente en un escenario donde se vea afectada la respuesta inmune celular (De la Rúa-Domenech *et al.*, 2006).

Una alternativa adicional para reducir el impacto de la tuberculosis bovina es la vacunación de bovinos con cepa *M. bovis* Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), utilizada actualmente en el humano (Ameni *et al.*, 2010). Su aplicación en el programa de control y erradicación de la tuberculosis bovina nacional puede generar interferencia en el diagnóstico de las pruebas recién mencionadas, basadas en la respuesta frente a antígenos PPD de *M. bovis* (Hope *et al.*, 2005). La sensibilización con la vacuna genera una respuesta positiva a la prueba cutánea hasta los seis meses posteriores a su aplicación. A su vez, los animales vacunados pueden volverse negativos a esta prueba nueve meses siguientes a la sensibilización, pero un porcentaje de animales responden positivamente hasta los dos años (EFSA, 2013). Para contrarrestar este fenómeno, se han puesto en marcha desarrollos de herramientas diagnósticas compatibles con la vacuna capaces de diferenciar entre la cepa BCG y las de campo. Esta metodología, denominada DIVA (*Differentiate Infected from Vaccinated Animals*), incorpora en la prueba de INF γ la estimulación con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, propios sólo de cepas de campo y ausentes en la cepa BCG, complementando la estimulación con PPD de *M. bovis* y *M. avium*. Esto se debe a la ausencia de algunas regiones específicas dentro del genoma propio de la cepa BCG, los cuales están relacionados a la síntesis de estos antígenos (Jones *et al.*, 2010a; Jones *et al.*, 2010b). Por lo tanto, esta combinación tiene el potencial de aumentar la sensibilidad diagnóstica sin reducir la especificidad en la población vacunada con cepa BCG (Vordermeier *et al.*, 2016).

Actualmente no existe mucha información sobre cómo la aplicación de la vacuna BCG puede influenciar la expresión de INF γ en terneras de temprana edad, particularmente en condiciones prediales y sometidas a la rutina propia de la industria lechera. Así, el objetivo

de este estudio es caracterizar la expresión de INF γ frente a la estimulación de sangre entera con diferentes antígenos de *Mycobacterium* spp. en terneras antes y después de la vacunación con la cepa *M. bovis* BCG, en predios lecheros con tuberculosis bovina de la RM de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El estudio consistió en la toma de muestras de sangre entera de terneras para cuantificar los niveles de INF γ basales por medio de un ensayo de ELISA y luego la vacunación de los animales con dosis efectiva de la vacuna viva BCG. Luego de un periodo de 6 meses, a los mismos individuos se les tomó una segunda muestra de sangre y se repitió el ensayo de ELISA, con el objetivo de cuantificar, una vez más, los niveles de INF γ y compararlos con los resultados anteriores. Para poder comparar los efectos de la vacuna BCG sobre la secreción de INF γ , la mitad de la población de terneras fue vacunada con la cepa BCG, mientras que las terneras restantes actuaron como grupo control y se les inoculó un placebo. Se trabajó con una población de terneras que formaban parte de 7 lecherías de las zonas de Melipilla y Talagante, ubicadas en la Región Metropolitana. El trabajo en terreno se realizó dentro de los establecimientos propios de cada lechería, con visitas mensuales entre los meses de abril y octubre del año 2017 donde se identificaron, muestrearon y vacunaron a todas las terneras nacidas vivas dentro de dicho periodo. Las terneras permanecieron bajo las condiciones de rutina propias de cada predio durante el periodo de seis meses.

Sujetos de estudio

Se consideraron como sujetos de estudio a todas las terneras vivas de hasta 30 días de edad dentro de cada predio al momento de la visita. Con el propósito de poder medir la expresión de INF γ basal de los animales, los individuos que dieron resultados positivos a la infección de tuberculosis bovina en cualquiera de los dos ensayos de ELISA, fueron descartados. Se registró la condición de salud de cada individuo, apoyada por la inspección en terreno durante cada visita y la observación facilitada por los encargados de las terneras de cada establecimiento.

Toma de muestra

A cada ternera (tanto en el día 0 como a los 6 meses posteriores) se le extrajo 10mL de sangre periférica proveniente de la vena yugular ó coccígea, dependiendo del tamaño del animal. Las muestras fueron recolectadas en tubos al vacío con heparina de litio como

anticoagulante. Una vez obtenida la sangre, las muestras fueron rotuladas según el número de identificación DIIO (Dispositivo de Identificación Individual Oficial), llevadas al laboratorio y almacenadas a temperatura ambiente hasta su procesamiento. A las muestras de sangre se les estimuló con una serie de antígenos como paso previo a la realización de un ensayo de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales contra INF γ . La estimulación antigénica y el ensayo de ELISA fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Vacunación

A los animales se les administró la vacuna viva atenuada BCG (cepa Sofía), a dosis de 0,1 mL (entre 2×10^5 y 8×10^5 C.F.U.) por individuo y aplicada por vía subcutánea a nivel de la tabla del cuello, en el lado izquierdo. La mitad de la población de terneras fue vacunada con la cepa BCG. Al grupo control se les inoculó suero fisiológico estéril (NaCl 0,9%), a la misma dosis y en la misma zona. La vacuna se presenta liofilizada en frascos de 10 dosis y debe ser reconstituida con 1 mL de diluyente incluido con el producto. Una vez reconstituida, y con una vida útil de cuatro horas, se mantuvo protegida de la luz y a temperatura de refrigeración (2° a 8° C) hasta el momento de su uso. Se llevó un registro de la identificación del animal, del predio, código del envase del producto inoculado, la fecha del procedimiento, el médico veterinario que inoculó el producto, la identificación de la madre del animal y el tipo de alimentación suministrado.

Estimulación antigénica

Para realizar la estimulación de las muestras se traspasaron 250 μ L de sangre recolectada a placas de cultivo estériles de 96 pocillos considerando una columna de seis pocillos por ternera, siguiendo el esquema de la Figura 1. Cada columna fue estimulada con 25 μ L de diluciones previamente reconstituidas de los diferentes antígenos (PPD bovino y PPD aviar en el primer y segundo pocillo; coctel de péptidos PC-EC para la estimulación de ESAT-6 y CFP-10 en el tercero; y dilución de Rv3615 en el cuarto pocillo), con un total de cuatro pocillos utilizados. A los dos pocillos restantes se les adicionaron alícuotas de 25 μ L de tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS.) como control negativo por columna para la estimulación antigénica y 25 μ L de mitógeno Pokeweed (Pw) como control positivo para determinar la viabilidad de las células y su capacidad de producir INF γ . Las

placas de cultivo fueron incubadas entre 16 y 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada para una correcta estimulación. Para facilitar la separación del plasma que fue utilizado en el ensayo ELISA, las placas de cultivo fueron centrifugadas una vez finalizada la incubación a 500 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP (+)	PPD B A1	PPD B A2	PPD B A3	PPD B A4	PPD B A5	PPD B A6	PPD B A7	PPD B A8	PPD B A9	PPD B A10	PPD B A11
B	CP (+)	PPD A A1	PPD A A2	PPD A A3	PPD A A4	PPD A A5	PPD A A6	PPD A A7	PPD A A8	PPD A A9	PPD A A10	PPD A 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

Fig. 1: Disposición de los antígenos y componentes para el cultivo celular y el posterior ensayo ELISA BOVIGAM® según número de individuo. CP= Control positivo; CN= Control negativo; CC= Control de conjugado; PPD B= Derivado proteico purificado bovino; PPD A= Derivado proteico purificado aviar; PC-EC= Cóctel de péptidos; RV3615= Cóctel de péptidos UK; NIL= Tampón Solución Fosfato Salina (PBS); PW= Mitógeno Pokeweed.

Ensayo ELISA INF y

El ensayo se llevó a cabo según instrucciones del "kit" Bovigam ® para medir los niveles de INF γ en respuesta a la estimulación de las alícuotas de sangre con cada antígeno. La cantidad de INF γ en los pocillos luego del ensayo se midió por una lectura de la absorbancia de cada pocillo utilizando un filtro de 450 nm con un filtro de referencia de 620 nm. La validez de los resultados de la lectura dependió, tanto de los controles suministrados en el "kit" (control positivo debe presentar un valor > 1,2 en la lectura, y el

control negativo un valor $< 0,13$), como de los valores del PBS (debiendo ser $< 0,3$) y del pokeweed (debiendo ser $> 0,5$). Una vez validada la lectura, se calcularon los resultados comparando los niveles de absorbancia obtenidos en las placas estimuladas con PPD bovino, PPD aviar y antígeno NIL (PBS), interpretándose de la siguiente manera:

Ternera Positiva a *M. bovis* = Densidad Óptica de PPD bovino - antígeno NIL $\geq 0,1$; y una Densidad Óptica de PPD bovino - PPD aviar $\geq 0,1$.

Ternera Negativa a *M. bovis* = Densidad Óptica de PPD bovino - antígeno NIL $< 0,1$; y una Densidad Óptica de PPD bovino - PPD aviar $< 0,1$.

Ternera positiva a DIVA = Densidad Óptica de PC-EC - antígeno NIL $\geq 0,1$; y/o una Densidad Óptica de Rv3615 - antígeno NIL $\geq 0,1$.

Análisis estadístico

El criterio de clasificación para determinar un caso de infección con tuberculosis bovina en el contexto de este estudio dependió de sí el sujeto fue vacunado ó no. En el caso de la vacunación con cepa BCG, se consideró como infectado todo caso positivo para el ensayo de ELISA INF y para los antígenos DIVA (ESAT 6, CFP10 y Rv3615). Por otro lado, para los casos en que los animales no fueron vacunados (estado inicial de las terneras y el grupo control), toda muestra positiva al ensayo ELISA INF y para los antígenos PPD-B y DIVA fue registrada como individuo positivo a tuberculosis bovina. Todo animal declarado como positivo bajo estos criterios fue descartado del análisis. Las densidades ópticas de los individuos negativos a las pruebas fueron comparadas utilizando la prueba de t de Student para variables independientes, por medio del *software* computacional Infostat del año 2018.

RESULTADOS

Luego del periodo de seis meses, un total de 219 animales fueron incluidos en el estudio, de los cuales 121 estaban vacunados y 98 fueron inoculados con placebo y actuaron como grupo control. La distribución entre animales vacunados y el grupo control, considerando el total de la población y los obtenidos a nivel predial se muestran en la Tabla 1. Todos los resultados expuestos corresponden a animales que en ambos ensayos de ELISA hayan dado resultados negativos a infección con *M. bovis* y, por lo tanto, se les declaró como no infectados.

Tabla 1. Distribución de animales vacunados y del grupo control dentro de cada predio

Lechería Participante	A	B	C	D	E	F	G	Total
Vacunados	43	37	14	9	9	6	3	121
Control	37	34	8	9	7	2	1	98
Total	80	71	22	18	16	8	4	219

Por confidencialidad, los nombres de las lecherías participantes fueron reemplazados con letras.

Se realizó una primera comparación de los valores de INF γ basales entre los animales que fueron vacunados y el grupo control, donde no se encontraron diferencias en ninguna de las variables comparadas (figura 2).

En las figuras 3 y 4 se pueden observar la distribución de los valores promedios de las densidades ópticas obtenidas en cada variable, comparadas entre el grupo de animales vacunados y grupo control, respectivamente. En la figura 3 se detallan los valores dentro del grupo vacunado con la cepa BCG, comparando los resultados de INF γ entre la primera toma de muestra (con animales de hasta 30 días de edad) y la segunda toma de muestra (con animales de 6 meses de edad). Se pueden observar valores superiores en todas las variables medidas en el primer ensayo de ELISA. Sin embargo, los valores correspondientes al PPD bovino, PPD aviar y Pokeweed se pueden observar diferencias

significativas luego del análisis estadístico. Este escenario se replica de manera similar en el grupo control (figura 4), donde las mediciones de INF γ dieron valores superiores en todas las variables observadas en el primer ensayo de ELISA. Al igual que en el grupo de animales vacunados, los valores de PPD bovino, PPD aviar y POKEWEED exhibieron diferencias significativamente más altas en el primer ensayo que en el segundo, dentro del grupo control.

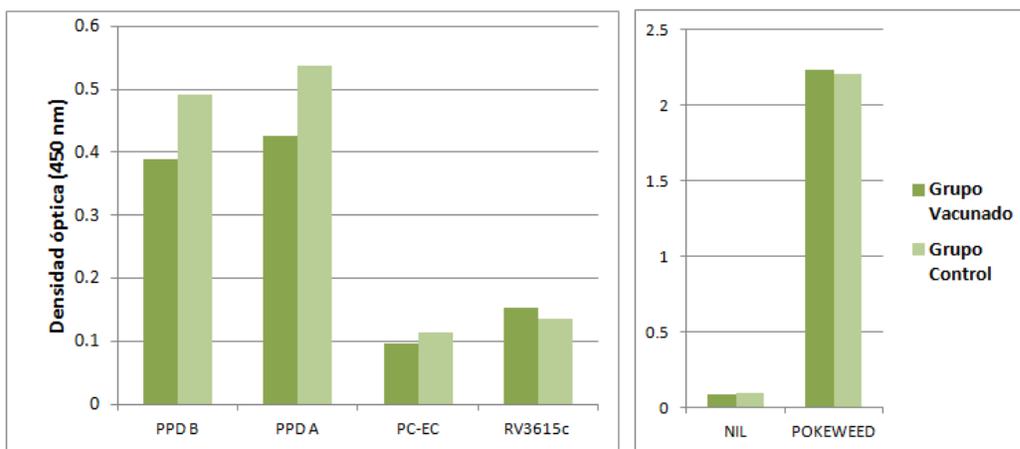


Figura 2. Niveles basales de INF γ (antes de la vacunación) producidos frente a estimulación antigénica en grupo de animales vacunados (n= 121) y grupo control (n=98). Los valores del NIL y Pokeweed fueron ilustrados por separado para mantener visibles las diferencias entre las barras. PPD B= Derivado proteico purificado bovino; PPD A= Derivado proteico purificado aviar; PC-EC= Cóctel de péptidos; RV3615= cóctel de péptidos UK; NIL= Tampón Solución Fosfato Salina (PBS); Pokeweed= Mitógeno Pokeweed.

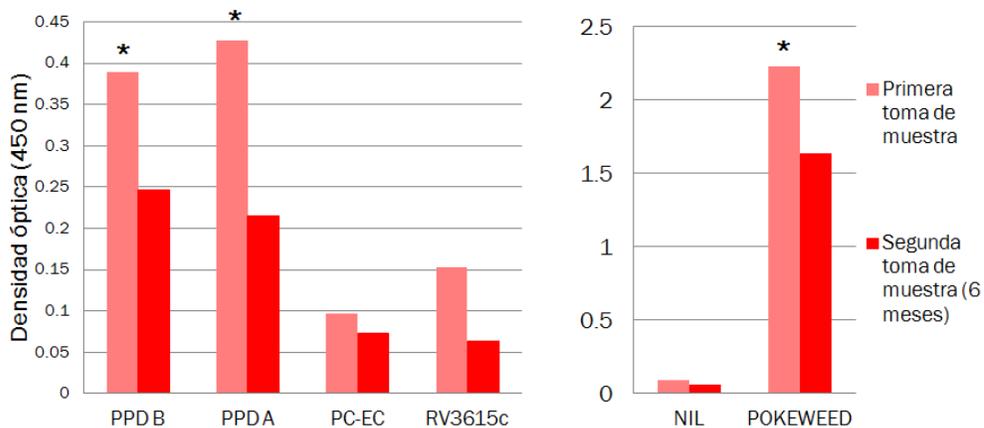


Figura 3. Niveles promedio de INF γ producidos a los 6 meses de vacunados (n= 121), producidos frente a estimulación antigénica . Los valores del NIL y Pokeweed fueron ilustrados por separado para mantener visibles las diferencias entre las barras. PPD B= Derivado proteico purificado bovino; PPD A= Derivado proteico purificado aviar; PC-EC= Cóctel de péptidos; RV3615= Cóctel de péptidos UK; NIL= Tampón Solución Fosfato Salina (PBS); Pokeweed= Mitógeno Pokeweed.*, P < 0,05 entre la primera toma de muestra y un periodo de seis meses.

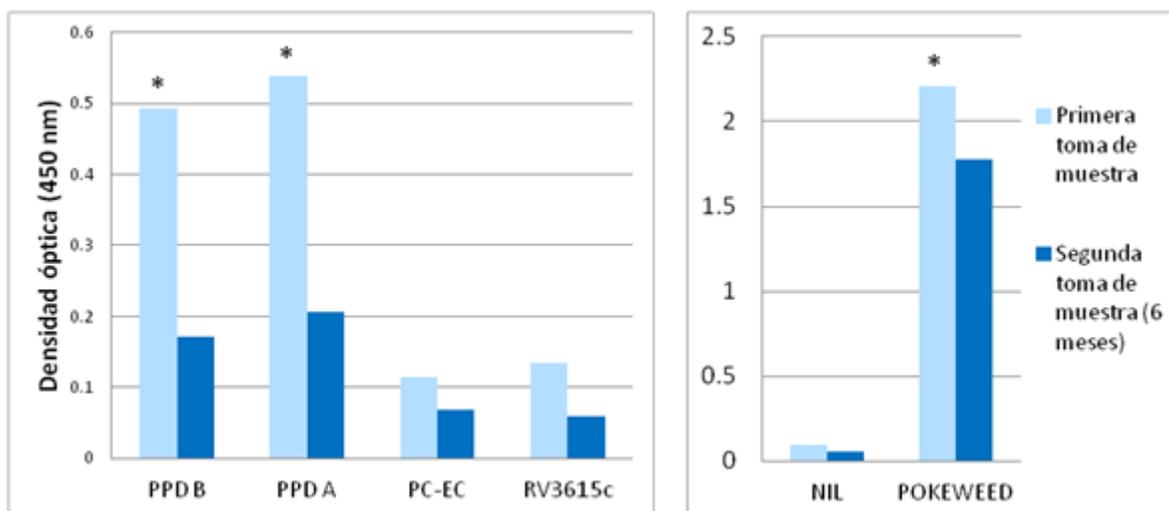


Figura 4. Niveles promedio de INF γ producidos frente a estimulación antigénica en grupo de animales control (n= 98). Los valores del NIL y Pokeweed fueron ilustrados por separado para mantener visibles las diferencias entre las barras. PPD B= Derivado proteico purificado bovino; PPD A= Derivado proteico purificado aviar; PC-EC= Cóctel de péptidos; RV3615= Cóctel de

péptidos UK; NIL= Tampón Solución Fosfato Salina (PBS); Pokeweed= Mitógeno Pokeweed.*, $P < 0,05$ entre la primera toma de muestra y un periodo de seis meses.

La comparación de las densidades ópticas medidas exclusivamente a los 6 meses se pueden observar en la figura 5. Una vez transcurrido este periodo, sólo se observaron diferencias significativas en relación a los valores de INF γ medidos para PPD bovino, cuyas densidades ópticas para el grupo vacunado fueron superiores comparados con el grupo control. Las densidades ópticas medidas a los 6 meses de edad fueron, a nivel general, inferiores una vez comparadas con con los valores basales de INF γ (figura 3 y figura 4).

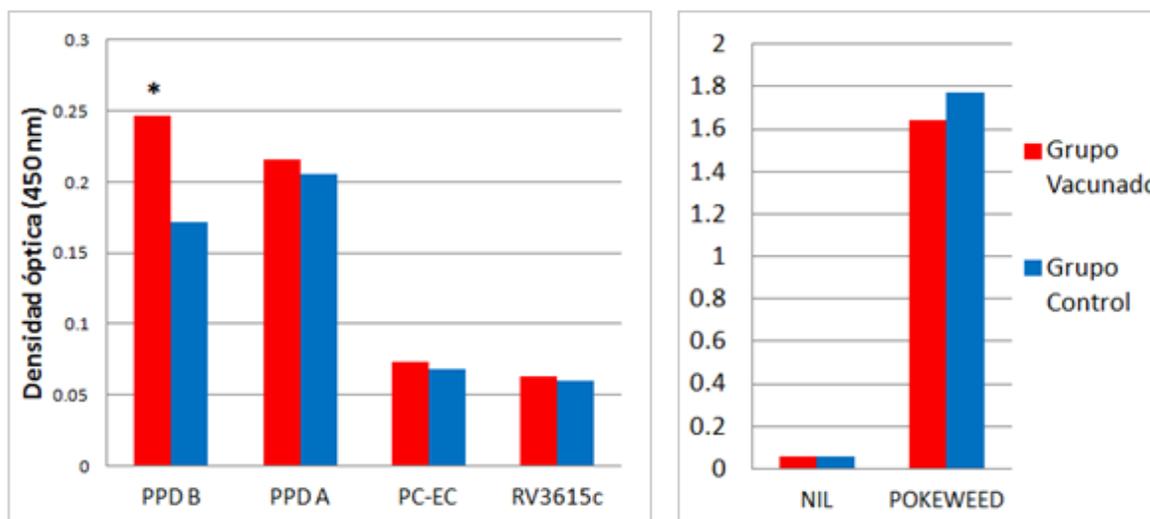


Figura 5. Niveles promedio de INF γ producidos frente a estimulación antigénica comparando al grupo vacunado (n=121) con el grupo control (n=98), luego de un periodo de 6 meses. Los valores del NIL y Pokeweed fueron ilustrados por separado para mantener visibles las diferencias entre las barras. PPD B= Derivado proteico purificado bovino; PPD A= Derivado proteico purificado aviar; PC-EC= Cóctel de péptidos; RV3615= Cóctel de péptidos UK; NIL= Tampón Solución Fosfato Salina (PBS); Pokeweed= Mitógeno Pokeweed.*, $P < 0,05$ entre la primera toma de muestra y un periodo de seis meses.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue caracterizar la secreción de INF γ bovino en respuesta a la estimulación con diversos antígenos involucrados en el diagnóstico oficial de tuberculosis bovina y el protocolo DIVA, comparando dos mediciones realizadas a los mismos individuos, con una separación de 6 meses entre los análisis.

Una de las principales dificultades fue el limitado control y manejo de los animales dentro de este periodo entre ambos muestreos. La industria láctea chilena se caracteriza, en parte, por la heterogeneidad de sus sistemas productivos, la cual depende de factores de tipo sociales, económicos y técnicos, repercutiendo en el perfil de las lecherías ubicadas en la Región Metropolitana (Carrillo *et al.*, 2011; Consorcio lechero, 2012). Esto se vio reflejado en el número de animales considerados por predios. El 63,9% de las terneras que actuaron como sujetos de estudio eran provenientes de las lecherías más grandes, denotando diferencias importantes desde un punto de vista productivo entre predios. Adicionalmente, los productores de menor escala cuentan con una menor gama de herramientas para optimizar la condición sanitaria de sus rebaños, generando como consecuencia casos de mortalidad, animales desaparecidos y aumento de las infecciones de tuberculosis diagnosticadas (Rivera y Vega, 2014). Esto último se relaciona con la diferencia registrada entre el número de terneras vacunadas y el grupo control al final del periodo de muestreo, registrando altas tasas de mortalidad y desaparición de animales durante los meses de invierno en los predios más vulnerables. El hecho de que hayan sobrevivido un mayor número de terneras vacunadas en comparación con el grupo control, es concordante con la propuesta de un aumento en la protección de la respuesta inmune celular en neonatos vacunados con cepa BCG (De Castro *et al.*, 2014; Elhmouzi-Younes *et al.*, 2009; Gerds *et al.*, 2006). Sin embargo, un análisis exhaustivo de las causas de mortalidad en las lecherías quedaba fuera de los objetivos de este estudio y sería pertinente evaluar con mayor detención los factores de riesgo asociados a cada lechería en particular para poder sacar conclusiones estadísticamente relevantes.

Los neonatos presentan un sistema inmune incompleto en términos de su desarrollo, generando un aumento en la posibilidad de contraer infecciones y establecer una respuesta inmune ineficiente frente a infecciones naturales e inducidas por vacunas (Gerds *et al.*,

2006). Este estudio contó con muestras de sangre tomadas de terneras, cuyas edades fluctuaban entre 1 a 30 días de vida. Debido a la logística de las salidas a terreno y la disponibilidad de los planteles, algunas terneras eran muestreadas y vacunadas hasta los 40 días luego de su nacimiento. Con esto en consideración, los valores de INF γ bovino en el primer ensayo de ELISA resultaron ser significativamente mayores que las muestras estimuladas de los mismos animales, 6 meses después, destacando en particular el mitogeno POKEWEED de viabilidad celular y los PPD bovino y aviar. Los antígenos DIVA no presentaron cambios significativos, lo cual era de esperarse considerando animales que habían sido declarados en ambos ensayos como no infectados. Esto se puede asociar a la biología propia del sistema inmune de las terneras y su población sanguínea de células Natural Killers (Elhmouzi-younes *et al.*, 2006). En los seres humanos, la vacunación con cepa BCG en la etapa neonatal puede generar un efecto protector adicional frente a infecciones, no necesariamente ligadas a la tuberculosis, como los casos de sepsis e infecciones respiratorias intra hospitalarias, disminuyendo significativamente los casos de mortalidad (De Castro *et al.*, 2014) y montando una potente respuesta inmune celular basada en linfocitos Th1 (Elhmouzi-younes *et al.*, 2006). Estudios realizados por Boysen *et al.* (2008) sugieren que las terneras presentan valores equivalentes ó incluso mayores de células Natural Killers, con un rol citotóxico más prominente en estas etapas del desarrollo en comparación con su actividad más predominantemente relacionada con la producción de citoquinas, tales como el INF γ . A su vez, Elhmouzi-younes *et al.* (2006) sugiere que las terneras menores de 8 días presentan un tercio de las Natural Killers circulante comparadas con terneras de más edad, pero cuya proliferación se acelera frente a la estimulación in vitro con interleukina 2 o interleukina 15, que actúan como estimuladoras de linfocitos Th1, ligados a la secreción de INF γ y la mediación del sistema inmune mediada por macrófagos (Ahmed y Schurig, 2013).

Al comparar las densidades ópticas entre el grupo vacunado y el grupo control, a los 6 meses posteriores a la inoculación de la cepa BCG se evidenciaron valores significativamente más altos para el PPD bovino en el grupo vacunado. Este evento era esperable, considerando que una de las consecuencias de la vacunación es la sensibilidad a la reacción frente al PPD bovino, que tiene como directa consecuencia la generación de falsos positivos una vez realizadas las pruebas de diagnóstico oficiales de los programas de

control tradicionales de tuberculosis (Vordermeier *et al.*, 2016; EFSA, 2013). En este contexto, sólo se consideraron para el estudio a animales que hayan dado resultados negativos frente a la infección de tuberculosis en el ensayo de ELISA. Los altos valores en el PPD bovino se pueden explicar por el proceso propio de vacunación, debido a los valores de los antígenos ESAT 6, CFP10 y Rv3615 que permanecieron constantes bajos en ambos muestreos, reafirmando su apoyo diagnóstico dentro del protocolo DIVA (Vordermeier *et al.*, 2016).

Estudios de Ameni *et al.* (2010) con terneras neonatas vacunadas con cepa BCG en Etiopía demostraron valores crecientes en los valores de densidades ópticas referentes a INF γ en respuesta a la estimulación con PPD bovino dentro de un periodo de 6 meses y posteriores, con su pico de producción a los 4 meses post vacunación. En el caso del presente estudio, los valores de PPD, tanto bovino como aviar, evidenciaron un descenso estadísticamente significativo en el grupo de animales vacunados y grupo control, una vez pasado los 6 meses. Ameni *et al.* (2010) menciona que, a pesar de haber construido un estudio en ambiente productivo propio de Etiopía, se mantuvo un fuerte control con relación a las micobacterias ambientales, lo cual repercutió en bajos valores de PPD aviar. Por otra parte, las lecherías de este trabajo no presentaron ningún tipo de control en términos de fauna relativa al ambiente productivo, destacando una importante presencia de palomas en los comederos y estructuras de almacenamiento del alimento de rumiantes, entre otros. Las medidas de control poblacional para estos casos variaba ampliamente entre lecherías, reflejando en menor escala la variedad en el perfil agropecuario de la Región Metropolitana. La preexposición del ganado frente a micobacterias ambientales (tales como *Mycobacterium avium*) puede disminuir la eficacia de la vacuna con cepa BCG, además de generar una leve protección contra *M. bovis* (Vordermeier *et al.* 2016).

Un estudio llevado a cabo por Lopez-Valencia *et al.*, (2010) demostró la eficacia de la vacuna en condiciones de campo, llegando a la conclusión de que, si bien, la vacuna BCG induce una protección experimental contra infecciones de *M. bovis*, la vacuna disminuye su efectividad en condiciones de campo. En ese caso, sus conclusiones apuntaron a una serie de razones también reafirmadas por Vordermeier *et al.*, (2016): (1) la dosis de la vacuna utilizada; (2) la exposición previa de las terneras a micobacterias ambientales; (3) la edad

de vacunación seleccionada. De aquellas, la razón que más pareciera haber afectado el resultado de este estudio en particular es la (2). Tanto Lopez-Valencia *et al.*, (2010) como Ameni *et al.*, (2010) mencionan un énfasis en haber descartado a los animales que hayan reaccionado de manera positiva a *M. avium* en ensayos de tuberculina cutánea y ELISA INFy. Sería recomendable en estudios a futuro tomar en cuenta la presencia de micobacterias ambientales y la prevalencia de la paratuberculosis en las zonas relativas a los predios lecheros, en conjunto con los factores de riesgos propios de la enfermedad.

CONCLUSIONES

De este estudio se puede concluir que la vacunación con cepa BCG tiene un efecto significativo en la expresión de INF γ bovino, elevándolos por sobre los valores del grupo control, luego de un periodo de 6 meses. Estudios de seguimientos son recomendables para concluir hasta momento estos valores se mantienen y poder conocer la magnitud de la interferencia de la vacuna en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

La presencia de micobacterias ambientales puede genera interferencia en la expresión de INF γ bovino frente a antígenos de *Mycobacterium* spp, conformando un factor a considerar al momento de vacunar terneras neonatales o de temprana edad.

Sí bien, la vacuna es protectora en condiciones de laboratorio, e incluso puede potenciar de manera inespecífica la respuesta inmune celular, ésta no debe ser considerada como un factor determinante en la salud de las terneras. Los factores propios dentro de cada predio y su realidad socio económica, en conjunto con las buenas prácticas, siguen siendo pilares fundamentales al momento de disminuir enfermedades y mortalidad en estos grupos vulnerables.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMED, S.; SCHURIG, G.** 2013. Antigen and innate immunity. **In:** Bradley, G. Cunningham's textbook of veterinary physiology. 5th edition. Elsevier. St. Louis, USA. pp 569-577.
- AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ASSEFFA, A.; YOUNG, D.; HEWINSON, R.** 2010. Field Evaluation of the Efficacy of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. Clin. Vaccine. Immunol. 17: 1533-1538.
- BOYSEN, P.; GUNNES, G.; PENDE, D.; VALHEIM, M.; STORSET, A.** 2008. Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine-producing properties. Dev. Comp. Immunol. 32: 773-783.
- BUDDLE, B.; WEDLOCK, N.; DENIS, M.; VORDERMEIER, M.** 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. Vet. Microbiol. (151): 14-22.
- CARRILLO, B; MOREIRA, V; GONZÁLES, J.** 2011. Caracterización y tipificación de sistemas productivos de leche en la zona centro-sur de Chile: un análisis multivariable. IDESIA (Chile). Volumen 29, N°1. Páginas 71-81.
- CONSORCIO LECHERO.** 2012. Informe estudio caracterización de los productores lecheros, usando bases de datos disponibles. Chile. 24p.
- DANIEL, T.** 2006. The history of tuberculosis. Respir. Med. (100): 1862 - 1870.
- DE CASTRO, M.; PARDO-SECO, J.; MARTINON-TORRES, F.** 2014. Nonspecific (Heterologous) protection of neonatal BCG vaccination against hospitalization due to respiratory infection and sepsis. Clin. Infect. Dis. 60: 1611-1619.
- DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.; VORDERMEIER, M.; HEWINSON, R.; CHRISTIANSEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R.** 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. Res. Vet. Sci (81): 190-210.
- DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A.** 2014. Pathology of bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci. (97): S20-S29.

- ELHMOUZI-YOUNES, J.; STORSET, A.; BOYSEN, P.; LAURENT, F.; DROUET, F.** 2009. Bovine neonate natural killer cells are fully functional and highly responsive to interleukin-15 and to NKp46 receptor stimulation. *Vet. Res.* 40:54. 14p.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA).** 2013. Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. *EFSA Journal* . 11:3475.
- GERDTS, V.; MUTWIRI, G.; TIKOO, S.; BABIUK, L.** 2006. Mucosal delivery of vaccines in domestic animals, *Vet. Res.* 37:487–510.
- GHODBANE, R.; DRANCOURT, M.** 2013. Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *TUBERCULOSIS* (93): 589-595.
- HOPE, J., THOM, M., VILLAREAL-RAMOS, B., VORDERMEIER, M., HEWINSON, G., HOWARD, J.,** 2005. Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from *Mycobacterium bovis* infection but compromises diagnosis of disease in cattle. *Clin. Exp. Immunol.* 141: 432–439.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS (INE).** 2007. Informe metodológico. Vii Censo nacional agropecuario y forestal. INE. Chile. 45 p.
- JONES, J.; GORDON, V.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M.** 2010a. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* reveals the immunodominance of the ESAT-6 protein family. *Infect. Immun.* 78:1326–32.
- JONES, J.; HEWINSON, G.; VORDERMEIER, M.** 2010b. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:1344–48.
- LOPEZ-VALENCIA, G., RENTERIA-EVANGELISTA, T., DE JESUS WILIAMS, J., LICEA-NAVARRO, A., DE LA MORA-VALLE, A., MEDINA-BASULTO, G.** 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 88: 44-49.
- NORBY, B., BARTLETT, P.C., FITZGERALD, S.D., GRANGER, L.M., BRUNNING- FANN, C.S., WHIPPLE, D.L., PAYEUR, J.B.** 2004. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 126–131.
- PERRIN, P.** 2015. Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. *TUBERCULOSIS* (95): 112-116.

- POLLOCK, M.; WELSH, M.; MCNAIR, J.** 2005. Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108: 37–43.
- QUEZADA, N.; RETAMAL, P.** 2010. La tuberculosis bovina: El desafío sanitario de Chile. *TecnoVet.* Vol. 16. 4 p.
- REYES, P.** 2012. Tuberculosis Bovina: La importancia de los factores de riesgo en la introducción y exposición-diseminación de *M. bovis* en el rebaño bovino. Programa Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69 p.
- RIVERA, A.; VEGA, M.** 2014. Ocurrencia de la Tuberculosis Bovina en Chile (2000-2014). Santiago, Chile. SAG, División de Protección Pecuaria. 45 p.
- RODRIGUEZ-CAMPOS, S.; SMITH, N.; BONIOTTI, M.; ARANAZ, A.** 2014. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* (97): 5-19.
- ROMHA, G.; GEBRU, G.; ASEFA, A.; MAMO, G.** 2018. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in animals: Transmission dynamics and control challenges of zoonotic TB in Ethiopia. *Prev Vet Med.* (158): 1-17.
- SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG).** 2012. Plan nacional de control y erradicación de tuberculosis bovina: Resumen ejecutivo de actividades realizadas. Santiago, Chile. SAG, División de protección pecuaria, Subdepartamento de Sanidad Animal. 7p.
- 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.
- THOEN, C.; LOBUE, P.; ENARSON, D.; KANEENE, J.; DE KANTOR, I.** 2009. Tuberculosis: A re-emerging disease of animals and humans. *Vet. Ital.*, 45: 135-181.
- VORDERMEIER, M., 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.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE).** 2016. Chapter 2.4.6. Bovine Tuberculosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 8th Ed. OIE. Paris, Francia.

WATERS, R.; PALMER, M.; BUDDLE, B.; VORDERMEIER, M. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccines* (30): 2611-2622.