



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

**DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN A TUBERCULOSIS BOVINA EN
VAQUILLAS DE LECHERIA VACUNADAS CON LA CEPA BCG
DE *Mycobacterium bovis***

ROMINA MILLARAY ORELLANA PARDO

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

PROFESOR GUÍA: Dr. PATRICIO RETAMAL MERINO

Financiamiento: Convenio SAG-FAVET
SANTIAGO, CHILE
2019

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad provocada por *Mycobacterium bovis*, zoonótica, de distribución mundial y que afecta a la industria láctea debido a que genera limitaciones tanto productivas como comerciales.

La vacunación del ganado con la cepa BCG de *M. bovis* actualmente no es una estrategia de prevención autorizada por los servicios de sanidad animal, sin embargo ha demostrado ser inocua y eficaz para el ganado en múltiples estudios experimentales.

Una desventaja de la vacunación es que interfiere con el diagnóstico tradicional de tuberculosis bovina, por lo que se ha desarrollado la prueba DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*), que detecta incrementos de interferón gamma mediante la estimulación con antígenos específicos (CFP-10, ESAT-6 y Rv3615c) de las cepas virulentas de *M. bovis*.

El objetivo de este estudio fue evaluar el nivel de protección producido por la vacuna cepa BCG de *M. bovis* a los tres y seis meses posteriores a la vacunación en 123 vaquillas pertenecientes a una lechería de la Región Metropolitana, Chile.

A la mitad de los animales (N= 63) se le inoculó la vacuna cepa BCG de *M. bovis*, mientras que al resto del grupo (N= 60) se le administró solución placebo correspondiente a NaCl 0,9%, posteriormente a los tres y seis meses desde la fecha de vacunación, dichos animales fueron muestreados y testeados a través de la prueba DIVA para determinar su condición de infección.

Los resultados muestran que, tres meses después de la vacunación, se determinó una eficacia de la vacuna de un 81,75%, existiendo una asociación significativa ($p < 0,05$) entre las variables condición de infección y el grupo al que pertenecen los animales. A los seis meses posteriores a la vacunación la eficacia fue de un 47,03%, sin detectarse asociación entre las variables mencionadas ($p > 0,05$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de INF- γ secretados entre el grupo control y vacunado a ninguno de los tiempos evaluados.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium bovis*, a zoonotic, worldwide distributed pathogen that affects the dairy industry, by generating both productive and commercial limitations.

Vaccination of cattle with the *M. bovis* BCG strain is not currently an authorized preventive strategy by the animal health services. However, it has been shown to be safe and effective for cattle in multiple experimental studies.

A disadvantage of vaccination is that it interferes with the traditional diagnosis of bovine tuberculosis, reason by what a “differentiating infected from vaccinated animals” (DIVA) test has been developed, which detects interferon gamma through blood stimulation with specific antigens (CFP-10, ESAT- 6 and Rv3615c) of the virulent *M. bovis* strains.

The objective of this study was to evaluate the level of protection produced by the vaccine *M. bovis* BCG strain after three- and six-months post-vaccination, in 123 heifers belonging to a dairy farm in the Metropolitan Region of Chile.

Half of the animals (N = 63) were inoculated with the vaccine *M.bovis* BCG strain, while the rest of the group (N = 60) was given a placebo solution corresponding to NaCl 0.9%, after three and six months from the date of vaccination, said animals were sampled and tested through the DIVA test to determine their infection status.

At three months after vaccination, results show an 81.75% of vaccine efficacy and a significant association ($p < 0.05$) between analyzed variables, infection status and the treatment group (BCG or placebo). Six months after vaccination the efficacy was 47.03%, with no association between the mentioned variables ($p > 0.05$). No significant differences were found in the levels of INF- γ secreted between the control and vaccinated group at any of the times evaluated.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una infección bacteriana causada por *Mycobacterium bovis*, generalmente sigue un curso clínico crónico y afecta a una variada cantidad de hospederos como los humanos y fauna silvestre. Tradicionalmente se ha considerado como una enfermedad de gran importancia en la salud pública debido a su carácter zoonótico. Asimismo, a nivel económico causa costos estimados anualmente en \$ 3 mil millones de dólares a nivel mundial, asociados a la disminución en el nivel de producción láctea, decomisos en canales, restricciones comerciales, diagnóstico de la enfermedad, sacrificio de animales infectados además de afectar la continuidad del sistema productivo. En consecuencia, se han implementado a nivel internacional múltiples medidas para su control y erradicación, siendo el programa de la Unión Europea un ejemplo exitoso, basado principalmente en el monitoreo, diagnóstico, sacrificio e inspección *post-mortem* de bovinos. No obstante, uno de los problemas de este plan es la imposibilidad de la erradicación en los países con reservorios en la fauna silvestre como Reino Unido, por lo que la vacunación es considerada una opción a estudiar, aunque actualmente se encuentra prohibida. El principal inconveniente a esta medida es que el diagnóstico oficial se realiza con la prueba cutánea de tuberculina, la cual no distingue entre animales infectados de los vacunados. Con este fin se han desarrollado ensayos de diagnóstico para distinguir animales vacunados de animales infectados (*Differentiating infected from vaccinated animals* o DIVA test). En Chile a partir del año 2011 se implementó el Plan Nacional de Control y Erradicación de la tuberculosis bovina (TBB) enfocado en la industria láctea. En el marco de dicho plan resulta primordial el adecuado diagnóstico de la enfermedad, objetivo por el cual se incorporó el diagnóstico sanguíneo con ELISA-Interferón gamma como técnica tamiz para la vigilancia predial. A nivel experimental, desde el año 2017 se prueba la vacunación con la cepa BCG de *M. bovis* en ciertas lecherías de la RM, motivo por el cual se utiliza la prueba DIVA que es capaz de discriminar la condición de infección con una cepa de campo a pesar de la vacunación de los animales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Agente etiológico

Mycobacterium bovis es el causante de la tuberculosis bovina, y forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) al que también pertenecen otras micobacterias como *M. tuberculosis*, principal agente productor de tuberculosis en humanos; mientras *M. pinnipedii* afecta a mamíferos marinos, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. orygis* son responsables de la infección en otras especies. Los integrantes del CMT comparten un 99,9% de similitud en el nivel de nucleótidos, además de secuencias de rRNA 16S virtualmente idénticas. Sin embargo, se diferencian en el rango de hospederos y patogenicidad (Rodríguez-Campos *et al.*, 2014).

A nivel microbiológico se clasifican como bacilos Gram-positivo, ácido-alcohol resistentes, no formadores de esporas (Acha y Szyfres, 2001). Se caracterizan por tener una gran resistencia a condiciones ambientales adversas como la desecación y anaerobiosis. Sin embargo, son sensibles a la exposición solar directa, radiación ultravioleta y pasteurización (Reyes *et al.*, 2012).

Existen múltiples estudios respecto a la supervivencia de la bacteria fuera del hospedero, encontrándose que, a ciertos factores ambientales como la baja temperatura, una humedad adecuada y una protección contra la radiación solar, *M. bovis* tiene una mejor supervivencia; llegando en condiciones de laboratorio, a sobrevivir incluso hasta 90 días en suelo arcilloso a 4° C (Barbier *et al.*, 2017).

La ruta de infección más común es a través de la inhalación del agente ya que el bovino elimina el *M. bovis* por secreciones respiratorias y, por lo tanto, el contacto directo de nariz con nariz facilita su propagación; otra forma de contagio respiratorio indirecto es por la inhalación de aerosoles (Ábalos y Retamal, 2004).

Sumado a éstas, existen otras rutas de contagio como la vía oral, que ocurre debido a la ingestión del bacilo en pasturas, agua o fómites contaminados con deposiciones y orina de animales infectados; mientras que la forma menos frecuente de infección en la actualidad son la vía transplacentaria, genital o intramamaria por contacto con secreciones genitales, semen o leche de animales infectados (Domingo *et al.*, 2014).

En relación con el cuadro clínico, este generalmente afecta al animal de forma subclínica, pero cuando se desarrolla la enfermedad provoca un proceso crónico inflamatorio, con la formación de una lesión primaria nodular caseosa con centro necrótico, que afecta principalmente a los pulmones y sus linfonodos regionales. No obstante, también se puede diseminar al resto del organismo en diferentes patrones como la tuberculosis cavitaria, miliar o perlada (Domingo *et al.*, 2014).

II. Epidemiología

La tuberculosis es una enfermedad en la que por su gran importancia en el comercio internacional se realiza vigilancia general en todos los países pertenecientes a la OIE. Posee una distribución en prácticamente todos los continentes (OIE, 2017), estimándose una prevalencia mundial de la infección de un 9% basándose en resultados de las pruebas cutáneas; sin embargo, esta cifra podría estar subestimada debido a que muchos países no notifican ni actualizan sus reportes a la OIE de manera oportuna (Vordermeier *et al.*, 2016).

En América la enfermedad se encuentra en prácticamente todos los países de forma clínica demostrada, excepto en Canadá, Estados Unidos y México, donde se encuentra limitada a ciertas zonas del país (OIE, 2017).

III. Situación Nacional

En Chile la enfermedad se encuentra presente de manera endémica, con infección clínica demostrada.

Se estima en estudios realizados entre 1987-1989 una prevalencia predial de un 28,5%; posteriormente en 1994 se calculó una prevalencia predial de 38,2%, llegando al 91,1% en la Región Metropolitana. En el 2004 se realizó un estudio en bovinos lecheros que determinó una prevalencia de un 71,8% en la Región Metropolitana (Max *et al.*, 2011).

El último estudio de diagnóstico de tuberculosis realizado entre los años 2000- 2014 a 12.168 predios bovinos reveló una incidencia a nivel nacional de un 0,76 %, siendo la Región Metropolitana una de las más afectadas (SAG, 2014).

En el país la distribución de la enfermedad es heterogénea, explicada por la diversidad de sistemas productivos con sus respectivos manejos. Debido a lo anterior, el actual programa de control y erradicación ha definido tres zonas epidemiológicas (Chile, 2015):

- Zona de Erradicación Norte: Desde la región de Arica y Parinacota, Tarapacá hasta Antofagasta. La presentación de la tuberculosis bovina es esporádica.
- Zona de Control: Abarca desde la región de Atacama, Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins, Maule hasta el Biobío, exceptuándose la Provincia de Arauco. Presenta altas prevalencias prediales e intra-rebaño. El propósito en esta zona es lograr la disminución significativa de la prevalencia predial de la TBB.
- Zona de Erradicación Sur: Incluye la Provincia de Arauco, de la región de La Araucanía y las regiones de Los Ríos, Los Lagos, Aysén, Magallanes y Antártica Chilena. Aquí se concentra aproximadamente el 72% de los bovinos del país (Reyes *et al.*, 2012).

El plan propone el control obligatorio de la TBB en las zonas de erradicación, aplicado en distintas etapas considerando la distribución geográfica de la población bovina y la prevalencia de la enfermedad (Reyes *et al.*, 2012).

IV. Cepa BCG de *M. bovis*

Para la prevención de la tuberculosis en humanos se utiliza una vacuna viva atenuada de *M. bovis* cepa BCG (bacilo Calmette-Guérin), que fue aislada por Calmette y Guérin a partir de un caso de mastitis por tuberculosis en 1911 (Vordermeier *et al.*, 2016).

La vacuna ha sido probada y ha demostrado ser inocua para el ganado en múltiples estudios de campo (Waters *et al.*, 2012). En México y Etiopía se hicieron por separado experimentos con metodologías similares, en los que se inoculó un grupo de terneros con la vacuna BCG en una sola dosis de 1 mL, correspondiente a 1×10^6 UFC, por vía subcutánea en el área escapular y posteriormente se mezclaron con el ganado reactor de TB, junto con terneros de control no vacunados. En México se inocularon 70 terneros, en los que a 12 meses se evaluó su respuesta a pruebas diagnósticas indicativas de TB bovina, resultando la vacuna con una eficacia protectora del 59,4% (López-Valencia *et al.*, 2010). En la experiencia de Etiopía, el

tamaño muestral fue de 27 terneros, de los que se inocularon 13, y se evaluaron entre los 10-23 meses posterior a la vacunación, siendo también favorables los resultados para el uso de la vacuna con una eficacia entre 56% y 68 % dependiendo de los parámetros seleccionados (Ameni *et al.*, 2010).

En relación con la dosis óptima de la vacuna necesaria para una respuesta eficaz en bovinos, se estima que brinda una mejor protección a dosis relativamente bajas siendo de 10^4 a 10^6 UFC por vía subcutánea, mientras que por vía oral se necesitan dosis más altas (10^8 UFC) (Buddle *et al.* 2013). La vacunación en terneros recién nacidos (<1 mes de edad) indujo mayores niveles de protección que la vacunación a mayor edad (Vordermeier *et al.*, 2016).

Con respecto a la duración de la inmunidad, se estima que induce un grado significativo de inmunidad protectora de 12 meses post vacunación, disminuyendo a los 24 meses (Thom *et al.*, 2012).

V. Prueba DIVA Interferón- γ y Cóctel de péptido PC-EC y Rb3615v

El interferón- γ es una citoquina liberada por los linfocitos T cuyo objetivo es la activación de los macrófagos, permitiendo una mayor eficacia en la eliminación de patógenos intracelulares como las micobacterias (Buddle *et al.*, 2009).

La prueba de ELISA interferón- γ (INF- γ) fue desarrollada por primera vez por Wood y colaboradores en 1991, y se acepta en el 2002 por la Comisión Europea como prueba diagnóstica complementaria a la prueba cutánea de la tuberculina para la detección del ganado infectado (Lahuerta-Marin *et al.*, 2015).

Este ensayo se basa en la liberación de interferón gamma desde sangre entera, generada por linfocitos sensibilizados a *M. bovis*; dicha respuesta es producida al estimular la muestra con PPD bovino y PPD aviar (Vordermeier *et al.*, 2016).

La prueba DIVA (*Differentiating infected from vaccinated animals*) consiste en la detección de interferón- γ mediante la estimulación con antígenos específicos de las cepas virulentas de *M. bovis*, denominados cóctel de péptidos PC-EC y Rv3615c (Vordermeier *et al.*, 2016).

En relación con los péptidos ESAT-6 y CFP-10 (que conforman el cocktail PC-EC), estos corresponden a proteínas micobacterianas que se codifican dentro de la región de diferencia 1 (RD1) de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, y están presentes en las cepas de campo, pero ausentes

en la cepa BCG, (Lahuerta-Marin *et al.*, 2015). Ya que la sensibilidad del cóctel PC-EC solo es de aproximadamente 82% en animales naturalmente infectados, se han agregado diversos antígenos que pudieran mejorar este indicador, de los cuales Rv3615c ha sido recomendado (EFSA, 2013). El gen que codifica este antígeno está presente tanto en BCG como en *M. bovis*, pero no se expresa en la cepa BCG. Su incorporación aumentó la sensibilidad a aproximadamente un 90% (Vordermeier *et al.*, 2016).

VI. Vacunación en Chile con Cepa BCG

En la actualidad en Chile, la eliminación del rebaño infectado con *M. bovis* no es una medida obligatoria en la zona de control, debido que no existe una compensación económica para el productor. Es en este escenario que la vacunación aparece como una opción de prevención con el objetivo de disminuir la prevalencia de la tuberculosis bovina.

En esta memoria se busca la evaluación de la eficacia de la vacuna con la cepa BCG de *M. bovis* en condiciones de campo, por medio de la prueba DIVA, utilizando vaquillas pertenecientes a una lechería de la Región Metropolitana.

HIPÓTESIS

La vacunación con cepa BCG de *Mycobacterium bovis* produce una protección significativa contra la tuberculosis en el ganado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar en campo la eficacia de la vacunación con la cepa BCG de *Mycobacterium bovis* para la prevención de la tuberculosis bovina en vaquillas de un plantel lechero de la RM, Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la respuesta inmune celular en vaquillas de pre-encaste vacunadas con cepa BCG de *M. bovis*, por medio de la prueba de DIVA ELISA interferón- γ .
2. Determinar el nivel de protección de la inmunización de estos animales a los tres y seis meses post-inoculación de la cepa BCG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales del estudio

Se incluyeron 123 vaquillas de pre-encaste de 11 meses de edad, sin infección por *M. bovis*, pertenecientes a un predio lechero de la comuna de María Pinto, provincia de Melipilla, Región Metropolitana de Chile. Dicho plantel es considerado por el SAG libre de tuberculosis en la etapa de crianza.

En el tiempo 0, los animales fueron sometidos a un muestreo de sangre entera para determinar su condición de infección a *M. bovis*, a través de la prueba DIVA. Luego, aleatoriamente a la mitad del grupo (N=63) se le inoculó la vacuna viva atenuada BCG cepa Sofía vía subcutánea en el área cervical izquierda, a una concentración de 1×10^6 UFC. A la otra mitad (N=60) se inoculó con la solución placebo de NaCl 0,9%. Posteriormente se procedió al registro de los animales con la identificación del animal y del predio, la fecha de nacimiento, la fecha de inoculación y la identificación (ID) del producto inoculado.

Los animales fueron mantenidos en el predio y recibieron los mismos manejos que el resto del ganado, hasta el momento de cada toma de muestra.

A continuación a los tres y seis meses, desde la fecha de vacunación a los animales, se les muestreo y aplicó la prueba DIVA para determinar su condición de infección.

Prueba DIVA

La muestra necesaria para este procedimiento es 2 mL de sangre con anticoagulante heparina de litio, obtenidas de la vena coccígea con el sistema de tubos al vacío (Venoject®). Cada tubo fue rotulado con el número de identificación DIIO (Dispositivo de Identificación Individual Oficial) de cada vaquilla y se mantuvo a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{C}$) hasta su procesamiento en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), antes de 24 horas del momento del muestreo.

En el laboratorio, las muestras fueron incubadas en placas de cultivo celular estériles de 96 pocillos con fondo plano. Por cada muestra se dispensaron seis alícuotas de 250 μL de sangre entera, que se estimularon con 25 μL de cada antígeno según disposición que se muestra en la Figura 1 (Anexo 1).

Los antígenos, reactivos y las concentraciones finales corresponden a:

- PC-EC® Cóctel de péptidos Prionics ®: antígeno de estimulación, en concentración de 10 µg/mL (5 µg/mL de ESAT-6 y 5 µg/mL de CFP-10).
- Rv3615v: Cóctel de péptidos UK, antígeno de estimulación (10 µg/mL).
- PBS (NIL): Tampón Solución Fosfato Salina como control basal del nivel de INF-γ de los animales muestreados, es decir corresponde al antígeno nulo.
- Pokeweed (PW): Mitógeno, control de estimulación que evalúa la viabilidad de las células en concentración de 5 µg/mL.

Para mezclar los reactivos y la muestra se agitaron las placas durante 1 mín. a 600 rpm y finalmente fueron incubadas por un periodo de 16 a 24 horas a 37° C, en cámara húmeda.

Posterior a la incubación se cosecharon los plasmas, para lo cual previamente se centrifugó cada placa a 700 G durante 15 mín. a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ$ C), con el objetivo de separar el plasma del detrito celular. A continuación, se extrajo al menos 100 µL de plasma por pocillo, y fue dispensado en placas de cultivo celular no estériles de 96 pocillos. Las placas fueron conservadas a la espera de la realización del test ELISA INF-γ en congelación a -20° C.

La prueba ELISA INF-γ fue realizado con el kit BOVIGAM® 2G según las recomendaciones del fabricante.

La muestra es validada si el valor de la densidad óptica (OD) del control positivo (pokeweed) es superior a 0,5; mientras que el valor de OD del control negativo (Nil) es menor a 0,3. El animal será considerado positivo si la diferencia de OD entre PBS y el cóctel PC-EC es mayor a 0,1, además de que el valor de la diferencia de OD entre Rv 36 15c y Nil sea mayor a 0,1.

Análisis de los Resultados

Para cada tiempo de muestreo, se compararon los niveles de INF- γ entre los grupos vacunados y no vacunados, a través de las lecturas de densidad óptica (DO) de sus muestras en la prueba DIVA. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de t.

Por otra parte, se determinaron las diferencias en los niveles de infección entre ambos grupos de animales mediante una prueba de chi cuadrado, considerando las variables categóricas condición de infección (positivo / negativo) y vacunación (BCG / placebo).

Finalmente se determinó la eficacia de la vacuna, definida como el porcentaje de reducción en la incidencia de la infección/enfermedad atribuible a la vacunación, es decir la disminución en la tasa de ataque entre las cohortes. Este indicador se calculó con la siguiente formula (EFSA, 2013):

$$EV (\%) = (R_n - R_v) / R_n \times 100$$

R_n: tasa de incidencia de la infección/enfermedad en el grupo no vacunado.

R_v: Tasa de incidencia de la infección en el grupo vacunado.

Consideraciones de Bioseguridad y Ética

La bioseguridad fue considerada tanto para el trabajo en terreno como para el trabajo en laboratorio, para lo cual se ejecutaron actividades como la correcta sujeción y manejo de los animales en estudio, además del uso obligatorio del equipamiento adecuado para la toma y procesamiento de la muestra.

Con respecto al bienestar animal se siguieron los lineamientos sugeridos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para el adecuado diseño e implementación de ensayos de campo para la vacunación contra la tuberculosis bovina, además de contar con el consentimiento informado del dueño del predio y el certificado de bioética.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 123 vaquillas mayores a 11 meses de edad. Estos animales fueron sometidos a la prueba ELISA INF- γ a los tres y seis meses posteriores a la inoculación, si el resultado de esta prueba era positivo en algún tiempo, se apartaban del estudio y posteriormente eran eliminadas del predio.

Se analizaron un total de 123 animales a los tres meses posteriores a la vacunación, de los cuales 60 corresponden al grupo placebo y 63 al grupo inoculado con cepa BCG de *M. bovis*.

Con respecto a la respuesta inmune celular, se compararon los niveles de INF- γ entre grupo control y vacunados con cepa BCG de *M. bovis*, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las medias para ninguno de los antígenos evaluados (Tabla 1).

Tabla 1. Promedios de densidades ópticas (DO) de INF- γ según antígenos, entre grupos a los 3 meses posteriores a la inoculación con cepa BCG de *M. bovis*.

Antígeno	Promedio DO Grupo BCG	Promedio DO Grupo Placebo	p
PPD Avium	-0,11	-0,23	0,23
PPD Bovis	0,48	0,38	0,38
PC-EC	0,01	0,02	0,35
Rv3615	0,006	0,01	0,43

En relación con la eficacia de la vacuna a los 3 meses post-inoculación, se detectaron asociaciones estadísticamente significativas ($p= 0,03$) entre las variables condición de infección y el grupo al que pertenece el animal. (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de contingencia 2x2 para el contraste de resultados entre el grupo de estudio y la condición de infección de los animales 3 meses posteriores a la vacunación con cepa BCG de *M. bovis*.

Grupo	Positivo	Negativo	Total
Placebo	8	52	60
BCG	2	61	63
Total	10	113	123

La eficacia de la vacuna cepa BCG de *M. bovis* a los tres meses post vacunación fue de un 76%, siendo la tasa de incidencia del grupo vacunado (Rv) un 3%; mientras que la incidencia del grupo placebo (Rn) fue de un 13%.

A los seis meses después de la vacunación, se analizaron 109 animales, 59 de ellos inoculados con cepa BCG de *M. bovis* y 50 pertenecientes al grupo control. Esta diferencia respecto del número de animales analizados a los 3 meses se debe a que los animales que resultaron positivos fueron sacados del estudio y vendidos por disposición del predio.

Se compararon los niveles de INF- γ entre grupo control y vacunado con cepa BCG de *M. bovis* (Tabla 3) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos para ninguno de los antígenos evaluados.

Tabla 3. Promedios de densidades ópticas (DO) de INF- γ entre grupos a los 6 meses posteriores a la inoculación de la cepa BCG de *M. bovis*.

Antígeno	Promedio DO Grupo BCG	Promedio DO Grupo Placebo	p
PPD Avium	-0,02	-0,07	0,28
PPD Bovis	0,28	0,24	0,64
PC-EC	0,02	0,01	0,25
Rv3615	0,01	0,002	0,31

A los 6 meses posteriores a la vacunación se hallaron 4 animales positivos, 2 animales por cada grupo respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,87$) entre la condición de infección y el grupo al que pertenecen (Tabla 4).

Tabla 4. Tabla de contingencia 2x2 para el contraste de resultados entre el grupo de estudio y la condición de infección de los animales a los 6 meses posteriores a la vacunación con cepa BCG de *M. bovis*.

Grupo	Positivo	Negativo	Total
Control	2	48	50
BCG	2	57	59
Total	4	105	109

En cuanto a la eficacia protectora de la vacuna a los seis meses subsiguientes a la vacunación esta fue de 15 %, siendo un 3 y 4 % las tasas de incidencia del grupo vacunado y del grupo control respectivamente.

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia protectora de la vacunación con cepa BCG de *M. bovis* en vaquillas expuestas a una alta prevalencia tuberculosis bovina. Los resultados muestran que la vacuna presenta un alto grado de protección a los tres meses posteriores a la vacunación, presentando una eficacia de un 76%, mientras que a los seis meses posteriores la eficacia sufre una fuerte disminución a un 15%. Con respecto a las tasas de infección entre grupos, se observa que a los tres meses posteriores a la inoculación hay diferencias siendo la tasa de incidencia del grupo vacunado (Rv) 3% mientras que la tasa de incidencia del grupo placebo (Rn) 10%; en contraste, a los seis meses posteriores a la vacunación ambas tasas presentan valores similares, manteniéndose el valor de la tasa de incidencia del grupo vacunado en un 3% y disminuyendo a un 4% la tasa de incidencia del grupo placebo.

Otra forma de analizar los resultados es incorporando el resultado del kit BOVIGAM, es decir agregando al cálculo total de eficacia los animales positivos a PPD bovis pertenecientes solo al grupo placebo, ya que los animales positivos del grupo vacunado podrían corresponder a interferencia vacunal. De esta manera la eficacia a los tres meses posteriores a la vacunación es de un 87% y la tasa de incidencia del grupo placebo (Rn) cambia a un 25%. A los seis meses post vacunación la eficacia se mantiene alta en un 79%, pero la tasa de incidencia del grupo placebo disminuye a un 16%. Cabe señalar que esta última estimación de resultados está sobrestimando la eficacia real, debido a que al grupo placebo se le estarían aplicando dos pruebas diagnósticas y al grupo BCG solo una.

Por lo tanto una aproximación más realista sería utilizar el promedio de ambas eficacias, es decir, el promedio de la eficacia con la prueba DIVA y la eficacia obtenida usando DIVA más BOVIGAM. Esto da como resultado una eficacia estimada de 81,75% tres meses posteriores a la vacunación, mientras que a los seis meses el resultado corresponde a un 47,03%.

Estudios previos de campo presentaron resultados similares; en el caso de Etiopía la eficacia protectora varía entre un 56 a un 68% dependiendo del parámetro con el que evaluaron la eficacia (Ameni *et al.*, 2010). En el caso de México, la eficacia protectora de la vacuna fue de un 59,4% (López-Valencia *et al.*, 2010); cabe agregar que en ambos estudios los animales

inoculados fueron terneros neonatales, mientras que en nuestro estudio se utilizaron vaquillas mayores de 11 meses de edad.

Un hallazgo importante de estos experimentos fue que la vacuna cepa BCG de *M. bovis* contribuye a una menor propagación de la infección en el rebaño, puesto que los animales vacunados presentaban menor cantidad de lesiones compatibles con tuberculosis en el linfonodo torácico y pulmones (Ameni *et al.*, 2010); además que no diseminan *M. bovis* en las secreciones nasales (López-Valencia *et al.*, 2010).

En Nueva Zelanda otro estudio de campo utilizó animales entre los 7 y 28 meses de edad, y calculó una eficacia general de un 67,4% (Nugent *et al.*, 2017), resultado similar al obtenido en nuestro estudio a los 3 meses posteriores a la inoculación. Sin embargo este estudio difiere del nuestro en la metodología ya que los animales fueron inoculados vía oral; además dichos animales se encontraban a libre distribución en un amplio predio con una prevalencia de infección de un 10%, donde existe la presencia de zarigüeyas como reservorio de la infección. Esto difiere de la realidad nacional en la zona de control, en donde la mayoría de los animales se encuentran en confinamiento, con una prevalencia intrapredial en la Región Metropolitana de un 71,8% (Paredes, 2008) y no se ha reportado la existencia de fauna silvestre que actúe como reservorio de la infección (Max *et al.*, 2011).

Una explicación para la disminución observada en la eficacia de la vacuna a los seis meses posteriores a la inoculación, podría ser un descenso en la tasa de transmisión de la enfermedad en el rebaño, ya que en el predio tienen como política la eliminación de los animales que resulten positivos al diagnóstico de tuberculosis, que en el contexto del ensayo corresponde a la prueba DIVA. Esto tiene como consecuencia una baja cantidad de animales al final del estudio, dificultando una adecuada evaluación de la eficacia real de la vacuna. No obstante, hay que considerar que estos resultados corresponden solo a la realidad de una lechería, por lo tanto es necesario realizar más estudios en campo con respecto al tema.

En la literatura se describe a la pre exposición a micobacterias no tuberculosas (MNT), como una de las causas más importantes de la baja eficacia de la vacuna BCG en humanos (Jenkins *et al.*, 2017), pero en el ganado este motivo no afectaría negativamente la eficacia de la vacuna, sino más bien al contrario favorece al rebaño al provocar que los animales vacunados y expuestos a las MNT presenten una menor cantidad de tejidos afectados por tuberculosis en el examen *post mortem* (Thom *et al.*, 2008). Sin embargo en este estudio esta causa queda

desestimada al considerar el resultado favorable de la vacunación a los tres meses posteriores a la inoculación.

Al analizar los niveles de INF- γ para los diferentes antígenos evaluados, se observa que a los tres meses posteriores a la inoculación, los valores de INF- γ para PPD avium, PPD bovis y PC-EC presentan valores más elevados en el grupo vacunado que en el grupo control, aunque no existieron diferencias significativas en las medias de ninguno de los antígenos evaluados. A los seis meses ocurre un escenario similar, donde los niveles de INF- γ para todos los antígenos evaluados fueron mayores en el grupo vacunado con cepa BCG, pero tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Resultados similares se obtuvieron en un estudio donde se midieron los niveles de INF- γ en respuesta a la vacunación en vaquillas de lechería (Milián-Suazo *et al.*, 2011) en donde los niveles de INF- γ eran ligeramente superiores en el grupo vacunado; sin embargo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados, aunque cabe señalar que en dicho estudio también evaluaron la vacunación con cepa BCG y diferentes potenciadores de la vacuna.

Un inconveniente del uso de la vacuna BCG, es que interfiere con el diagnóstico tradicional de tuberculosis. Esta interferencia se ha estimado que puede llegar a un 80% de terneros vacunados diagnosticados como positivos con la prueba única cervical comparativa a los seis meses posteriores a la vacunación. Se estima que la interferencia desaparece entre los 12 y 18 meses posteriores a la vacunación (Buddle *et al.*, 2018).

Por ello si se utiliza la vacunación con cepa BCG como estrategia para el control de la tuberculosis bovina, resulta necesario en primera instancia el uso de la prueba DIVA para un adecuado diagnóstico. Dicha prueba ha demostrado ser altamente sensible y específica comparada con la tuberculina (Vordermeier *et al.*, 2016).

Por lo tanto la vacunación podría ser una alternativa para el control de tuberculosis bovina en países en vía de desarrollo como nuestro país, donde no es posible la estrategia de diagnóstico y sacrificio de los animales infectados debido a que el plan nacional de control y erradicación no contempla la compensación económica al productor.

CONCLUSIONES

Tres meses posteriores a la vacunación con cepa BCG de *M. bovis* existe un alto nivel de protección reflejado en la eficacia de un 81,75% y en que existe una asociación significativa ($p < 0,05$) entre la condición de infección y el grupo al que pertenece el animal, a pesar de que no se observan tales diferencias en los niveles de secreción de INF- γ entre grupo control y vacunado.

Por otro lado, a los seis meses después de la vacunación el nivel de protección disminuye a un 47,03% de eficacia, sin embargo mantiene un nivel aceptable de protección aunque no existan diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las otras variables evaluadas (niveles de secreción de INF- γ y condición de infección).

Por lo tanto la vacunación con cepa BCG de *M. bovis* podría ser una alternativa para el control de tuberculosis bovina en vaquillas de pre-encaste, generando protección en el ganado a los tres y seis meses posteriores a la inoculación.

BIBLIOGRAFÍA

ABALOS, P.; RETAMAL, P. 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 23:583-594.

ACHA, P.; SZYFRES, B. 2001. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 3a ed. Washington D.C., USA. Pan American Health Organization, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. pp 283.

AMENI, G.; VORDERMEIER, M.; ASEFFA, A.; YOUNG, DB.; HEWINSON, RG. 2010. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. Clin. Vaccine Immunol. 17:1533–1538.

BARBIER, E.; ROCHELET, M.; GAL, L.; BOSCHIROLI, M. L.; HARTMANN, A. 2017. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. PLoS ONE, 12(4), e0176315.

BUDDLE, BM.; LIVINGSTONE, PG.; DE LISLE, GW. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. N. Z. Vet. J. 57:173–180.

BUDDLE, BM.; HEWINSON, RG.; VORDERMEIER, HM.; WEDLOCK, DN. 2013. Subcutaneous administration of a 10-fold-lower dose of a commercial human tuberculosis vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Danish, induced levels of protection against bovine tuberculosis and responses in the tuberculin intradermal test similar to those induced by a standard cattle dose. Clin. Vaccine Immunol. 20:1559–1562.

BUDDLE, BM.; VORDERMEIER, HM.; CHAMBERS, MA.; DE KLERK-LORIST, LM. 2018. Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. Front. Vet. Sci. 5:259.

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.

DOMINGO, M.; VIDAL, E.; MARCO, A. 2014. Pathology of bovine tuberculosis. Res. Vet. Sci. 97: 20-29.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). 2013. Scientific opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. EFSA J 11: 3475.

JENKINS, AO.; MICHEL, A.; RUTTEN, V. 2017. Original Mycobacterial sin, a consequence of highly homologous antigens?. Vet. Microbiol. 203:286-293.

LAHUERTA-MARIN, A.; GALLAGHER, M.; MCBRIDE, S.; SKUCE, R.; MENZIES, F.; MCNAIR, J.; MCDOWELL SW.; BYRNE, AW. 2015. Should they stay, or should they go? relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. Vet. Res. 46:1-7.

LOPEZ-VALENCIA, G.; RENTERIA-EVANGELISTA, T.; DE JESUS WILLIAMS, 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.

MAX, V.; PAREDES, L.; RIVERA, A.; TERNICIER, C. 2011. National control and eradication program of bovine tuberculosis in Chile. Vet. Microbiol. 151:188-191.

MILIÁN-SUAZO F, GUTIÉRREZ-PABELLO JA, BOJORQUEZ-NARVÁEZ L, ANAYA-ESCALERA AM, CANTÓ-ALARCÓN GJ, GONZÁLEZ-ENRÍQUEZ JL, CAMPOS-GUILLÉN J. 2011. IFN-g response to vaccination against tuberculosis in dairy heifers under commercial settings. Res. Vet. Sci. 90:419-24.

NUGENT, G.; YOCKNEY, IJ.; WHITFORD, J.; ALDWELL, FE.; BUDDLE, BM. 2017. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 208:181-189.

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

REYES P.; ROJAS H.; URCELAY S. 2012. Aportes al control de la tuberculosis bovina en Chile. Informe final, Consorcio Lechero. Osorno, Chile. 98 p.

RODRIGUEZ-CAMPOS S.; SMITH NH.; BONIOTTI MB.; 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.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 2014. Ocurrencia de la *Tuberculosis Bovina* en Chile. (2000-2014). [en línea]. < http://www.sag.cl/sites/default/files/ocurrencia_tb_2000_2014_ar-mv.pdf.>

THOM M., HOWARD C., VILLARREAL-RAMOS B., MEAD E., VORDERMEIER M., HOPE J. 2008. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. Tuberculosis (Edinb). 88:324-334.

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: 1254-1260.

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.

WATERS WR, PALMER MV, BUDDLE BM, VORDERMEIER HM. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. Vaccine. 30:2611-2622.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). 2017. World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. [en línea]. <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist>.

ANEXO

Figura 1: Esquema de estimulación de las muestras para la incubación previa al test ELISA INF- γ .

	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 B1	PPDa B2	PPDa B3	PPDa B4	PPDa B5	PPDa B6	PPDa B7	PPDa B8	PPDa B9	PPDa B10	PPDa B11
C	CN(-)	PC-EC C1	PC-EC C2	PC-EC C3	PC-EC C4	PC-EC C5	PC-EC C6	PC-EC C7	PC-EC C8	PC-EC C9	PC-EC C10	PC-EC C11
D	CN(-)	RV3615 D1	RV3615 D2	RV3615 D3	RV3615 D4	RV3615 D5	RV3615 D6	RV3615 D7	RV3615 D8	RV3615 D9	RV3615 D10	RV3615 D11
E	CC	Nil E1	Nil E2	Nil E3	Nil E4	Nil E5	Nil E6	Nil E7	Nil E8	Nil E9	Nil E10	Nil E11
F	CC	PW F1	PW F2	PW F3	PW F4	PW F5	PW F6	PW F7	PW F8	PW F9	PW F10	PW F11
G	PPDb A12	PPDa B12	PC-EC C12	RV3615 D12	Nil E12	PW F12	PPDb A13	PPDa B13	PC-EC C13	RV3615 D13	Nil E13	PW F13
H	PPDb A14	PPDa B14	PC-EC C14	RV3615 D14	Nil E14	PW F14	PPDb A15	PPDa B15	PC-EC C15	RV3615 D15	Nil E15	PW F15

CC: Control de conjugado; CP: Control Positivo; CN: Control Negativo; PPDb: Derivado proteico purificado bovino; PPDa: Derivado proteico purificado aviar; PC-EC: Cóctel de péptidos; RV3615: Cóctel de péptidos UK; NIL: PBS/Tampón Solución Fosfato Salina; PW: Mitógeno Pokeweed.

