



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

**Evaluación de la eficacia de la vacuna BCG para la prevención de la
infección por *Mycobacterium bovis*, en vaquillas de una lechería de la
Región Metropolitana, Chile**

Constanza Valentina Ávila García

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

PROFESOR GUÍA: Dr. PATRICIO RETAMAL MERINO

Convenio SAG-FAVET

SANTIAGO, CHILE

2021



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

**Evaluación de la eficacia de la vacuna BCG para la prevención de la
infección por *Mycobacterium bovis*, en vaquillas de una lechería de la
Región Metropolitana, Chile**

Constanza Valentina Ávila García

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

Nota Final: _____

Profesor Guía: Dr. Patricio Retamal	Nota: _____	Firma: _____
Profesor Corrector: Dr. Pedro Ábalos	Nota: _____	Firma: _____
Profesor Corrector: Dr. Mario Duchens	Nota: _____	Firma: _____

SANTIAGO, CHILE

2021

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Jacqueline y mi padre Leonardo, por su apoyo incondicional, su amor y darme la oportunidad de estudiar lo que siempre soñé.

A mi abuelita Florencia y mi tía Lilian, sin su cobijo no podría ser este sueño posible.

A mi compañero de toda la vida Francisco, por su amor, respeto y contención cuando más lo necesité.

A mis amigos y colegas, por los momentos inolvidables e impulsarnos mutuamente a continuar.

Finalmente, a mis profesores guías los Dres. Patricio Retamal y Pedro Ábalos, por permitirme formar parte de este importante proyecto y guiarme en el último paso de mi carrera.

ÍNDICE

RESUMEN	II
ABSTRACT.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Agente etiológico.....	3
Patogenia.....	3
Situación mundial	4
Situación nacional.....	5
Vacunación cepa BCG.....	6
Prueba DIVA - ELISA IFN- γ	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Sujetos de estudio	10
Toma de muestra.....	10
Procesamiento	11
Interpretación resultados.....	12
Consideraciones de Bioseguridad y Bioética.....	13
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN.....	19
BIBLIOGRAFÍA	20
ANEXOS	27

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, un patógeno con potencial zoonótico de distribución mundial, que impacta al sector pecuario provocando pérdidas productivas, restricciones en la exportación de alimentos de origen pecuario y representa una amenaza para la salud pública mundial. En todo el mundo se realizan esfuerzos para controlar y erradicar la enfermedad, siendo esta en Chile de carácter endémico, con una distribución heterogénea a lo largo del país, en donde la zona central es la de mayor prevalencia de la enfermedad y cuyo control a través del “programa nacional de control y erradicación” basado en el beneficio de los animales reactivos a la prueba cutánea de la tuberculina, ha sido muy difícil producto de la falta de compensación para el productor por los animales eliminados. En este marco, la vacunación con la cepa Bacillus Calmette-Guerin (BCG) (única vacuna autorizada contra la tuberculosis humana) se estudia en entornos de transmisión natural para su potencial aplicación como una herramienta de apoyo al programa.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la vacuna BCG cepa rusa a los 15 y 18 meses post inoculación, en un plantel lechero de alta prevalencia de TBb (>23%) de la Región Metropolitana. De un grupo de 122 vaquillas de 11 meses de edad, fueron inoculadas 62 con una dosis de $2 - 8 \times 10^5$ UFC vía subcutánea y 60 animales con solución salina como grupo control, los que fueron seguidos a lo largo del tiempo determinándose su condición de infección mediante la medición de la liberación de la citoquina interferón- γ en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) con los antígenos DIVA (por sus siglas en inglés: *differentiating infected from vaccinated animals*) ESAT 6, CFP10 y Rv3615c, los que se expresan en la cepa patógena pero no en la cepa vacunal.

La eficacia, entendiéndose como el porcentaje de reducción de la incidencia de infección atribuible a la vacunación, a los 15 meses post inoculación fue de 23% y a los 18 meses 100%. Aunque no se obtuvo significancia estadística en las variables analizadas, los resultados son alentadores, demostrando que la vacuna podría ser una herramienta de control complementaria al programa nacional en predios con alta prevalencia, donde la actual política de diagnóstico y eliminación no es rentable para los productores.

Palabras claves: BCG, Tuberculosis bovina, eficacia, Chile.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis (TBb) is mainly caused by *Mycobacterium bovis*, a pathogen with zoonotic potential of worldwide distribution, which impacts the livestock sector causing production losses, restrictions on the exportations and represents a threat to public health globally. Efforts are being made in all the world to control and eradicate the disease, which is endemic in Chile. In this country, the disease has a heterogeneous distribution, where the highest prevalence affects the central area. The National Control and Eradication Program is based on the culling of skin test reactor animals, although difficulties have been observed because the producers do not receive monetary compensation for those eliminated animals. In this context, vaccination with the Bacillus Calmette-Guerin (BCG) strain (the only licensed vaccine against human tuberculosis) is studied in a natural transmission condition for its potential application as a program support tool.

The objective of this study was to evaluate the efficacy of the vaccine BCG russia strain - at 15 and 18 months post inoculation, in a dairy herd with a high TBb prevalence (> 23%) in the Metropolitan Region. A group of 122 11-months-old heifers were enrolled in this study, from which 62 were inoculated with a $2-8 \times 10^5$ CFU subcutaneous dose, and 60 animals with saline solution as a control group. These animals were followed over time, determining their condition of infection through the interferon- γ release in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using DIVA antigens (differentiating infected from vaccinated animals) ESAT 6, CFP10 and Rv315c, which are expressed in the pathogenic strain but not in the vaccine strain.

Efficacy, understood as the percentage of reduction in the incidence of infection attributable to vaccination, at 15 months after inoculation was 23% and at 18 months was 100%. Despite statistical significance was not determined, the results are encouraging, showing that the vaccine could be a complementary control tool to the national program in farms with high prevalence, where the test and slaughter strategy is not profitable for producers.

KEYWORDS: BCG, Bovine tuberculosis, efficacy, Chile.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa crónica con potencial zoonótico, causada principalmente por el patógeno *Mycobacterium bovis*. La enfermedad genera pérdidas económicas significativas, estimadas en más de 3 mil millones de dólares anuales a nivel mundial al afectar la salud del ganado, reduciendo la productividad, restricciones de movimiento, sacrificio de animales infectados y restricciones comerciales de exportación (Waters *et al.*, 2012). El ganado es el principal reservorio de *M. bovis*, constituyendo una fuente de infección para los seres humanos que se encuentran en contacto directo con animales enfermos y, aunque es poco frecuente, la tuberculosis zoonótica causa aproximadamente 2000 muertes humanas por año en todo el mundo (Idranil y Bandyopadhyay, 2019).

Debido a este impacto en el sector pecuario y de salud pública, se han generado programas para su control y erradicación en todo el mundo, basados principalmente en la detección de los animales infectados a través de la prueba de la tuberculina y en el saneamiento de los predios a través del beneficio. Sin embargo, estos programas de control no han sido asequibles o socialmente aceptables en muchos países en desarrollo y más del 94% de la población mundial vive en países en los que el control de la tuberculosis en el ganado es limitado o ausente (Buddle *et al.*, 2018).

Basándose en estas estrategias de “diagnóstico y eliminación”, en Chile, desde el año 2011 se ha implementado un programa de control y erradicación de la TBb, en donde se dividió al país en 2 zonas en base a la prevalencia de la enfermedad y se estableció como metas hacia el año 2028 la erradicación de la tuberculosis en todos los rebaños ubicados en la zona de erradicación y la reducción de la prevalencia a menos de 1,3% en la zona de control. No obstante, el programa no ha obtenido los resultados esperados en la zona de control, donde la política de beneficio de los animales reactivos no es económicamente viable, registrando prevalencias intra-prediales de un 71,8% en la RM, siendo ésta la segunda región con mayor incidencia de presentación de la enfermedad a nivel país, registrándose la mayor cantidad de reactores en las comunas de Melipilla y María Pinto (Max *et al.*, 2011).

A raíz de esto, resulta relevante evaluar la eficacia de la vacunación como una posible herramienta de control complementaria al programa nacional, y si bien actualmente no hay vacunas registradas contra la TBb en ganado doméstico, existe un creciente interés en su uso a partir de la comprensión del impacto que genera la enfermedad y la dificultad para su control. Las pruebas realizadas con la vacuna BCG anteriores a este estudio, han evidenciado que un potencial problema de la vacunación es que induce reactividad de la prueba cutánea de la tuberculina tras la inoculación (Nugent *et al.*, 2018). Sin embargo, estos problemas pueden ser subsanados en conjunto con una prueba de diagnóstico capaz de discriminar entre los animales vacunados infectados y vacunados no infectados, como es la prueba ELISA INF- γ con antígenos DIVA.

Es por esto que se lleva a cabo el presente estudio de campo en un predio lechero de alta prevalencia de presentación de la enfermedad, para probar la eficacia de la vacuna BCG como una potencial herramienta complementaria al programa de control y erradicación de la TBb en Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Agente etiológico

Mycobacterium bovis es el agente causal principal de la tuberculosis bovina, pertenece al complejo *M. tuberculosis*, que comprende *M. tuberculosis* (principal agente causal de la tuberculosis humana), *M. canettii*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti* y *M. caprae*, causantes de la infección en otras especies. Estos agentes están estrechamente relacionados filogenéticamente, comparten más del 99,9% de identidad cromosómica (Romha *et al.*, 2018). Además, han evolucionado a partir de un ancestro común a través de deleciones sucesivas de DNA, lo que resulta en la especiación y en sus diferencias de patogenicidad (Bigi *et al.*, 2019).

M. bovis es un bacilo Gram positivo, aerobio estricto, inmóvil, no formador de esporas y ácido-alcohol resistente (Idranil y Bandyopadhyay, 2019). Puede persistir hasta varios meses en el suelo y otros materiales (ej.: alimento, heces), particularmente en condiciones frías, oscuras y húmedas; no obstante, la exposición a la luz UV y temperaturas sobre 65 °C durante al menos 30 minutos la inactiva (CFSPH, 2019).

La bacteria se excreta a través de la orina, las heces, la leche y el semen de los animales infectados. La ruta de transmisión más común entre los animales es por inhalación, señalándose, además, la ingestión, la vía vertical y coital como otras formas de transmisión menos frecuentes. En humanos, *M. bovis* se transmite principalmente a través de la ingestión de productos lácteos no pasteurizados o por contacto directo durante el beneficio o la necropsia (Idranil y Bandyopadhyay, 2019).

Patogenia

La bacteria en el hospedero expresa mecanismos de virulencia que le permiten sobrevivir en el ambiente intracelular de los macrófagos (células dianas de la infección) induciendo la formación de un mecanismo de contención que se conoce como “complejo primario”, que es una lesión granulomatosa avascular, principalmente en el pulmón y el linfonodo regional. En esta etapa hay una elevada respuesta celular y liberación de INF- γ , sin embargo, en condiciones de inmunodepresión la bacteria puede multiplicarse y diseminarse al resto del organismo (Vásquez, 2018), generando una enfermedad crónica progresiva caracterizada por el desarrollo de “tubérculos” en diferentes tejidos del hospedero

infectado, los cuales son abscesos con focos necróticos, caseosos o calcificados en consistencia (Idranil y Bandyopadhyay, 2019; Mekonnen *et al.*, 2019). Generalmente se necesitan varios meses para que la enfermedad desarrolle signos clínicos, o bien se mantiene un estado asintomático en el que los signos no se desarrollan durante años (Firdessa *et al.*, 2012).

Situación mundial

M. bovis forma parte de la vigilancia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), siendo un patógeno del grupo 3 de riesgo, que involucra organismos que causan enfermedades graves en humanos o animales y pueden extenderse a la comunidad o la población animal, para los cuales hay profilaxis y tratamientos disponibles (Sahli *et al.*, 2018; Idranil y Bandyopadhyay, 2019). A mediados del siglo XX se introdujeron programas de “diagnóstico y eliminación” para su control en varios países, logrando buenos resultados. Muchos lograron erradicar la enfermedad como es el caso de Australia, Islandia, Groenlandia, Singapur, algunas naciones europeas e Israel (Waters *et al.*, 2012; Sahli *et al.*, 2018). No obstante, en países desarrollados como Canadá, el Reino Unido, Estados Unidos, Nueva Zelanda, permanecen importantes focos de infección en la vida silvestre, en donde estos programas no han tenido éxito (Kennedy, 2017; Sibhat *et al.*, 2017). Actualmente, más de 40 especies de vida silvestre pueden albergar *M. bovis*, lo que junto con el movimiento del ganado infectado entre los continentes, ayuda a propagar la infección (Idranil y Bandyopadhyay, 2019) siendo las regiones de África, Medio Oriente y América Latina, las que presentan mayor prevalencia (CFSPH, 2019).

Entre enero de 2017 y junio de 2018, 82 de los 188 países (44%) que notificaron a la OIE su situación respecto a la tuberculosis bovina, se habían visto afectados. De estos, 51 países (62,2%) indicaron que la enfermedad sólo había afectado al ganado, 29 países (35,4%) al ganado y fauna silvestre y 2 países (2,4%) sólo fauna silvestre. Entre los países que notificaron la ausencia de la enfermedad, la mayoría (82%) registró la aplicación de por lo menos una de las medidas de prevención pertinentes (vigilancia activa, sacrificio sanitario total o parcial y el control de desplazamiento de los animales) (Murai *et al.*, 2019).

Situación nacional

En Chile la patología es clasificada por la OIE como “enfermedad clínica demostrada” y por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) como “enfermedad presente” de denuncia obligatoria. En el año 2009 se realizó una zonificación del país en función de las tasas de prevalencia (Max *et al.*, 2011; SAG, 2019):

- **Zona I:** de presentación esporádica. Incluye desde la Región de Tarapacá a la de Coquimbo. Presenta el 1,4% de la población bovina nacional.
- **Zona II:** de presentación endémica, con una prevalencia predial media a alta y niveles de infección intra-rebaño altos. Incluye desde la Región de Valparaíso hasta la del Biobío. Corresponde al 15% de la población bovina nacional.
- **Zona III:** de presentación endémica con prevalencia predial baja y prevalencias intra-rebaño bajas, aunque algunos rebaños presentan tasas altas. Incluye las regiones de la Araucanía y de los Lagos, exceptuando Chiloé y Palena. Se concentra el 74,6% de la población bovina nacional.
- **Zona IV:** de presentación esporádica con muy baja prevalencia, tanto a nivel predial como intra-rebaños; existen áreas sin infección. Corresponde a las provincias de Chiloé y Palena de la Región de los Lagos y las regiones de Aisén y de Magallanes. Presente el 9,1% de la población bovina nacional.

Con estos datos, en el año 2011 surgió el “Plan Nacional de Control y Erradicación”, el que pretende, en un plazo de 17 años, reducir la prevalencia a menos de 1,3 % en todos los rebaños de la denominada “zona de control” que abarca las zonas II (de prevalencia media a alta) y erradicar la tuberculosis bovina de la denominada “zona de erradicación” correspondiente a las zonas I, III y IV (de baja prevalencia). Para ello el programa se basa en 3 estrategias principales: detección de los rebaños infectados, cuarentena del rebaño infectado y posterior limpieza de la infección a través del beneficio y el control de movimiento de animales (Max *et al.*, 2011; SAG, 2019).

Los últimos estudios comprendidos entre los años 2000 - 2014, aplicado a 12.168 predios bovinos del país, demostraron una incidencia a nivel nacional de un 0,76%, siendo la Región Metropolitana la 2ª región con mayor incidencia a nivel del país (SAG, 2019).

Vacunación cepa BCG

BCG es la única vacuna registrada contra la tuberculosis en humanos, desarrollada por Calmette y Guérin a partir de una cepa de *M. bovis* aislada de un caso de mastitis tuberculosa. En 1919 se demostró que esta cepa es atenuada y confiere protección al ganado contra el desafío experimental con *M. bovis* (Buddle *et al.*, 2018). Desde entonces, distintas cepas son comercializadas existiendo entre ellas diferencias en sus secuencias genómicas, utilizándose en Chile la vacuna BCG cepa rusa (Vásquez, 2018).

Diversos estudios realizados a lo largo del tiempo, tanto experimentales como de campo, han concluido que:

- Es más efectiva cuando se administra a terneros neonatales y hasta las 6 semanas de edad, que a animales mayores (Parlane *et al.*, 2014). Los terneros no vacunados tienen un riesgo 2,4 veces mayor de infectarse con *M. bovis* en comparación con los vacunados (Valencia *et al.*, 2010).
- La aplicación vía subcutánea es más eficaz cuando se administra a bajas dosis (10^4 - 10^6 UFC) y por vía oral en dosis más altas (10^8 UFC) (Buddle *et al.*, 2018; Nugent *et al.*, 2018).
- La protección inducida disminuye entre uno y dos años después de la vacunación (Ameni *et al.*, 2017; Buddle *et al.*, 2018).
- La revacunación en un intervalo corto no mejora la eficacia y pareciera reducir el nivel de protección (Waters *et al.*, 2012), mientras que, la revacunación a los 2 años después de la vacunación inicial, cuando la inmunidad del animal ha disminuido, aumenta la protección (Parlane *et al.*, 2014).
- Si bien la protección no es completa, la vacuna reduce las lesiones de la enfermedad y disminuye la tasa de transmisión de la infección al disminuir las excreciones de bacilos (Valencia *et al.*, 2010).
- La pre-sensibilización de animales con micobacterias ambientales podría afectar la eficacia protectora de la vacuna (Tanner *et al.*, 2019).

- En los estudios de campo la eficacia protectora ha sido variable: 67,4% en ganado vacunado vía oral en Nueva Zelanda (Nugent *et al.*, 2018); 56% - 68% vacunados vía subcutánea en Etiopía (Ameni *et al.*, 2010); 40% - 59,4% vacunados vía subcutánea en México (Valencia *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha comprobado que esta variabilidad se debe al uso de distintas cepas, altas dosis administradas, exposición previa de los animales a micobacterias ambientales y edad de vacunación (Waters *et al.*, 2012; Vordermeier *et al.*, 2016).
- La vacuna sensibiliza contra la prueba cutánea de la tuberculina bovina (principal herramienta de vigilancia a nivel mundial) los primeros 12 meses después de la vacunación, lo que compromete el uso de esta prueba y el Bovigam IFN- γ , sin embargo, estos problemas pueden superarse con el uso de pruebas de diagnóstico que diferencien a los animales infectados de los vacunados (pruebas DIVA) (Vordermeier *et al.*, 2016; Ameni *et al.*, 2017; Buddle *et al.*, 2018; Nugent *et al.*, 2018).

Prueba DIVA - ELISA IFN- γ

La prueba ELISA IFN- γ se basa en la medición de interferón gamma (IFN- γ), una citoquina liberada por células T sensibilizadas después de la estimulación de sangre con derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina aviar y bovina, lo que se mide mediante ELISA, siendo una prueba altamente sensible. Esta prueba es modificada para acomodar antígenos específicos capaces de diferenciar entre animales vacunados de los realmente infectados, denominados antígenos DIVA (Nugent *et al.*, 2018; Idranil y Bandyopadhyay, 2019).

Según estudios de análisis genómico y del transcriptoma comparativo entre *M. bovis* y *M. bovis* BCG, se han identificado genes deletéreos o mutados en la cepa vacunal, por tanto, los antígenos objetivos para incluir en la prueba son aquellos cuyos genes se expresan en *M. bovis*, pero están ausentes en micobacterias ambientales o la cepa vacunal. Dos de los principales identificados son ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target-6*) y CFP-10 (*Culture Filtrate Protein-10*), cuya expresión está codificada en el loci RD1, ausente en la vacuna. Este cóctel de péptidos aumenta la especificidad de la prueba, sin embargo, la sensibilidad es inferior a la de la tuberculina, por lo que se identificó el antígeno Rv3615c,

codificado en la misma región, el cual aumenta la sensibilidad de la prueba siendo comparable a la de la tuberculina (Vordermeier *et al.*, 2016; Buddle *et al.*, 2018; Nugent *et al.*, 2018; Vásquez, 2018).

Se estima que una buena prueba de detección requiere una especificidad (Sp) de al menos 99,85% y una sensibilidad (Se) mayor o igual a 40% (Vásquez, 2018). Se ha demostrado que la prueba con los antígenos DIVA posee una Sp entre el 94% - 98,9% y una Se entre el 52,2% - 85% (OIE, 2015).

Según Ameni *et al.* (2017) es posible el uso conjunto de las pruebas cutáneas basadas en PPD y ELISA IFN- γ DIVA, para diagnosticar la TBb en el ganado vacunado con BCG, especialmente si se aplica antes de 12 meses después de la vacunación.

Frente a lo anterior, la importancia de controlar la tuberculosis radica en tres pilares fundamentales: las pérdidas económicas, el riesgo de transmisión zoonótica y el bienestar animal. Dada la poco factible eliminación de los animales reaccionantes, agravada por la ausencia de compensación de la autoridad sanitaria al propietario afectado, es esencial mejorar la prevención. En este escenario, resulta fundamental probar la eficacia de la vacuna en ganado infectado naturalmente, en conjunto con pruebas de diagnóstico mejoradas, puesto que estos estudios pudiesen contribuir a disminuir la alta prevalencia en el futuro en los sistemas de producción intensivos de bovinos, los que presentan mayor probabilidad de contagio.

HIPÓTESIS

La vacunación con la cepa BCG de *Mycobacterium bovis* confiere una protección significativa contra la tuberculosis bovina a los 15 y 18 meses post inoculación en vaquillas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la vacunación con la cepa BCG para la prevención de la infección por *Mycobacterium bovis* en vaquillas de una lechería de la Región Metropolitana, a los 15 y 18 meses post inoculación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las tasas de incidencia de tuberculosis bovina en los grupos de animales vacunados y controles, a los 15 y 18 meses post-inoculación.
2. Determinar la eficacia protectora de la inmunización de estos animales a los 15 y 18 meses post-inoculación de la cepa BCG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

Este estudio forma parte del proyecto “Evaluación de la aplicación de la vacuna BCG y la prueba DIVA para la prevención y diagnóstico de la infección por *Mycobacterium bovis* en plantales bovinos de la zona central de Chile” (SAG - FAVET), el que se inició el año 2017. El estudio se llevó a cabo en un predio lechero ubicado en la comuna de María Pinto, provincia de Melipilla, Región Metropolitana, cuya prevalencia de tuberculosis es superior al 23% y es considerado por el SAG como libre de tuberculosis en etapa de crianza. Por tanto, para el inicio del estudio en el año 2017, se consideraron 122 vaquillas de pre-encaste de 11 meses de edad, en las que se determinó su condición de infección a través de la prueba DIVA, y posterior al resultado negativo, se procedió a inocular de forma aleatoria a la mitad del grupo con la vacuna viva atenuada BCG cepa rusa, 0,1 mL (concentración de $2 - 8 \times 10^5$ UFC) vía subcutánea, en el área cervical izquierda de cada individuo. El resto fue inoculado con 0,1 mL de una solución placebo correspondiente a NaCl 0,9%, para ser grupo control. Se hizo un registro de todos los animales en estudio, con la identificación del animal, su fecha de nacimiento, producto inoculado y fecha de inoculación. Fueron muestreados a los 3, 6, 9, 12, 15 y 18 meses post inoculación para determinar su condición de infección, siendo eliminados del estudio a medida que iban apareciendo sujetos positivos a la prueba DIVA. Adicionalmente, hubo pérdidas por muertes o por ventas, por tanto, a los 15 meses post inoculación resultan un total de 78 individuos (promedio de edad 26 meses), 44 de ellos vacunados y a los 18 meses 69 bovinos en estudio (promedio de edad 29 meses), 40 de ellos vacunados.

Toma de muestra

Se obtuvo una muestra de sangre de la vena coccígea, con el sistema de tubos al vacío (*Venoject*), aguja múltiple de 21G x 1,5” y tubos colectores de sangre de 10 mL con heparina de litio como anticoagulante. Una vez obtenida la muestra, se rotuló con el número de identificación del animal DIIO (dispositivo de identificación individual oficial). Se almacenaron las muestras a temperatura ambiente (22 ± 3 °C), en una gradilla, para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Procesamiento

1. Estimulación

En el laboratorio se procedió a estimular las muestras de sangre con los antígenos y reactivos de la prueba DIVA, para la producción de IFN- γ bovino. Se dispensó con puntas de micropipetas estériles p1000 con filtro, 6 alícuotas de 250 μ L de sangre de cada animal muestreado en cada pocillo de placas de cultivo celular estériles de 96 pocillos. Se les adicionó de manera aséptica 25 μ L de cada antígeno estimulador según el esquema que se presenta en el anexo 1.

Antígenos y reactivos:

PPDb: Derivado proteico purificado bovino, antígeno de estimulación.

PPDa: Derivado proteico purificado aviar, antígeno de estimulación

PC-EC: Cóctel de péptidos ESAT-6 y CFP-10, antígenos de estimulación.

Rv3615c: Cóctel de péptidos, antígenos 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 viabilidad celular.

Posteriormente, para mezclar los reactivos con la muestra, se agitaron las placas durante 1 minuto a 600 rpm. Luego, las muestras fueron incubadas por 16 a 24 horas a 37 °C en cámara húmeda.

2. Cosecha de plasmas

Una vez incubadas, para obtener el plasma, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se extrajo al menos 110 μ L de plasma de cada pocillo y se dispensó en placas de cultivo celular no estériles de 96 pocillos, conservando el orden y disposición dentro de la placa. Cada placa se conservó en congelación a -20 °C hasta ser realizado el ensayo ELISA INF- γ .

3. Ensayo ELISA INF- γ

Se midieron los niveles de IFN- γ mediante ELISA con el kit de diagnóstico BOVIGAM 2G. Una vez descongelados los plasmas y reconstituidos los reactivos del kit, se procedió a agregar 50 μ L de Diluyente Verde (buffer para la dilución de los plasmas) y 50 μ L de los controles positivos y negativos en duplicado, se incubaron por 60 minutos en agitación constante a 600 rpm. Luego, se lavaron las placas 4 veces con 300 μ L de Buffer de Lavado, rotando las placas en 180°. Una vez lavadas, se agregaron 100 μ L de Conjugado (Anti-IFN- γ bovino marcado con peroxidasa) y se sometió a incubación por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las placas 4 veces, se agregó 100 μ L de la Solución Enzima Sustrato y se incubó 30 minutos en cámara oscura. A continuación, se agregó 50 μ L de Solución Stop y se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro con filtros de 450/620-650 nm, el cuál arrojó las densidades ópticas (DO) en una planilla Excel para interpretar los resultados.

Interpretación resultados

Se compararon los niveles de IFN- γ a través de la lectura de las DO, arrojando un resultado positivo a *M. bovis*, positivo a la prueba DIVA o negativo. Según el kit, una muestra es positiva a *M. bovis* si la diferencia entre las DO de PPD_b - PPD_a es $> 0,05$ y PPD_b - PBS es $> 0,05$, en cambio, es positivo a la prueba DIVA si la diferencia entre las DO de PC-EC - PBS es $> 0,1$ ó Rv3615 - PBS es $> 0,1$.

La tasa de incidencia (IR) se determinó según lo propuesto por Noordhuizen *et al.* (2001), cuya fórmula corresponde a: $IR = a / b$, en donde “a” corresponde a el número casos nuevos de TB_b durante el período de seguimiento y “b” a la suma de todos los tiempos individuales de observación, es decir, el total de meses que la población estuvo expuesta a contraer la infección. Esto último, se calculó asignando 3 meses-animal en riesgo a cada individuo por muestreo y al ser detectada la infección se asignó 1,5 meses-animal en riesgo para ese período (Henken *et al.*, 2001). Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron calculando la diferencia de la tasa de incidencia, equivalente a un riesgo atribuible o un exceso de riesgo, e intervalos de confianza del 95%, basados en aproximaciones y pruebas de hipótesis nulas (la diferencia de la tasa de incidencia será igual a 0) (Rothman, 2012). El análisis estadístico se realizó con el software R, versión 3.6.1 (R Core Team, 2019) y el paquete “fmsb” (Nakazawa, 2019).

La eficacia de la vacuna (reducción porcentual en la tasa de incidencia de la enfermedad entre los bovinos vacunados en comparación con los no vacunados) se calculó mediante una fórmula proporcionada por la Autoridad Europea de Salud Alimentaria (EFSA, 2013) $EV\% = (R_n - R_v) / R_n \times 100$, en donde R_n corresponde a la tasa de incidencia de la infección en el grupo no vacunado y R_v corresponde a la tasa de incidencia de la infección en el grupo vacunado. La significancia estadística se determinó mediante una prueba de X^2 de Pearson, cuando $p \leq 0,05$.

Consideraciones de Bioseguridad y Bioética

El proyecto se llevó a cabo con todas las normas y medidas para proteger la salud del personal, los animales y el medio ambiente frente a riesgos biológicos, químicos y físicos. Fue indispensable en el trabajo en terreno el uso de elementos de protección personal que incluyen guantes, overol y botas. El manejo de los animales se realizó en bretes de colección colectiva que resguardó la integridad física de los operarios.

Dentro del laboratorio, se rigió por un instructivo con las normas de bioseguridad, el cual comprende uso estricto de delantal y guantes, lavado de manos, desinfección de superficies y materiales y descarte de material contaminado en sus respectivos contenedores.

Para el resguardo del bienestar animal se obtuvo un certificado de bioética y el consentimiento informado de los propietarios.

RESULTADOS

El tamaño muestral a los 15 meses post inoculación correspondió a un total de 78 individuos, 44 de ellos pertenecientes al grupo vacunado (BCG) y los 34 restantes al grupo no vacunado (Control), a los cuales se determinó su condición de infección mediante la prueba DIVA (Anexo 2), interpretando los animales reaccionantes a los antígenos DIVA para efectos del estudio como animales realmente infectados con la cepa patógena. El cálculo de la tasa de incidencia (IR) a los 15 meses post inoculación para el grupo BCG correspondió a 1,45%, considerando 2 animales positivos a la prueba DIVA y un total de 138 meses en que la población estuvo expuesta a contraer la infección. En cambio, para el grupo Control la IR fue de 1,85%, considerando 2 animales reaccionantes a la prueba DIVA y un total de 108 meses-animal en riesgo (Tabla 1). No existió significancia estadística entre las variables analizadas ($p > 0,05$).

Tabla 1: Cálculo tasa de incidencia tras 15 meses post inoculación de BCG en vaquillas de 11 meses de edad determinado por la prueba ELISA IFN- γ con antígenos DIVA.

	<i>BCG</i>	<i>Control</i>
<i>Positivo</i>	2	2
<i>Negativo</i>	42	32
<i>Meses-animal riesgo</i>	138	108
<i>Tasa de incidencia</i>	1,45%	1,85%
<i>p</i>	> 0,05	

El tamaño muestral a los 18 meses post inoculación correspondió a un total de 69 individuos, 40 de ellos pertenecientes al grupo BCG y los 29 restantes al grupo Control, la diferencia en el tamaño muestral con respecto al de los 15 meses se debió a la eliminación del estudio de los animales reaccionantes (4), pérdidas por fallecimiento y venta (2) y el resto a animales no presentes al momento de la toma de muestra. En este período de estudio, se obtuvo una tasa de incidencia (IR) para el grupo BCG de 0%, en donde la población estuvo 120 meses expuesta a contraer la infección no existiendo animales reaccionantes a la prueba DIVA. En cambio, para el grupo Control la IR fue de 1,17%,

considerando 1 animal positivo a DIVA y un total de 85,5 meses-animal en riesgo (Tabla 2). No existió significancia estadística entre las variables analizadas ($p > 0,05$).

Tabla 2: Cálculo tasa de incidencia tras 18 meses post inoculación de BCG en vaquillas de 11 meses de edad determinado por la prueba ELISA IFN- γ con antígenos DIVA.

	<i>BCG</i>	<i>Control</i>
<i>Positivo</i>	0	1
<i>Negativo</i>	39	28
<i>Meses-animal riesgo</i>	120	85,5
<i>Tasa de incidencia</i>	0%	1,17%
<i>p</i>	> 0,05	

Con estos resultados, se determinó la eficacia protectora de la vacunación, resultando a los 15 meses post inoculación, una tasa de incidencia del grupo BCG (R_v) de 1,45% y una tasa de incidencia del grupo Control (R_n) de 1,85%, calculándose una eficacia vacunal (E_v) de 22% (Tabla 3). No existiendo significancia estadística entre las variables cualitativas analizadas ($p > 0,05$) y a los 18 meses post inoculación, en donde se obtuvo una R_v de 3,4% y una R_n de 0%, se calculó una E_v de 100% (Tabla 3). No existiendo significancia estadística entre las variables analizadas ($p > 0,05$).

Tabla 3: Cálculo eficacia vacunal 15 y 18 meses post inoculación de BCG en vaquillas de 11 meses de edad determinado por la prueba ELISA IFN- γ DIVA.

	<i>15 meses</i>	<i>18 meses</i>
<i>R_n</i>	1,85%	0%
<i>R_v</i>	1,45%	3,4%
<i>E_V</i>	22%	100%
<i>p</i>	> 0,05	> 0,05

DISCUSIÓN

Los experimentos y ensayos previos han resultado en un alto grado de variabilidad en la capacidad de BCG para proteger al ganado contra la TBb, que va desde un 0% a un 100% de eficacia (Vordermeier *et al.*, 2016; Buddle *et al.*, 2018; Nugent *et al.*, 2018). En el presente estudio se obtuvo como resultado tasas de incidencia para ambos períodos más bajas en los grupos vacunados en contraste con los grupos control, resultando una eficacia protectora de la vacunación tras quince meses post inoculación de un 22%, y tras dieciocho meses de un 100%, sin embargo, estos valores no son estadísticamente diferentes de los observados en el grupo control.

Cabe destacar que, los animales reactivos en los muestreos anteriores se enviaron a beneficio, lo que podría haber afectado la velocidad de transmisión y sobrestimado la eficacia protectora en este último período en estudio debido a que las vacas estuvieron en contacto con un menor número de ganado infectado. Y si bien, las variables analizadas no obtuvieron significancia estadística, esto se podría deber a que el tamaño muestral de los grupos fue relativamente pequeño, se requieren grupos de mayor tamaño para que los estudios de transmisión den como resultado datos estadísticamente sólidos (Parlane *et al.*, 2014; Thom *et al.*, 2012), además, de una alta tasa de transmisión en los animales de control (Ameni *et al.*, 2010). Esto no se logró en el presente estudio (2/33 y 1/29 animales del grupo control infectados a los 15 y 18 meses respectivamente), por tanto, una baja relación positivo/centinela. No obstante, la eliminación gradual de animales infectados junto con la repoblación con terneros vacunados con BCG puede constituir una estrategia práctica de control en rebaños de alta prevalencia en donde no es viable la despoblación del rebaño a gran escala (Ameni *et al.*, 2010).

Si se contrastan los resultados obtenidos con estudios comprendidos en condiciones de laboratorio, las conclusiones son que BCG induce inmunidad protectora que se mantiene durante al menos 12 meses post vacunación y que a los 24 meses se ve reducida. Según los estudios de Thom *et al.* 2012, en donde se vacunaron terneros de 10 a 29 días de edad con 0,5 mL de BCG cepa danesa, equivalente a $1 - 4 \times 10^6$ UFC, y tras 12 meses (experimento 1) y 24 meses (experimento 2) post vacunación, fueron desafiados con *M. bovis* vía endotraqueal, midiendo la condición de infección a través del examen *post mortem* y cultivo bacteriológico. Se observó a los 12 meses lesiones típicas de TBb en todos los

animales del grupo no vacunado, no así, en los vacunados donde confirió una protección significativa contra la exposición, con una patología macroscópica total reducida y puntuaciones de patología pulmonar significativamente reducidas, existiendo animales sin *M. bovis* viable al cultivo a partir de los tejidos. En cambio, a los 24 meses se observaron lesiones típicas de tuberculosis en todos los animales expuestos independiente de su estado de vacunación y se aislaron bacterias viables de los tejidos de todos los animales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en los desafíos experimentales se coloca *M. bovis* directamente en el tracto respiratorio, siendo un desafío más agresivo que el observado en exposición natural (Parlane *et al.*, 2014) en donde la transmisión de ganado a ganado se produce principalmente a través de la inhalación de gotas con cantidades relativamente pequeñas de bacilos, por tanto, se esperaría que la duración de la protección inducida por la vacuna sea mayor en condiciones naturales de transmisión.

También los resultados se respaldan con estudios realizados en entornos de transmisión natural, como el ensayo de Ameni *et al.* (2010) en Etiopía, en donde 13 terneros Holstein neonatales, fueron vacunados dentro de las 2 semanas post nacimiento mediante inyección subcutánea con 1×10^6 UFC de BCG cepa danesa y los otros 14 como controles negativos. A las 6 semanas post vacunación se trasladaron al rebaño positivo (100% positividad mediante prueba de tuberculina) y fueron seguidos durante 10 a 23 meses. Se analizaron mediante IFN- γ , prueba comparativa de tuberculina, examen post mortem y cultivo bacteriológico, demostrando una eficacia vacunal entre 56% y 68%, sugiriendo que la inmunidad protectora podría mantenerse hasta por 23 meses tras la inoculación.

Asimismo, es avalado por un estudio realizado por Nugent *et al.* (2018) en Nueva Zelanda, donde se analizó 817 bovinos, en 3 cohortes de 1 a 2 años, inoculados la mitad de los bovinos al azar vía subcutánea con 0,1 mL de la vacuna BCG cepa danesa 1331, equivalente a 3×10^5 UFC, los que se sometieron a examen post mortem para búsqueda de lesiones compatibles con TBb y aislamiento bacteriológico para su confirmación resultando en que la vacunación retrasó el desarrollo de la enfermedad, con nuevos casos de lesiones registrados entre 497 y 945 días de exposición en el campo en los no vacunados en comparación con 656 a 908 días en los vacunados, y con una diferencia significativa en la tasa de acumulación de nuevos casos.

En los estudios previos analizados, la protección total manifestada como la ausencia de patología y la falta de cultivo de *M. bovis* de los tejidos rara vez se ha obtenido (Vordermeier *et al.*, 2016), sin embargo, todos estos estudios sugieren que la inmunidad se mantendría alta tras 18 meses post inoculación. Por tanto, se demuestra que las actuales estrategias de control y erradicación podrían llevarse a cabo junto con la vacunación del ganado, ya que es esencial mejorar la prevención para minimizar la transmisión del patógeno. Cabe destacar que la vacunación con BCG de seres humanos contra la tuberculosis se considera una estrategia de control valiosa a pesar de que la vacunación de recién nacidos y lactantes reduce significativamente el riesgo de tuberculosis en solo un 50% en promedio (Buddle *et al.*, 2013).

Otras ventajas que sustenta el uso de la vacuna BCG es que es segura, es barata de producir, al ser administrada por vía subcutánea es fácil de administrar permitiendo una amplia cobertura y si bien no protege al 100% de la infección, reduce la propagación de la enfermedad al disminuir la excreción de bacilos al medioambiente en las secreciones nasales de los animales vacunados. Esto se ha sugerido en estudios realizados bajo exposición natural en rebaños lecheros en México, con una prevalencia de TB del 40%, en donde se inocularon 70 terneros de 1 a 2 semanas de edad vía subcutánea con 1 mL de BCG cepa Tokyo equivalente a 1×10^6 UFC, y los 70 restantes con solución placebo, a los cuales se les realizó una prueba de PCR usando exudados nasales en algunos animales de ambos grupos y se comprobó que todas las reacciones positivas de PCR (5/44) se encontraron en los animales no vacunados (Valencia *et al.*, 2010).

Finalmente, se requieren más estudios para evaluar la eficacia protectora de la vacuna en entornos de transmisión natural, en zonas con diferentes niveles de prevalencia de la enfermedad, fuentes de infección, condiciones ambientales, de manejo predial y distintos métodos de medir la eficacia, particularmente con estudios histopatológicos y de aislamiento bacteriano confirmatorios de la infección. Y con ello poder definir en qué momento disminuye la inmunidad protectora y así poder determinar el momento idóneo para realizar un refuerzo de la vacunación.

CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente ensayo demostró tasas de incidencia menores en los animales vacunados en contraste con el grupo control no vacunado, y eficacias de un 22% tras quince meses post inoculación y de un 100% tras dieciocho meses post inoculación en vaquillas lecheras. Sin embargo, no se obtuvo significancia estadística en los datos analizados, por lo que se debe rechazar la hipótesis del estudio, probablemente como consecuencia del bajo número de animales en estudio.

Por ende, se requieren más investigaciones con un mayor tamaño muestral y una alta tasa de transmisión de la enfermedad para respaldar la vacunación como medida complementaria al programa nacional de control y erradicación en plantales lecheros con alta prevalencia, en zonas en donde las políticas de prueba y sacrificio no son viables debido a los altos costos que esto conlleva para el productor, como es en la denominada zona de control de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

AMENI, G.; TAFESS, K.; ZEWDE, A.; EGUALE, T.; TILAHUN, M.; HAILU, T.; SIRAK, A.; SALGUERO, F.; BERG, S.; ASEFFA, A.; HEWINSON, R.; VORDERMEIER, H. 2017. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. *Transbound Emerg Dis.* 65(1):96–104.

AMENI, G.; VORDERMEIER, H.; ASEFFA, 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(10):1533-1538.

BIGI, M.; VAZQUEZ, C.; CASTELAO, A.; GARCIA, E.; CATALDI, A.; JACKSON, M.; MCNEIL, M.; SORIA, M.; ZUMARRAGA, M.; CABRUJA, M.; GAGO, G.; BLANCO, F.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.; RIBEIRODE, F.; BIGI, F. 2019. Analysing nonsynonymous mutations between two *Mycobacterium bovis* strains with contrasting pathogenic profiles. *Vet Mic.* 239: 108482.

BUDDLE, B.; HEWINSON, R.; VORDERMEIER, H.; WEDLOCK, D. 2013. Subcutaneous Administration of a 10-Fold-Lower Dose of a Commercial Human Tuberculosis Vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin 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(10):1559-1562

BUDDLE, B.; VORDERMEIER, H.; CHAMBERS, M.; KLERK, L. 2018. Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. *Front Vet Sci.* 5:259.

CFSPH THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. 2019. Zoonotic Tuberculosis in Mammals, including Bovine and Caprine Tuberculosis. [en línea]. <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=bovine-tuberculosis>> [consulta: 27-12- 2019].

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

FIRDESSA, R.; TSCHOPP, R.; WUBETE, A.; SOMBO, M.; HAILU, E.; ERENDO, G.; KIROS, T.; YAMUAH, L.; VORDERMEIER, M.; HEWINSON, R.; YOUNG, D.; GORDON, S.; SAHILE, M.; ASEFFA, A.; BERG, S. 2012. High Prevalence of Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle in Central Ethiopia: Implications for the Dairy Industry and Public Health. *PLOS one.* 9(9)e106519.

HENKEN, A.; GRAAT, E.; CASAL, J. 2001. Measurement of Disease Frequency. **In:** Noordhuizen, J.; Frankena, K.; Thrusfiels, M.; Graat, E. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. 2^a ed. Wageningen Academic Publishers. Wageningen, Países Bajos. pp. 63-96.

IDRANIL, S.; BANDYOPADHYAY, S. 2019. *Mycobacterium*. **In:** Antimicrobial Resistance in Agriculture: Perspective, Policy and Mitigation. Academic Press. West Bengal, India. pp. 299-311.

KENNEDY, S. 2017. 120 Years of Tuberculosis Research: An Historical Perspective from the archive of the Journal of Comparative Pathology. *J Comp Pathol.* 156(2)143-146.

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

MEKONNEN, G.; CONLAN, A.; BERG, S.; AYELE, B.; ALEMU, A.; GUTA, S.; LAKEW, M.; TADESSE, B.; GEBRE, S.; WOOD, J.; AMENI, G. 2019. Prevalence of bovine tuberculosis and its associated risk factors in the emerging dairy belts of regional cities in Ethiopia. *Prev Vet Med.* 168:81-89.

MURAI, K.; TIZZANI, P.; AWADA, L.; MUR, L.; MAPITSE, N.; CACERES, P. 2019. Boletín controlar la tuberculosis bovina: un desafío una sola salud. *OIE.* 90 p.

NAKAZAWA, M. 2019. fmsb: Functions for Medical Statistics Book with some Demographic Data. R package versión 0.7.0. [en línea]. <<https://CRAN.R-project.org/package=fmsb>> [consulta: 30-05- 2020].

NOORDHUIZEN, J.; FRANKENA, K.; THRUSFIELDS, M.; GRAAT, E. 2001. Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology. 2ª ed. Wageningen Academic Publishers. Wageningen, Países Bajos. 429 pp.

NUGENT, G.; YOCKNEY, J.; CROSS, M.; BUDDLE, B. 2018. Low-dose BCG vaccination protects free-ranging cattle against naturally-acquired bovine tuberculosis. *Vaccine*. 36(48): 7338-7344.

OIE ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2015. Procedure for Registration of Diagnostic Kits. [en línea]. < <https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/registro-de-los-kits-de-diagnostico/registro-de-kits-de-diagnostico/>> [consulta: 08-07- 2020].

PARLANE, N.; SHU, D.; SUBHARAT, S.; WEDLOCK, D.; REHM, B.; LISLE, G.; BUDDLE, B. 2014. Revaccination of Cattle with Bacille Calmette-Guérin Two Years after First Vaccination when Immunity Has Waned, Boosted Protection against Challenge with *Mycobacterium bovis*. *PLOS one*. 9(9)e106519.

R CORE TEAM. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. [en línea]. <<https://cran.r-project.org/>> [consulta: 30-05- 2020].

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.

ROTHMAN, K. 2012. Epidemiology: An Introduction. 2ª ed. Oxford University Press. Nueva York, Estados Unidos. 280 p.

SAG SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2019. Tuberculosis bovina. [en línea]. <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/tuberculosis-bovina-tb>> [consulta: 25-11- 2019].

SAHLI, H.; MOUELHI, A.; DIOUANI, M.; TLOG, L.; REFAI, A.; LANDOULSI, R.; SAYADI, M.; ESSAFI, M. 2018. An advanced intelligent ELISA test for bovine tuberculosis diagnosis. *Biomed Signal Process*. 46:59-66.

SIBHAT, B.; ASMARE, K.; DEMISSIE, K.; AYELET, G.; MAMO, G; AMENI, G. 2017. Bovine tuberculosis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med.* 147:49-157.

TANNER, R.; VILLAREAL, B.; VORDERMEIER, H.; MCSHANE, H. 2019. The Humoral Immune Response to BCG Vaccination. *Front Immunol.* 10:1317.

THOM, M.; MCAULAY, M.; VORDERMEIER, H.; CLIFFORD, D.; HEWISON, R.; VILLAREAL-RAMOS B.; HOPE, J. 2012. Duration of immunity against *Mycobacterium bovis* following neonatal vaccination with Bacillus Calmette-Guérin Danish: significant protection against infection at 12, but not 24, Months. *Clin Vac Imm.* 19(8): 1254–1260.

VALENCIA, G.; EVANGELISTA, T.; WILLIAMS, J.; NAVARRO, A.; DE LA MORA, A.; MEDINA, G. 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 88:44-49.

VASQUEZ, M. 2018. Implementación y validación de una prueba sanguínea DIVA con antígenos ESAT-6, CFP-10 Y Rv3615c para el diagnóstico de tuberculosis bovina en Chile. Tesis Magister en Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 55 p.

VORDERMEIER, H.; JONES, G.; BUDDLE, B.; HEWINSON, R. 2016. Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Vet Immunopathol.* 181:10-14.

WATERS, W.; PALMER, M.; BUDDLE, B.; VORDERMEIER, H. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine.* 2622 30(16);2611-2622.

ANEXOS

Anexo 1: Esquema de disposición de las muestras a estimular y sus respectivos antígenos y reactivos.

	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	X	NIL A1	NIL A2	NIL A3	NIL A4	NIL A5	NIL A6	NIL A7	NIL A8	NIL A9	NIL A10	NIL A11
F	X	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 A13	PPDb A15	PPDa A15	PC-EC A15	Rv3615 A15	NIL A15	PW A15

CP (+): Control Positivo; CN (-): Control Negativo; 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; PW: Mitógeno *Pokeweed*.

Anexo 2: Resultado de densidades ópticas y su interpretación de condición de infección a los 15 y 18 meses posterior a la vacunación.

ID	DIO	Condición	15 MESES				18 MESES					
			Bov - Av	Bov - Nil	PC-EC -Nil	Rv3615 -Nil	Resultado	Bov - Av	Bov- Nil	PC- EC- Nil	Rv3615- Nil	Resultado
118	01149-8068	BCG	-0,003	0,033	0,013	0,007	NEGATIVO	0	-0,005	0,008	0,003	NEGATIVO
120	01149-8072	BCG	0,019	0,135	0,009	0,002	NEGATIVO	-0,004	0,078	0,016	0	NEGATIVO
121	01149-8070	BCG	0,016	0,074	0,008	0,003	NEGATIVO	0,002	0,03	-0,022	-0,022	NEGATIVO
122	01149-8065	BCG	0,012	0,055	0,006	0,001	NEGATIVO	0,087	0,178	0,022	0,002	NEGATIVO
123	01149-8075	BCG	0,017	0,034	0,005	0,004	NEGATIVO	0,004	0,017	-0,007	-0,013	NEGATIVO
126	01149-8074	BCG	0,03	0,051	0,007	0,001	NEGATIVO	0,006	0,009	0,008	-0,001	NEGATIVO
129	01149-8066	CONTROL	0,013	0,029	0,007	0,004	NEGATIVO	-0,003	0,016	0,005	0,001	NEGATIVO
130	01149-8078	CONTROL	0,015	0,049	0,01	0,002	NEGATIVO	-0,052	0,008	-0,004	-0,004	NEGATIVO
132	01149-8076	CONTROL	0,037	0,07	0,004	-0,008	NEGATIVO	0,007	0,042	0,004	0,001	NEGATIVO
133	01149-8077	CONTROL	0,046	0,074	0,005	0,003	NEGATIVO	-0,001	0,014	-0,01	1,196	DIVA +
196	01149-8081	CONTROL	-0,02	0,074	0,036	-0,006	NEGATIVO					FALLECIDA
197	01149-8086	BCG	-0,008	-0,009	-0,018	-0,017	NEGATIVO	-0,023	0,006	-0,004	0,003	NEGATIVO
198	01149-8090	BCG	0,058	0,395	-0,001	-0,008	NEGATIVO	-0,006	0,026	0,003	-0,003	NEGATIVO
199	01149-8080	BCG	-0,06	0,334	0,057	0,007	NEGATIVO	-0,057	0,147	-0,005	0,004	NEGATIVO
200	01149-8082	CONTROL	-0,039	-0,015	-0,024	-0,018	NEGATIVO	-0,006	0,004	0,015	-0,001	NEGATIVO
201	01149-8087	CONTROL	0,006	0,019	-0,002	0,008	NEGATIVO	-0,026	0,004	0,009	0,014	NEGATIVO
202	01149-8088	CONTROL	-0,118	0,151	0,037	0,005	NEGATIVO	0	-0,015	-0,004	-0,006	NEGATIVO
258	01149-8098	BCG	0,001	0,032	0,012	0,002	NEGATIVO	-0,02	-0,027	-0,017	0,001	NEGATIVO
259	01149-8092	CONTROL	0,029	0,085	0,024	0,006	NEGATIVO	-0,03	-0,006	0,008	-0,002	NEGATIVO
331	01149-8110	BCG	-0,031	-0,016	-0,085	-0,089	NEGATIVO					NO PRESENTE
333	01149-8109	BCG	-0,207	0,198	0,018	0,008	NEGATIVO					NO PRESENTE
383	01149-8116	BCG	0,01	0,048	0,01	0	NEGATIVO					NO PRESENTE
384	01149-8112	CONTROL	-0,1	0,1	0,015	0,004	NEGATIVO					NO PRESENTE

386	01149-8120	CONTROL	0,011	0,041	0,035	0,008	NEGATIVO					NO PRESENTE
387	01149-8122	BCG	-0,014	0,039	0,022	0,012	NEGATIVO					NO PRESENTE
388	01149-8114	BCG	-0,033	0,049	0,014	0,002	NEGATIVO					NO PRESENTE
390	01149-8111	CONTROL	-0,009	0,043	0,012	0,004	NEGATIVO					NO PRESENTE
486	01149-8128	BCG	-0,204	0,041	-0,014	-0,014	NEGATIVO	-0,025	0,065	0,008	0,012	NEGATIVO
490	01149-8129	BCG	-0,049	0,122	0,001	-0,027	NEGATIVO	-0,074	0,05	0,005	0,005	NEGATIVO
492	01139-8134	BCG	-0,253	0,152	0,018	0,023	NEGATIVO	-0,024	0,047	0,013	0,004	NEGATIVO
493	01149-8135	CONTROL	0	0,019	0,002	-0,001	NEGATIVO	-0,01	0,017	0,01	0,005	NEGATIVO
533	01149-8139	CONTROL					NO PRESENTE	2,434	2,824	0,067	0,03	NEGATIVO
535	01149-8144	CONTROL	2,295	3,109	2,342	0,357	DIVA +					
538	01149-8140	BCG					NO PRESENTE	-0,138	0,116	0,006	-0,005	NEGATIVO
649	01149-8165	BCG	-0,044	0,084	0,009	-0,002	NEGATIVO	-0,044	0,084	0,009	-0,002	NEGATIVO
650	01149-8160	CONTROL					NO PRESENTE	0,005	-0,01	-0,008	-0,007	NEGATIVO
651	01149-8150	BCG					NO PRESENTE	0,051	0,078	0,004	0,002	NEGATIVO
652	01149-8152	CONTROL					NO PRESENTE	0,006	-0,013	-0,041	-0,035	NEGATIVO
653	01149-8149	BCG					NO PRESENTE	-0,454	0,153	-0,008	-0,012	NEGATIVO
755	01149-8168	CONTROL	-0,26	0,183	0,001	-0,024	NEGATIVO	-0,105	0,061	0,016	0,006	NEGATIVO
756	01149-8173	BCG	0,04	0,208	-0,003	-0,015	NEGATIVO	0,02	0,159	0,002	0,005	NEGATIVO
757	01149-8172	CONTROL	0,004	0,019	0,004	0,023	NEGATIVO	0,007	0,02	-0,001	-0,003	NEGATIVO
758	01149-8167	BCG	-0,273	0,013	0,071	-0,007	NEGATIVO	-0,238	0,197	0,008	0,006	NEGATIVO
759	01149-8170	BCG	0,139	0,114	0,075	-0,045	NEGATIVO	0,056	0,121	0,001	0	NEGATIVO
760	01608-1733	BCG	-0,023	0,025	0,06	-0,02	NEGATIVO	-0,082	0,022	0,006	-0,002	NEGATIVO
761	01149-8175	CONTROL	0,024	-0,017	0,035	-0,022	NEGATIVO	0,007	0,033	0,009	0,011	NEGATIVO
762	01149-8181	CONTROL	-0,287	0,487	0,051	-0,017	NEGATIVO	-0,258	0,272	0,003	0,002	NEGATIVO
763	01149-8169	BCG	0,206	-0,157	0,393	-0,275	DIVA +					
836	01173-1705	BCG	-0,042	0,057	0,199	0,004	DIVA +					
837	01173-1704	CONTROL	0,252	0,271	-0,039	-0,034	NEGATIVO	-0,014	-0,011	-0,055	-0,029	NEGATIVO
843	01149-8196	CONTROL	-0,107	0,162	0,014	0,009	NEGATIVO	-0,113	0,079	0,005	-0,021	NEGATIVO
844	01149-8194	BCG	-0,229	0,298	0,034	0,056	NEGATIVO	-0,109	0,04	-0,004	-0,005	NEGATIVO

846	01173-1708	CONTROL	-0,062	0,248	0,03	0,016	NEGATIVO	-0,021	0,086	0,09	0,014	NEGATIVO
849	01149-8193	BCG	0,045	0,223	-0,021	-0,01	NEGATIVO	-0,065	0,037	0,052	-0,005	NEGATIVO
850	01149-8189	BCG	-0,471	0,171	0,004	0,038	NEGATIVO	0,078	0,133	-0,019	-0,024	NEGATIVO
854	01149-8191	CONTROL	-0,11	0,519	-0,009	-0,008	NEGATIVO	-0,096	0,033	0,009	-0,01	NEGATIVO
855	01173-1709	BCG	-0,102	0,245	0,011	0,006	NEGATIVO	-0,059	0,061	0,056	0,013	NEGATIVO
856	01149-8188	BCG	0,062	0,101	-0,001	-0,002	NEGATIVO	-0,051	0,033	0,003	0,001	NEGATIVO
916	01173-1711	CONTROL	-0,124	0,047	0,009	0,134	DIVA +					
919	01173-1719	BCG	0,023	0,055	0	0,007	NEGATIVO	0,067	0,147	0,016	0,009	NEGATIVO
920	01173-1720	BCG	-0,075	0,079	-0,096	-0,106	NEGATIVO	-0,071	0,22	0,014	0,005	NEGATIVO
921	01173-1722	BCG	-0,021	0,025	0,011	-0,004	NEGATIVO	-0,054	0,058	0,01	0,008	NEGATIVO
922	01173-1724	CONTROL	-0,323	0,052	-0,025	-0,025	NEGATIVO	0,005	0,02	0,009	0,007	NEGATIVO
923	01173-1725	CONTROL	-1,167	0,253	0,058	0,028	NEGATIVO	-0,069	0,066	-0,001	-0,002	NEGATIVO
924	01173-1726	CONTROL	-0,038	0,04	0,006	0,01	NEGATIVO	-0,021	0,011	-0,003	-0,002	NEGATIVO
926	01173-1731	CONTROL	-0,009	-0,05	-0,075	-0,073	NEGATIVO	-0,05	0,019	-0,006	-0,006	NEGATIVO
927	01173-1732	BCG	0,024	0,214	-0,014	-0,002	NEGATIVO	0,022	0,07	0,001	-0,001	NEGATIVO
928	01173-1733	CONTROL	-0,033	0	-0,031	-0,04	NEGATIVO	-0,009	0,005	-0,017	-0,006	NEGATIVO
930	01173-1735	BCG	0,1	0,169	-0,01	0,023	NEGATIVO	0,015	0,053	0,003	0,005	NEGATIVO
981	01173-1748	BCG	-0,101	0,064	-0,006	-0,002	NEGATIVO	-0,166	0,182	0,042	0,013	NEGATIVO
982	01173-1750	CONTROL	0,224	0,305	0,039	0,023	NEGATIVO					NO PRESENTE
983	01173-1749	BCG	-0,019	0,083	-0,001	0	NEGATIVO	-0,076	0,164	0,017	0,006	NEGATIVO
984	01173-1737	CONTROL	-0,511	0,346	0,004	-0,024	NEGATIVO					VENDIDA
985	01173-1743	BCG	0,022	0,061	0,001	0,002	NEGATIVO	-0,041	0,119	0,025	0,011	NEGATIVO
986	01173-1747	BCG	0,033	0,252	-0,004	0,019	NEGATIVO	0,082	0,246	0,018	0,001	NEGATIVO
988	01173-1739	BCG	0,018	0,017	-0,002	-0,004	NEGATIVO	0,04	0,094	0,011	0,002	NEGATIVO
989	01173-1738	CONTROL	0,002	0,045	-0,002	0	NEGATIVO	-0,068	0,171	0,043	0,019	NEGATIVO
990	01173-1744	BCG	0,015	0,065	-0,002	-0,002	NEGATIVO	0,041	0,118	0,056	0,04	NEGATIVO
991	01173-1741	CONTROL	0,012	0,08	0,017	0,018	NEGATIVO	0,104	0,195	0,071	0,012	NEGATIVO
1072	01173-1757	CONTROL	-0,028	0,023	-0,012	-0,007	NEGATIVO	0,012	0,017	0,008	0,002	NEGATIVO
1076	01173-1756	BCG	0,121	0,206	0,005	0	NEGATIVO	0,05	0,084	-0,02	-0,053	NEGATIVO

1077	01173-1754	CONTROL	-0,024	0,051	0	-0,001	NEGATIVO	0,025	0,042	-0,011	-0,015	NEGATIVO
1079	01173-1765	BCG	0,015	0,12	-0,014	-0,042	NEGATIVO	0,155	0,214	-0,012	-0,023	NEGATIVO
1080	01173-1753	BCG	-0,134	0,092	-0,022	-0,037	NEGATIVO	0,049	0,145	0,032	0,007	NEGATIVO