



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Agronomía y Veterinaria



**“TUBERCULOSIS BOVINA: EVALUACIÓN DEL
EFECTO BOOSTER DE LA TUBERCULINA EN LOS
RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE ELISA”**

Autor: Rocchi Guido Andrés
Director: Magnano Gabriel
Co-Directora: Macías Analía

Río Cuarto
Noviembre 2023



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Trabajo Final de Grado Presentado para Optar al título de Médico
Veterinario

Modalidad: Proyecto de Investigación

**“Tuberculosis Bovina: evaluación del efecto booster de la
tuberculina en los resultados de la técnica de ELISA”**

Rocchi Guido Andrés.

DNI: 37.816.688

Director: M.V. PhD Magnano Gabriel.

DNI: 17.160.733

Co-directora: M.V. PhD Macías Analía.

DNI: 28.853.041

Río Cuarto – Córdoba

Noviembre 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN.

Título del Trabajo Final: “Tuberculosis Bovina: evaluación del efecto booster de la tuberculina en los resultados de la técnica de ELISA”.

Autor: Rocchi Guido Andrés.

DNI: 37.816.688

Director: M.V. PhD Magnano Gabriel.

Co-directora: M.V. PhD Macías Analía.

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Sturniolo Carolina Andrea

Moiso Nicolás Edgardo

Fecha de Presentación: ____/_____/____.

Secretaria Académica

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a mis papás Luís y Mónica, que con mucho sacrificio y voluntad dieron lo mejor de sí para brindarme la posibilidad de formarme profesionalmente, permitiéndome cumplir uno de mis más grandes objetivos en la vida, el ser Médico Veterinario. Tampoco quiero dejar de mencionar a mis hermanos Camilo y Albertina que siempre estuvieron y están para mí, brindándome su apoyo incondicional y demostrándome que nada es imposible si uno lucha por conseguir lo que quiere. Siempre voy a seguir sosteniendo que la Familia es uno de los pilares fundamentales en la vida de cualquier persona.

También voy a aprovechar para agradecerles a mis amigos, a los que uno cosecha en la Universidad y de los que son para toda la vida, a esos que se aguantaron mis días buenos y malos pero que jamás me soltaron la mano, gracias por los consejos, por las risas, por las innumerables charlas compartidas y por esos miles de momentos que seguro quedarán guardados para siempre en mí corazón, gracias por su amistad incondicional.

No quiero dejar de agradecerle a mi querida Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme cobijado durante todo este tiempo y por demostrarme que una Universidad Pública, Gratuita, de Calidad y que nos incluya a todos es posible, también al Grupo Rumiantes por darme la posibilidad de pertenecer, por brindarme un espacio de enseñanza continuo, tanto en lo profesional como en lo personal, por permitirme conocer otras realidades y por su calidez humana.

A mi director Tati Magnano y a mi Co-directora Analía Macías por acompañarme y brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo este Trabajo Final de Grado, gracias por la paciencia y el compromiso de siempre.

Cierro estos agradecimientos con una frase que me gusta mucho, “Un día, sin darte cuenta estarás en el lugar en el que siempre quisiste estar”.

MUCHAS GRACIAS!!!

ÍNDICE:

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Técnicas diagnósticas realizadas:	14
• Técnica de Intradermorreacción (IDR):	14
• Toma de muestra de sangre:	17
• Técnica de ELISA:	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	31

RESUMEN

La Tuberculosis Bovina es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico que afecta a los bovinos y otras especies de animales domésticos, silvestres y también al hombre. El éxito de su erradicación y los programas de control se basan en la detección temprana de los animales positivos y su posterior eliminación. El diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos. Los primeros comprenden el aislamiento bacteriológico, histopatología, y PCR y los segundos la técnica de intradermorreacción (IDR), el dosaje de gamma interferón y la técnica de ELISA.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar, mediante una técnica de ELISA, la variación en la respuesta inmune humoral previa y posterior a la inoculación de la PPD bovina en animales intradermorreacción positivos y negativos.

El mismo se llevó a cabo en bovinos adultos de dos establecimientos lecheros, uno con alta prevalencia de TBB (campo A) y otro libre de la enfermedad (campo B). Se utilizaron para el estudio 114 animales del campo A, que fueron positivos a la IDR y 55 animales del campo B, los cuales fueron negativos a la prueba.

Al día 0 se realizó la primera toma de muestra de sangre, momentos antes de la inyección de PPD-B para la realización de la IDR, el segundo sangrado se llevó a cabo 14 días posteriores y el último, 28 días post inoculación del PPD-B. A partir de las muestras de suero se realizó la técnica de ELISA con un Kit desarrollado por el equipo de trabajo de TBB del INTA Castelar.

En el establecimiento A, al día 0 del muestreo, 17 animales (15%) fueron positivos a la técnica de ELISA y 97 (85%) negativos, al día 14, 65 animales (57%) resultaron positivos y 49 negativos (43%) y al día 28, observamos 35 sueros positivos (31%) y 79 negativos (69%) para la misma técnica. En el establecimiento B ningún animal resultó positivo a la técnica de ELISA en ninguno de los tres muestreos realizados.

Los resultados mostraron lo esperado en todos los casos, el promedio y los máximos individuales alcanzaron su mayor valor en la prueba a los 14 días, algo menor a los 28 días y por último los menores al día 0 de la IDR. Cuando analizamos el comportamiento de la prueba de ELISA en el establecimiento B, ninguno fue clasificado como positivo.

PALABRAS CLAVES: Tuberculosis, Bovinos, Técnica de intradermorreacción, Técnica de ELISA.

ABSTRACT

Bovine Tuberculosis is an infectious and contagious disease of chronic nature that affects cattle and other species of domestic, wild animals, and humans as well. The success of its eradication and control programs relies on the early detection of positive animals and their subsequent elimination. Diagnosis can be carried out through direct and indirect methods. The former includes bacteriological isolation, histopathology, and PCR, while the latter involves the intradermal skin test (IDR), gamma interferon assay, and the ELISA technique.

The present study aims to evaluate, using the ELISA technique, the variation in humoral immune response before and after the inoculation of bovine PPD in intradermal test-positive and negative animals.

The study was conducted in adult cattle from two dairy farms, one with a high prevalence of bovine tuberculosis (Field A) and the other free from the disease (Field B). A total of 114 animals from Field A, positive to the IDR, and 55 animals from Field B, negative to the test, were used for the study.

On day 0, the first blood sample was taken just before the injection of PPD-B for IDR. The second blood sampling was performed 14 days later, and the last one was conducted 28 days post-inoculation of PPD-B. Serum samples were subjected to the ELISA technique using a kit developed by the TBB team at INTA Castelar.

In Field A, on day 0, 17 animals (15%) tested positive for the ELISA technique, and 97 (85%) tested negative. On day 14, 65 animals (57%) were positive, and 49 (43%) were negative, while on day 28, 35 sera (31%) were positive, and 79 (69%) were negative for the same technique. In Field B, no animals tested positive for the ELISA technique in any of the three samplings.

The results showed the expected pattern in all cases, with the averages and individual maximum values reaching their peak at 14 days, slightly decreasing at 28 days, and lowest at day 0 of the IDR. When analyzing the ELISA test behavior in Field B, none were classified as positive.

KEYWORDS: Tuberculosis, Bovines, Intradermal skin test, ELISA technique.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis Bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa, de curso crónico que afecta a los bovinos y otras especies de animales domésticos, silvestres y también al hombre. (Thoen y Blood, 1995). Su presencia en la población bovina limita la potencialidad del sector ganadero, con consecuencias negativas sobre la rentabilidad, el comercio interno y externo, la calidad de las proteínas producidas, el consumo de subproductos y la salud humana.

Se estima que las pérdidas debidas a TBB en la Argentina, alcanzan los 63 millones de dólares al año, siendo el principal componente la pérdida de peso en los bovinos (36% del total), las pérdidas en producción de leche (13%) y el decomiso en frigoríficos y mataderos (10%) (SENASA, 2012).

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) es el principal agente etiológico de la tuberculosis en humanos, pero se estima que *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), principal agente causal de la tuberculosis en bovinos, es responsable de aproximadamente un 0,3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo (Müller y col., 2013).

Actualmente, la tuberculosis (TB) en humanos continúa siendo la causa más frecuente de muerte en adultos por un único agente infeccioso en los países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Argentina aproximadamente unas 10.000 personas por año se enferman de TB (World Health Organization, 2012), y un porcentaje de ellas es debido al contagio de la enfermedad a través de los animales.

La TB en humanos producida por *M. bovis* ha sido considerada desde hace varios años como una de las principales zoonosis, más aún cuando actualmente se ha comprobado la transmisión humano-humano en pacientes HIV positivos (Aguirre y col., 2007). Esto ha generado mayor preocupación y cautela sobre posibles fuentes de infección a través de los alimentos de origen animal, provenientes de áreas donde aún existe la tuberculosis bovina (Aguirre y col., 2007).

El género *Mycobacterium* comprende bacilos aerobios, Gram+, no móviles ni esporulados, de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm de tamaño, dependiendo la especie. La pared celular es rica en lípidos, que en algunos casos alcanza hasta el 60% del peso seco de la misma, lo que convierte a la superficie en hidrofóbica y a la micobacteria en resistente a muchos desinfectantes y tinciones de rutina (Murray y col., 1999; Angala y col., 2014).

La principal ruta de transmisión de *M. bovis* en los bovinos es la exposición a aerosoles de animales infectados. También el contagio puede ocurrir por vía digestiva a través de agua o alimentos contaminados o por la leche de madres infectadas con *M. bovis*, siendo menos frecuente que la vía respiratoria (Menzies y Neill, 2000; Magnano y col., 2008a). La transmisión transmamaria cobra mayor importancia en terneros con sistemas de crianza en guacheras (Schneider y col., 2007; SENASA, 2012). Otras posibles rutas de infección, pero menos probables, son las vías cutánea, congénita y genital (Thoen y Blood, 1995; Murray y col., 1999; Michel y col., 2010), (Imagen 1).

La existencia de reservorios silvestres cobra mayor importancia en países en donde la tuberculosis ha sido erradicada del ganado bovino o en donde las prevalencias de la enfermedad son muy bajas. En países en vías de desarrollo, como Argentina, en donde existen áreas con elevadas prevalencias de la enfermedad en los bovinos, este es un factor de riesgo de menor importancia. Sin embargo, existe escaso conocimiento sobre la implicancia de la fauna local y el comportamiento de la enfermedad.

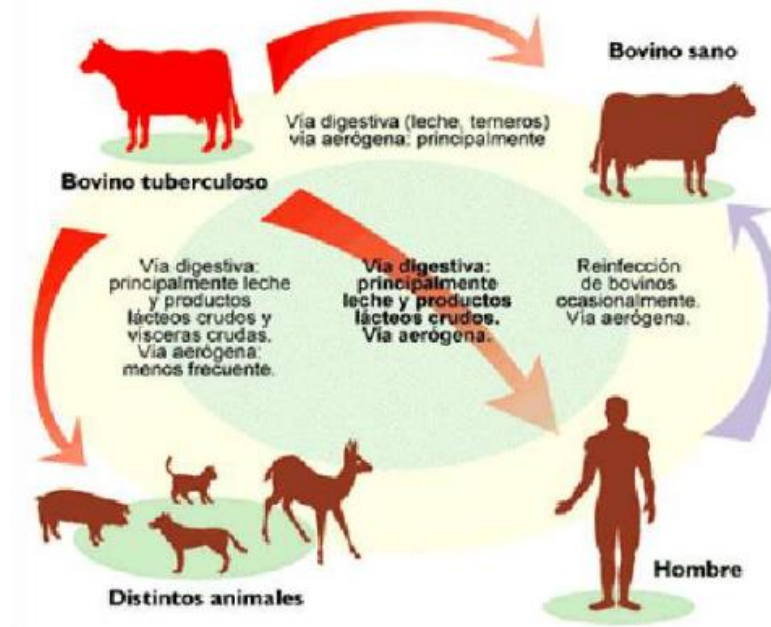


Imagen 1: Rutas de transmisión de *M. bovis*.

Los factores de riesgo que contribuyen a la transmisión de la enfermedad son principalmente independientes del hospedador. Entre los más importantes se destaca el tipo de producción, las prácticas de manejo, el movimiento de animales, la densidad de bovinos en un área determinada, la existencia de reservorios silvestres (Elias y col., 2008; Green y col., 2008; Porphyre y col., 2008) y posiblemente las diferencias de virulencia en la cepa actuante (Andreevskaia y col., 2007).

La TBB es una enfermedad difícil de controlar debido a la falta de vacunas, la presencia de reservorios de vida silvestre y la ausencia de una prueba diagnóstica con suficiente sensibilidad y especificidad que permita detectar animales enfermos en diferentes etapas de la infección. El éxito de su erradicación y los programas de control se basan en la detección temprana de todos los animales reaccionantes positivos y su posterior eliminación del rodeo. (Carneiro y col, 2021).

Según Abdala (1998) la TBB en los rodeos, puede ser combatida eficientemente sólo a través de programas de control y erradicación. En nuestro país, estos se basan en la aplicación de la prueba de intradermoreacción (IDR) a todo el rodeo en forma repetida (cada 60 - 90 días), en la eliminación de los animales positivos y en una adecuada vigilancia epidemiológica (VE). Los animales reactivos a la IDR deberán ser eliminados del rodeo destinándose a sacrificio en forma inmediata para evitar la

diseminación a otros bovinos. La segregación de reactores dentro del establecimiento o en rodeos sanitarios por un período intermedio hasta su eliminación es una alternativa que permite paliar el efecto económico negativo que implica su descarte.

Argentina cuenta, desde el año 1999, con un Plan Nacional de Control y Erradicación de la TBB; el mismo ha sido modificado por última vez en el año 2012 (SENASA Resolución N°128/2012) y entre otros cambios se han incorporado al control las especies caprina y ovina, y se ha implementado obligatoriamente el Sistema de Vigilancia Epidemiológica en faena.

La prevalencia de la enfermedad suele ser más elevada en los rodeos lecheros que en los de carne, debido a su vida útil más prolongada y al mayor contacto de los animales entre sí. En la Argentina se puede estimar fundamentalmente a través de la información de decomisos en frigoríficos o por resultados de las tuberculinizaciones en diferentes regiones.

El diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos. Los primeros se basan en la determinación de la presencia del agente en las lesiones típicas que produce en los tejidos afectados y comprenden: aislamiento bacteriológico, histopatología, baciloscopia (visualización del *M. bovis* a través de la coloración de Ziehl Neelsen) y la detección del antígeno bacilar por sondas de ADN a través de la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR). Algunas desventajas de estas técnicas son: el aislamiento bacteriológico es lento y dificultoso, la histopatología se realiza sobre tejidos de animales muertos, mientras que la PCR es de alta confiabilidad, pero de elevado costo. La baciloscopia y el aislamiento no siempre logran detectar el *M. bovis* y en el caso de esta última, el cultivo demanda un mínimo de 60 días. Es por ello que los métodos directos no son adecuados para el diagnóstico a nivel rodeo. Los métodos indirectos son: la técnica de intradermorreacción (IDR), el dosaje de gamma interferón y la detección de Ig G por enzimoimmunoensayo (ELISA). Todos ellos evalúan la respuesta inmunitaria que produce el agente infeccioso en el huésped. Los dos primeros evalúan la respuesta de base celular (linfocitos T y macrófagos), mientras que el ELISA mide la inmunidad de tipo humoral (anticuerpos) (Abdala A. 1998).

Estas técnicas son más prácticas y se adecuan al diagnóstico en rodeos. No obstante, tienen un margen de error que no les permite detectar el 100 % de los animales enfermos ni el 100 % de los animales sanos, pudiéndose observar un porcentaje variable de reacciones falso negativas y falso positivas respectivamente. El ELISA puede utilizarse en forma complementaria a la tuberculina, pudiendo detectar los animales con lesiones tuberculosas extensas, que se comportan como anérgicos ante esta última prueba (Abdala A., 1998).

En nuestro país, la intradermorreacción (IDR) es la única técnica aprobada oficialmente para la detección de la enfermedad en ganado en pie y la comercialización de bovinos. Otras técnicas utilizadas son el dosaje de gamma interferón (IFN γ) y pruebas serológicas (OIE, Terrestrial manual, 2012). Tanto la prueba de intradermorreacción como el dosaje de gamma interferón miden inmunidad de tipo celular, respuesta que se produce después de la infección.

La prueba de IDR o prueba de la tuberculina, evalúa la reacción de hipersensibilidad de tipo retardada que aparece en esta enfermedad, producto de la inoculación intradérmica de una proteína purificada de *M. bovis* (PPD-B).

La respuesta inmune mediada por anticuerpos es baja o ausente en la etapa inicial, incrementándose sustancialmente a medida que la enfermedad progresa, coincidiendo con cuadros patológicos avanzados o terminales, momento en el cual cae la respuesta inmune de tipo celular, resultando negativos a la IDR (Wood y col. 1991) (Imagen 2). Estos son los denominados animales anérgicos, los que representan un gran riesgo epidemiológico ya que mantienen y transmiten la enfermedad en el rodeo sin poder ser identificados con la técnica de rutina. Estos animales podrían ser detectados mediante un análisis serológico que mida inmunidad humoral como por ejemplo el test de ELISA, el cual, complementando estratégicamente a la IDR promueve un sinergismo diagnóstico (Buddle y col. 2013; Casal y col. 2014).

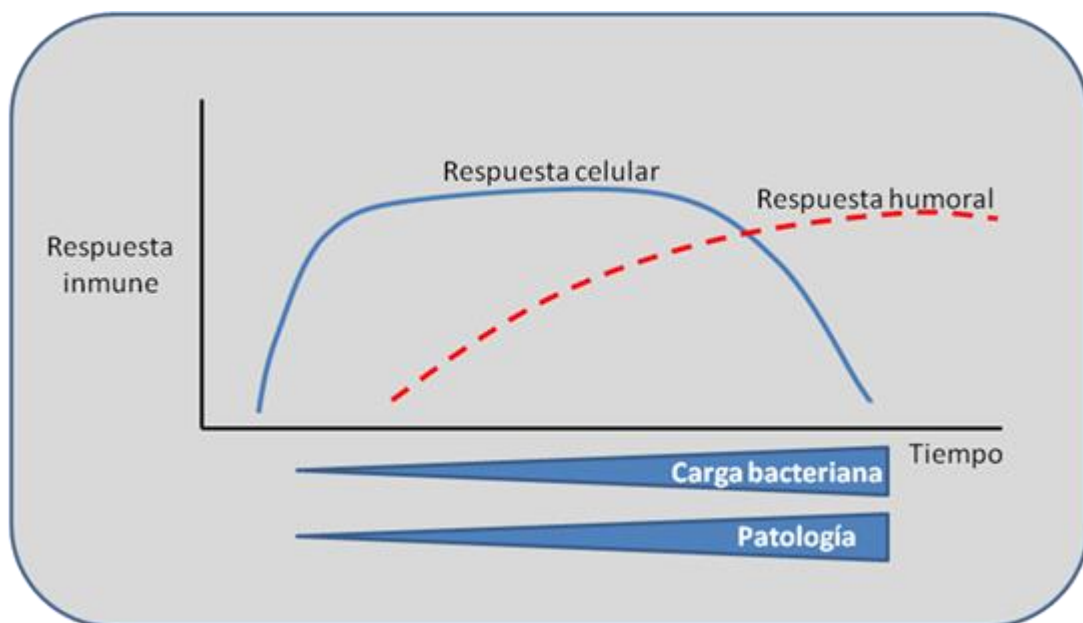


Imagen 2: Representación esquemática que muestra la evolución de las respuestas inmune celular y humoral ante la infección por micobacterias, como así también las variaciones en la carga bacteriana y en el desarrollo de las lesiones, que se producen en un individuo infectado (Adaptado de Pollock y Neill, 2002).

La sensibilidad y especificidad del ELISA han demostrado resultados variables, siendo su sensibilidad una limitante para ser incorporada como única herramienta efectiva en el diagnóstico (Magnano y col., 2013, Garbaccio y col., 2019). Se presenta un amplio rango de sensibilidad, de acuerdo a distintas publicaciones, pudiendo oscilar entre 18% y 90% (Wood y col, 1991). Diferentes variables influyen en la misma: los antígenos utilizados; el contexto epidemiológico de cada animal; el estadio de

la enfermedad; el momento de la recolección de la muestra, en relación con la aplicación de la IDR y su posible efecto booster, entre otros.

Durante años se vienen realizando numerosos intentos para desarrollar test serológicos basados en la detección de anticuerpos contra proteínas micobacterianas como son la MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 ya sean solas o combinadas en la misma técnica diagnóstica (Acosta y col., 2000; Aagaard y col., 2006). Y aunque la sensibilidad diagnóstica de esas pruebas es menor a la deseada, podrían jugar un rol importante en el diagnóstico, especialmente cuando hay animales en diferentes etapas de la infección (Lilenbaum, 2013).

Se ha observado que la respuesta de anticuerpos en animales infectados natural o experimentalmente, aumenta posterior a la aplicación de la tuberculina por lo que algunos autores aconsejan el uso en conjunto de la IDR y las técnicas serológicas para aumentar la sensibilidad de estas últimas (Buddle y col., 2009). Este fenómeno se denomina efecto booster o anamnésico llevando a una mejora de la sensibilidad de estas técnicas (Waters y col.; 2011).

Casal y col., (2014) evaluaron el efecto booster mediante dos técnicas serológicas comerciales: *M. bovis* Ab Test (IDEXX, EE. UU.) y Enferplex™ TB assay (Enfer, Irlanda) en dos rebaños con infección por *M. bovis*. recolectaron muestras de suero al momento de la IDR, 72 hs. y 15 días después de la inoculación. El nivel más alto de detección serológica de animales infectados se alcanzó 15 días después de las pruebas intradérmicas, aprovechando el efecto anamnésico, resultando entre el 66,7% y 85,2% de sensibilidad en ambos rebaños.

En resumen, la aplicación de ensayos serológicos en combinación con pruebas intradérmicas que exploten el efecto anamnésico después de la inoculación de PPD podría ser útil para detectar una subpoblación de animales infectados que pueden no reaccionar a las pruebas cutáneas. Los ensayos serológicos son herramientas de diagnóstico valiosas, especialmente dirigidas al diagnóstico de animales con lesiones visibles. La utilidad de estas técnicas puede verse afectada por la estrategia de uso y el momento de la recolección de muestras.

Con el presente trabajo se pretende generar información sobre la temática del efecto booster de la IDR en el resultado de las pruebas de ELISA, en el cual se involucran establecimientos lecheros de nuestra región con características sanitarias-productivas acordes a nuestra realidad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, mediante una técnica de ELISA, la variación en la respuesta inmune humoral previa y posterior a la inoculación de la PPD bovina en animales intradermorreacción positivos y negativos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar in vivo la respuesta inmune celular mediante la técnica de intradermorreacción con PPD bovina.

- Evaluar los niveles de anticuerpos específicos contra *M. bovis* aplicando la técnica de ELISA antes de la realización de la intradermorreacción.

-Evaluar los niveles de anticuerpos específicos contra *M. bovis* aplicando la técnica de ELISA 14 y 28 días posteriores a la inyección con PPD.

-Analizar los resultados en los diferentes momentos pre y post inoculación del PPD-B.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en bovinos adultos de dos establecimientos lecheros, uno con alta prevalencia de TBB (campo A) donde hubo confirmación diagnóstica de la enfermedad por hallazgos de necropsia, bacteriología y PCR (Imagen 3, 4 y 5). Y el otro (campo B), ubicado a 15 Km al Sureste de Rio Cuarto, libre de la enfermedad desde hace 13 años, no solo a través de la realización regular de la técnica de intradermorreacción, sino que, como en este establecimiento todos los animales se faenan y se inspeccionan en el lugar, al no haberse hallado ninguna lesión compatible con la enfermedad durante estos años, reafirmaría que no hay presencia de la Mycobacteria en el rodeo. También es bueno aclarar que en este tambo la reposición siempre fue interna, salvo en 2 ocasiones donde se compraron 2 toros y 14 vaquillonas con garantía de preñez de otro establecimiento libre, hace aproximadamente 5 años atrás (Imagen 6 y 7).

El establecimiento que se determinó como campo A estuvo en un Plan de Saneamiento acordado con SENASA, donde se planificó el armado de un tambo sanitario y la eliminación progresiva de animales.

Se utilizaron para el estudio 114 animales del total de individuos (300 aprox.) del campo A, que fueron positivos a la IDR y 55 animales de un total de 60, del campo B, los cuales fueron negativos a la prueba.



Imagen 3: Vista externa del galpón donde se alojaba el rodeo general.



Imagen 4: Vista interna del galpón, animales sobre cama compost.



Imagen 5: Patio de comidas del interior del galpón.



Imagen 6: Parte del rodeo general de vacas en ordeño del campo B.



Imagen 7: Vacas del rodeo general en el interior de la sala de ordeño.

Técnicas diagnósticas realizadas:

- **Técnica de Intradermorreacción (IDR):**

Se utilizó el reactivo PPD-B (derivado proteico purificado bovino), elaborado a partir de la cepa de *M. bovis* AN5. El mismo fue producido por laboratorios particulares que poseen el control y la aprobación del SENASA.

Los frascos fueron transportados y conservados entre 2-8 °C, y protegidos de la luz solar directa durante la realización del trabajo de campo.

Procedimientos para la aplicación de la técnica de IDR:

-Instrumental: se utilizaron jeringas automáticas de pequeño volumen (3 ml) graduadas en 0,1 ml; agujas hipodérmicas, reutilizables, calibre 6, longitud de la cánula 5 mm, punta tipo b (bisel corto); guantes y algodón (Imagen 8).



Imagen 8: Materiales utilizados para la aplicación de la técnica de IDR.

-Técnica de IDR: una vez inmobilizado el animal se registró el número del individuo determinado por medio de caravanas. Inicialmente, utilizando un calibre, se procedió a la medición de uno de los pliegues ano caudales internos, lugar donde se realizó la prueba (Imagen 9). Cuando la piel estaba sucia en el punto de inoculación, se limpió con un algodón seco, evitando el uso de desinfectantes o productos químicos que irriten la piel. Posteriormente se procedió a insertar la aguja vía intradérmica e inyectar 0,1 ml de PPD-B (Imagen 10).

La lectura se realizó a las 72 horas post inoculación. Para tal fin se evaluó la existencia de reacción tisular en el área de aplicación del reactivo mediante palpación y posteriormente se procedió a la medición del pliegue con el calibre (Imagen 11 y 12).

Para la interpretación del resultado diagnóstico en cada animal se siguió la reglamentación vigente a nivel nacional establecida por el SENASA (2012) donde la diferencia entre las mediciones previa a la inoculación y al momento de la lectura indicaba el resultado de cada animal: 0-2 mm: Negativo; 3-4mm: Sospechoso y 5 o más: Positivo. También se tuvo en cuenta la presencia de induración (tumorción) en el pliegue inoculado (Imagen 13 y 14).

En el campo A se clasificó a los animales en positivos o negativos y en el campo B se los clasificó como positivos, sospechosos o negativos, según indica la resolución 128/12 del SENASA.

En la planilla de registro (protocolo de tuberculinización), se asentó toda esta información y se indicaron los resultados para cada animal.



Imagen 9: Medición del pliegue ano caudal interno.



Imagen 10: Inoculación intradérmica del PPD-B.



Imagen 11 y 12: Lectura de la IDR mediante palpación y medición del pliegue en el lugar inoculado.



Imagen 13 y 14: Diferentes tamaños de reacciones en animales positivos a la IDR.

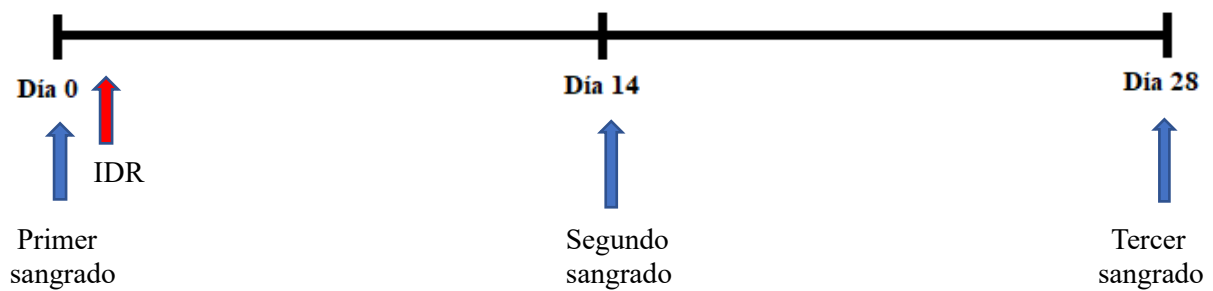
- **Toma de muestra de sangre:**

La toma de muestras de sangre se realizó de vena coccígea o en su defecto de vena yugular, para la cual se utilizaron agujas descartables calibre 25:12 y jeringas de 5ml (Imagen 15). Una vez extraída la sangre se trasvasó hacia tubos de plástico, que se mantuvieron durante una o dos horas a temperaturas de 32-37°C hasta la retracción del coágulo y luego se conservaron refrigerados hasta su traslado al laboratorio por no más de 48hs (Imagen 16 y 17). Una vez allí se extrajo el suero mediante centrifugación y se procedió a conservarlo a menos 18°C hasta la realización de la prueba diagnóstica indicada (Imagen 18).



Imagen 15: Materiales utilizados para la toma de muestra de sangre.

El sangrado se realizó en tres momentos definidos que se describen a continuación:



Al día 0 se realizó la primera toma de muestra de sangre, momentos antes de la inyección de PPD-B para la realización de la IDR, el segundo sangrado se llevó a cabo 14 días posteriores a la aplicación del reactivo y el último, 28 días post inoculación del PPD-B.



Imagen 16: Toma de muestra de sangre de vena coccígea.

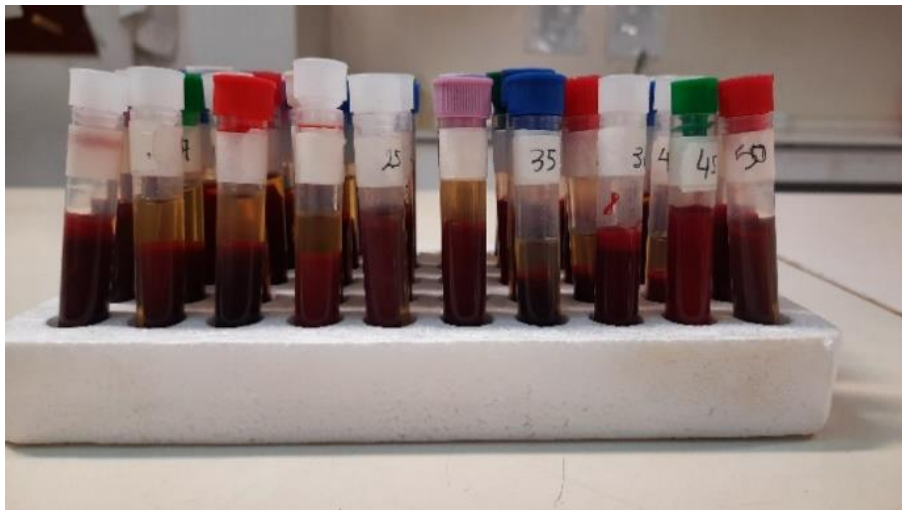


Imagen 17: Muestras de sangre posterior a su extracción, trasvasadas a los tubos.

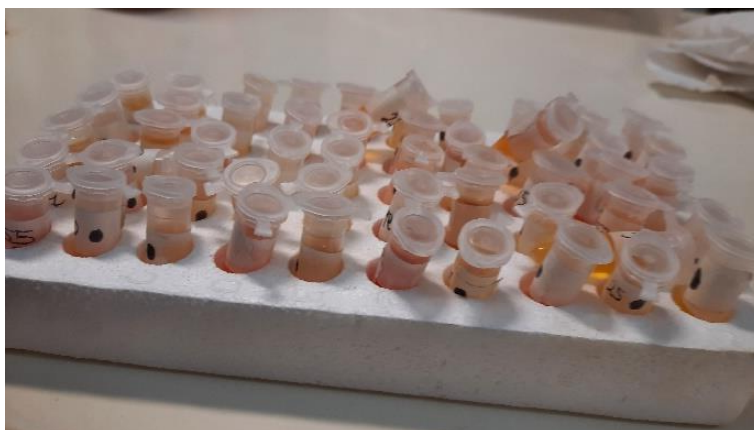


Imagen 18: Extracción del suero para su posterior conservación.

- **Técnica de ELISA:**

A partir de las muestras de suero se realizó la técnica de ELISA con un Kit desarrollado por el equipo de trabajo de TBB del INTA Castelar (Griffa y col. 2020). La misma se llevó a cabo en un laboratorio privado que la efectúa periódicamente. Se tomó como punto de corte para determinar que un animal era positivo una D.O (densidad óptica) de 0,4.

Finalmente se analizaron los datos obtenidos con la prueba de ELISA en los tres momentos mencionados mediante el programa Infostat.

RESULTADOS

En cuanto a la realización de la intradermorreacción, en el campo A los 114 animales muestreados habían resultado positivos a la técnica diagnóstica, mientras que los 55 muestreados en el establecimiento B habían sido negativos a la misma.

Con respecto a los resultados de la técnica de ELISA de ambos establecimientos, los valores individuales de D.O (densidad óptica) se detallan en el anexo 1.

En la tabla 1 se observa la frecuencia absoluta y relativa de animales positivos y negativos a la técnica de ELISA al día 0, 14 y 28 en el campo A y B.

Establecimiento	Resultados	Sangrado		
		Día 0	Día 14	Día 28
CAMPO A	POSITIVO	17 (15%)	65 (57%)	35 (31%)
	NEGATIVO	97 (85%)	49 (43%)	79 (69%)
CAMPO B	POSITIVO	0	0	0
	NEGATIVO	55 (100%)	55 (100%)	55 (100%)

Tabla 1: Valores absolutos y relativos según técnica de ELISA en campos A y B.

En el establecimiento A, al día 0 del muestreo, 17 animales (15%) fueron positivos a la técnica de ELISA y 97 (85%) negativos.

Al día 14, 65 animales (57%) resultaron positivos al ELISA y 49 negativos (43%). Por lo tanto, hubo 51 nuevos positivos respecto al día 0.

Al día 28, observamos 35 sueros positivos (31%) y 79 negativos (69%) para la misma técnica.

Se analizó también el comportamiento individual de resultados positivos en los diferentes muestreos con el fin de determinar si los animales positivos lo fueron a los tres momentos, a dos o solamente en uno de ellos (tabla 2).

De los 17 positivos al día 0, tres de ellos sólo fueron positivos a ese muestreo, resultando negativos a los dos siguientes. De los 14 restantes, 9 fueron positivos en todos los muestreos posteriores, y 5 de ellos resultaron negativos al día 28.

Con respecto a los 35 positivos del tercer muestreo, todos habían sido positivos en el día 14.

Veintiséis animales fueron positivos tanto al segundo como al tercer muestreo y negativos al primero.

De estos, 14 se mantuvieron positivos en el 2° muestreo.

Todos los animales positivos en el tercer muestreo ya habían sido positivos en el 1° (9 bovinos) o 2° muestreo (26 bovinos).

Muestreo a los días	Total de animales
0/14/28	(Nº114)
+/+/+	9
+/+/-	5
+/-/-	3
-/+/+	26
-/+/-	25
-/-/-	46

Tabla 2: Variaciones individuales de resultados positivos de animales pertenecientes al campo A.

Como se observa en la tabla 2, solamente 9 animales repitieron resultados positivos en los tres momentos, indicando que los mismos mantuvieron niveles de D.O superiores al punto de corte. Mientras que el mayor efecto booster lo encontramos en 51 animales que habían dado negativos a la primera prueba y fueron positivos a la segunda y algunos de ellos se mantuvieron con niveles altos al tercer muestreo.

También hacer mención que en tres animales inicialmente positivos no se observó efecto booster. Fueron aquellos que al día 0 resultaron positivos, pero fueron negativos en el segundo y tercer muestreo. Cabe destacar que los valores de densidad óptica en los 3 casos estuvieron al límite del punto de corte con valores de 0,40; 0,42 y 0,44 respectivamente.

En el establecimiento B ningún animal resultó positivo a la técnica de ELISA en ninguno de los tres muestreos realizados.

Se detalla a continuación un gráfico de dispersión en donde podemos observar la distribución de los animales del Campo A y del Campo B en los diferentes momentos del diagnóstico mediante la técnica de ELISA (Gráfico 1).

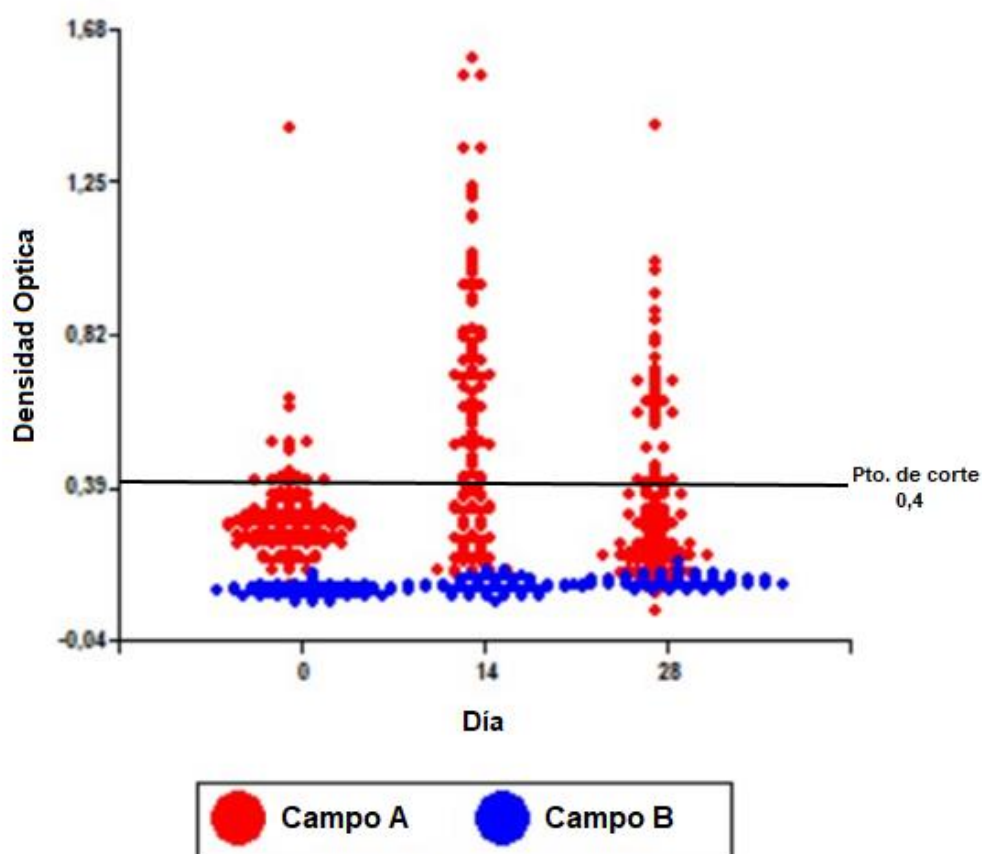


Gráfico 1: Distribución de animales positivos y negativos en cada momento de acuerdo al establecimiento.

Como se puede apreciar, la mayor cantidad de animales positivos a la técnica de ELISA se detecta al realizar el sangrado a los 14 días post inoculación de la PPD bovina.

A continuación (Tabla 3 y 4) se muestran los valores máximos, mínimos y promedio de densidades ópticas observadas en la totalidad de los animales del campo A y en los animales positivos a la técnica de ELISA del mismo establecimiento.

Valores	Día 0	Día 14	Día 28
Mínimo	0,1179	0,1399	0,0389
Máximo	1,3976	1,6034	1,4107
Promedio	0,3107	0,5658	0,3663

Tabla 3: Valores promedios, máximos y mínimos, de densidad óptica referidos a la prueba de ELISA en el total de animales del campo A.

Valores	Día 0	Día 14	Día 28
Mínimo	0,4042	0,4049	0,4067
Máximo	1,3976	1,6034	1,4107
Promedio	0,5269	0,7992	0,6706

Tabla 4: Valores promedios, máximos y mínimos, de densidad óptica referidos a la prueba de ELISA en aquellos animales positivos del campo A.

DISCUSIÓN

En concordancia con lo publicado por otros autores (Casal y col.; 2014; Waters y col.; 2011), en nuestro estudio se observó un importante efecto booster de la tuberculina en los niveles de anticuerpos detectados por la técnica de ELISA. Esos niveles fueron máximos a los 14 días post inoculación del PPD-B, disminuyendo a los 28 días. No obstante, el número de animales positivos a los 28 días, fue mayor que en el día 0 donde se inició el estudio.

Analizando más detalladamente los resultados de los 114 bovinos positivos a la IDR que fueron evaluados, solamente 17 (15%) resultaron positivos a la primera prueba de ELISA previa a la inoculación. Esto indica que los niveles de anticuerpos contra *M bovis*, están por debajo del límite fijado para dar como positivo un animal. Una explicación a ello es planteada por Pollock y Neil (2002), quienes indican que los niveles de anticuerpos, mediante los cuales se mide la respuesta inmune humoral, aumentan con el paso del tiempo post infección y con el desarrollo de lesiones más evidentes. Por lo tanto, estaríamos infiriendo que la infección en los animales del estudio, no llevarían tanto tiempo. Otra conclusión importante que se obtiene con estos datos, es que en ningún caso se debe utilizar las pruebas de ELISA para confirmar o descartar los resultados positivos de la IDR. Esto es debido a que ambas pruebas diagnósticas evalúan diferente tipo de inmunidad, las cuales varían en cada animal a lo largo de la enfermedad.

En el muestreo a los 14 días posteriores a la IDR, se elevó considerablemente el número de positivos, clasificando a 65 (57%) en esa categoría. En este momento fue el máximo de positividad observado. Esto es coincidente con otros autores, Casal y col., (2014) obtuvieron el 66,7% y 85,2% en dos establecimientos lecheros.

En el muestreo de los 28 días, disminuyó el número de animales positivos a ELISA a 35 (31%), con respecto al de 14 días, no obstante, manteniéndose por encima del 15% inicial del día 0.

Como se puede apreciar en el gráfico 1, en el campo A (puntos rojos) el 85% de los bovinos se encontraban por debajo del punto de corte de 0.40, considerados por lo tanto negativos. El restante, 15%, fue positivo. En la segunda columna, día 14, queda claramente demostrado como crece exponencialmente el número de positivos alcanzando el 57% de las muestras. Al día 28 ese porcentaje de positivos desciende al 31%. Mientras que en el mismo gráfico se puede percibir que todos los animales del campo B (puntos azules) nunca superaron el 0.40 de D.O. por lo tanto en los 3 muestreos fueron negativos.

En las tablas 3 y 4 se ven reflejados los valores mínimos, máximos y el promedio de la densidad óptica de la prueba de ELISA en animales del campo A. En el primer caso se refiere al total de animales y en el segundo solamente se incluyen aquellos bovinos que fueron positivos a la prueba. Se puede observar que los resultados mostraron lo esperado, ya que, en todos los casos, el promedio y los máximos

individuales alcanzaron su mayor valor en la prueba a los 14 días, algo menor a los 28 días y por último los menores al día 0 de la IDR.

Cuando analizamos el comportamiento de la prueba de ELISA en el establecimiento B, observamos que ninguno de los 55 bovinos alcanzó la línea de corte del test para ser clasificado como positivo (tabla 1 y gráfico 1). Si bien en este estudio no se dirigió a evaluar la especificidad de la técnica, estos resultados son alentadores ya que la misma se podría utilizar en aquellos campos declarados libres de TBB mediante la prueba oficial que es IDR. Una de las ventajas de las técnicas de ELISA, comparándola con la IDR, es la operatividad, ya que la toma de muestra de suero se puede realizar en el mismo momento que se sangran los animales para el diagnóstico de brucelosis. Reforzando estos resultados negativos, el establecimiento B tiene como antecedentes 13 años de pruebas IDR anuales negativas, no ingresan animales de reposición y en todas las faenas que se realizan para autoconsumo, no se evidenciaron lesiones compatibles con tuberculosis.

Es importante destacar nuevamente que la decisión de realizar la prueba de ELISA a animales PPD positivos en este trabajo fue únicamente con fines de investigación ya que la misma está recomendada para testear animales PPD negativos.

CONCLUSIÓN

La realización de este Trabajo Final de Grado bajo la modalidad Proyecto de Investigación me permitió llevar a cabo la búsqueda y lecto comprensión de información científica disponible sobre el tema abordado y el posterior proceso de elaboración del mismo. Por otra parte, me ayudó a reforzar conocimientos teóricos y prácticos que fueron previamente desarrollados durante mi formación y que pude ponerlos en práctica durante las salidas a campo y el procesamiento de muestras.

Se logró cumplir con éxito el objetivo general y a su vez los objetivos específicos que se plantearon al comienzo de este presente trabajo, dejando ver lo positivo de la combinación de técnicas llevadas a cabo para lograr un sinergismo diagnóstico y de esta manera ser más eficientes a la hora de sanear un rodeo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, C.; Govaerts, M.; Meikle, V.; Vallecillo, A.; Gutierrez-Pabello, J.; Suarez-Güemes, F.; McNair, J.; Cataldi, A.; Espitia, C.; Andersen, P.; Pollock, J. (2006). Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *Journal Clinical Microbiology*, 44(12), 4326-4335.
- Abdala A. (1998). "Tuberculosis bovina". *Revista SANCOR* 56(604), 26-30.
- Abdala, A.; Tarabla, H.; Bertero, S.; Torres, P. (1999). Vigilancia Epidemiológica de la tuberculosis bovina en el Departamento Castellanos, Santa Fe. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(1), 13-14.
- Acosta, B.; Real, L.; Leon, F.; Deniz, S.; Ferrer, O.; Rosario, I.; Ramirez, A. (2000). ELISA for anti-MPB70: an option the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal*, 78(6), 423-424.
- Aguirre, A.; Fernandez, O.; Ferreyra, M.; Savini, A.; Poggio, G. (2007). Tuberculosis humana producida por *Mycobacterium bovis*. *Revista del tórax*, 8(15), 139-147.
- Andreevskaia, S.; Chernousova, L.; Smirnova, T.; Larionova, E.; Kuzmin A. (2007). Impact of *Mycobacterium tuberculosis* genotype on survival in mice with experimental tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza i Boleznei Legkikh*, (7), 45-50.
- Angala, S.; Belardinelli, J.; Huc-Claustre, E.; Wheat, W.; Jackson, M. (2014). The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5), 361-399.
- Buddle B. y col. (2013). Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis from milk samples from dairy cows. *Clin Vaccine Immunol*, 20(12). <https://doi.org/10.1128/CVI.00538-13>.
- Buddle M.; Livingstone, P.; Lisle, G. (2009). Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, 5(4), 173-180.
- Carneiro P. y col. (2021) Study on supplemental test to improve the detection of bovine tuberculosis in individual animals and herds. *BMC Veterinary Research*. 17, 137 <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02839-4>
- Casal C. y col. (2014). Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4), 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.036>.
- De la Rúa-Domenech R. y col. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, γ -interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81(2006). ISSN 0034-5288.

- Elias, K.; Hussein, D.; Asseged, B.; Wondwossen, T.; Gebeyehu, M. (2008). Status of bovine tuberculosis in Addis Ababa dairy farms. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27(3), 915-923.
- Garbaccio S. y col. Enzyme-linked immunosorbent assay as complement of intradermal skin test for the detection of mycobacterium bovis infection in cattle. *Tuberculosis* 117 (2019). ISSN 1472-9792.
- Green, D.; Kiss, I.; Mitchell, A.; Kao, R. (2008). Estimates for local and movement-based transmission of bovine tuberculosis in British cattle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Science*, 275(1638), 1001-1005.
- Griffa N. y col. (2020). Development and diagnostic validation of an ELISA based on an antigenic mixture for the detection of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 256. ISSN 1090-0233.
- Lilenbaum, W. (2013). Tuberculosis: uso de técnicas de inmunidad celular: Gama Interferón versus tuberculina. Uso de ELISA y experiencias de campo. CEBASEV, 10 al 13 de septiembre, Buenos Aires, Argentina.
- Magnano, G.; Macías, A.; Zapata, L.; Schneider, M.; Bérnago, E.; Sticotti, E.; Mació, M.; Rodrigo, I.; Sanchez, M.; Alonso, B.; Giraudo, J. (2013) Evaluación de la sensibilidad de dos técnicas serológicas de elisa en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. XXXII Jornadas de Actualización en Ciencias Veterinarias. Colegio Médico Veterinario de la Provincia de Córdoba.
- Magnano, G.; Schneider, M.; Giraudo, J.; Bérnago, E.; Macias, A.; Sticotti, E.; Macio, M.; Perez Zabala, V.; Centorbi, C. (29-31 de octubre de 2008). Evaluación en la transmisión de la tuberculosis bovina en un rodeo de cría. XVIII Reunión Científica Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Santa Fe, Argentina.
- Magnano, G.; Schneider, M.; Macías, A.; Sticotti, E.; Perez Zavala, V.; Giraudo, J.; Mació, M.; Zumarraga, M. (1 de abril de 2011). Eliminación de micobacterias por vía respiratoria en bovinos positivos a la prueba tuberculínica. V Jornada Científico Técnica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- Menzies, F.; Neill, S. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160(2), 92-106.
- Michel, A.; Borna, M.; van Helden, P. (2010). Mycobacterium bovis at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 371–381.
- Müller, B.; Dürr, S.; Alonso, S.; Hattendorf, J.; Laisse, C.; Parsons, S.; van Helden, P.; Zinsstag, J. (2013). Zoonotic Mycobacterium bovis–induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 19(6), 899-908.
- Murray, P.; Kobayashi, G.; Pfaller, M.; Rosenthal, K. (1999). Microbiología Médica. 2ed. Capítulo 35: *Mycobacterium*. Editorial Harcourt Brace.

- OIE Terrestrial Manual. (2012). Capítulo 2,4 y 7. Bovine Tuberculosis.
- Pollock, J; Neill, S. (2002). *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*, 163(2), 115-127.
- Porphyre, T.; Stevenson, M.; McKenzie, J. (2008). Risk factors for bovine tuberculosis in New Zealand cattle and their relationship with possum control strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 86(1-2), 93-106.
- Schneider, M.; Macias, A.; Magnano, G.; Bérnago, E.; Zumarraga, M.; Perez Zavala, V.; Sticotti, E.; Giraudo, J. (10, 11 y 12 de octubre de 2007). Eliminación de micobacterias por leche en bovinos reactivos a la prueba tuberculínica. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba, Argentina.
- SENASA. (2012). Resolución 128/12 Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Thoen, C.; Bloom, B. (1995). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans. Thoen. C. and Bloom, J. 1ed. Editorial Iowa State University Press, USA, 3-14.
- Waters, W.; Buddle, B.; Vordermeier, H.; Gormley, E.; Palmer, M.; Thacker, T.; Bannantine, J.; Stabel, J.; Linscott, R.; Martel, E.; Milian, F.; Foshaug, W.; Lawrence, J. (2011). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical Vaccine Immunology*, 18(11), 1882–1888.
- Wood, P.; Corner, L.; Rothel, J.; Baldock, C.; Jones, S.; Cousins, D.; McCormick, B.; Francis, B.; Creeper, J.; Tweddle, N. (1991). Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal*, 68(9), 286-90.
- World Health Organization, (2012). Global tuberculosis report. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf

ANEXOS

Anexo 1:

Campo A

ID. Animal	PPD	ELISA		
		Día 0	Día 14	Día 28
2635	POS	0,1905	0,2129	0,1529
2956	POS	0,1179	0,1574	0,1948
2972	POS	0,2900	0,3898	0,3076
3051	POS	0,2922	0,1489	0,1327
3084	POS	0,2976	0,1932	0,1641
3088	POS	0,2740	1,0356	0,5998
3108	POS	0,3219	0,5868	0,1988
3126	POS	0,2612	0,2900	0,2040
3141	POS	0,3721	0,5228	0,5020
3148	POS	0,2761	0,4179	0,1216
3217	POS	0,3253	0,7115	0,6244
3245	POS	0,3591	0,4332	0,2738
3557	POS	0,2319	0,2351	0,1408
5920	POS	0,1680	0,2409	0,2496
6469	POS	0,2469	0,6232	0,4150
6515	POS	0,2365	0,4763	0,2141
7143	POS	0,3750	0,8413	0,7245
7378	POS	0,2805	0,3370	0,1523
7388	POS	0,2895	0,1596	0,1412
7397	POS	0,2734	0,9625	0,6850
7460	POS	0,2456	0,3282	0,1175
7529	POS	0,2266	0,6965	0,3800
7548	POS	0,3361	0,2546	0,3282
7555	POS	0,3035	0,3000	0,2202
7561	POS	0,2578	0,1648	0,1109
7682	POS	0,5238	0,7598	0,6684
7809	POS	1,3976	1,3531	1,4107
7851	POS	0,3809	0,5045	0,2873
7963	POS	0,4042	1,2177	0,2379
7977	POS	0,4110	0,7007	0,3686
8004	POS	0,3341	1,5497	0,6920
8023	POS	0,3018	1,2353	0,4320
8070	POS	0,6221	1,1478	0,3675
8072	POS	0,2096	0,3014	0,3588
8076	POS	0,1859	0,1838	0,1502
8141	POS	0,2276	0,3160	0,2083
8153	POS	0,3670	0,5114	0,4067
8173	POS	0,4247	0,3383	0,2963

8238	POS	0,2727	0,5262	0,2865
8248	POS	0,4199	1,0474	0,9362
8284	POS	0,2476	0,3214	0,2376
8311	POS	0,2761	0,1560	0,0997
8337	POS	0,4895	0,5669	0,1951
8355	POS	0,3063	0,1942	0,1536
8366	POS	0,4072	0,7972	0,3862
8398	POS	0,6424	1,0275	0,5807
8416	POS	0,1628	0,1590	0,1256
8475	POS	0,5191	1,3510	0,6602
8509	POS	0,1916	0,8342	0,3954
8554	POS	0,1568	0,5375	0,4380
8641	POS	0,5149	0,7137	0,7975
8667	POS	0,3334	1,2075	0,6522
8695	POS	0,2738	0,3303	0,1603
8699	POS	0,3213	0,6586	0,6289
8721	POS	0,4428	0,3589	0,2095
8725	POS	0,3504	0,5780	0,2167
8745	POS	0,2450	0,9482	0,8942
8757	POS	0,2308	1,0118	0,6035
8759	POS	0,2570	0,4549	0,3798
8778	POS	0,1806	0,4049	0,0389
8784	POS	0,3154	0,2454	0,2268
8793	POS	0,2406	0,5951	0,1382
8795	POS	0,2038	0,1399	0,1518
8816	POS	0,3325	0,9690	0,4074
8817	POS	0,2481	0,1890	0,2339
8822	POS	0,3491	0,5168	0,2012
8823	POS	0,3051	0,7110	0,5680
8829	POS	0,3215	0,3974	0,3199
8832	POS	0,2636	0,1981	0,2040
8851	POS	0,2583	0,1798	0,2270
8859	POS	0,2877	0,3291	0,2258
8908	POS	0,2568	0,2549	0,1767
8912	POS	0,5204	0,9913	0,8587
8920	POS	0,3088	0,7536	0,4991
8921	POS	0,4066	1,1620	1,0311
8933	POS	0,2948	0,3657	0,1107
8942	POS	0,3647	1,6034	0,7617
8957	POS	0,2826	0,7499	0,2958
8996	POS	0,2886	0,9279	0,7137
9016	POS	0,2501	0,3423	0,1603
9026	POS	0,3482	0,5115	0,3709
9027	POS	0,1599	0,1485	0,0920
9067	POS	0,3411	0,2044	0,1898

9069	POS	0,3075	0,5088	0,2033
9071	POS	0,1894	0,2910	0,1605
9081	POS	0,2302	0,7655	0,3111
9140	POS	0,2763	0,6679	0,3707
9143	POS	0,2841	0,2347	0,1917
9145	POS	0,2983	0,6285	0,4222
9146	POS	0,1996	0,3603	0,3885
9153	POS	0,3376	0,2342	0,1753
9157	POS	0,3087	0,8089	0,2855
9173	POS	0,3729	0,9585	0,6317
9196	POS	0,2270	0,7877	0,6947
9223	POS	0,2997	0,2153	0,1718
9224	POS	0,2922	0,8115	0,5977
9225	POS	0,2648	0,2099	0,1868
9265	POS	0,2513	0,9089	0,8143
9313	POS	0,2034	0,4673	0,3968
9456	POS	0,2311	0,7224	0,3131
9515	POS	0,4055	0,2601	0,2575
9549	POS	0,3095	0,4229	0,2033
9593	POS	0,3028	0,2246	0,1793
9673	POS	0,2043	0,3845	0,2839
9698	POS	0,2380	0,6085	0,2743
9762	POS	0,1775	0,1469	0,2129
28091	POS	0,3049	0,2788	0,3058
28150	POS	0,2784	0,3691	0,2233
28210	POS	0,3186	0,6663	0,6750
28221	POS	0,2884	0,6201	0,3545
28223	POS	0,2756	0,8266	0,3298
28227	POS	0,3264	1,5499	0,9996
28241	POS	0,1821	0,2755	0,2266
28282	POS	0,4060	0,7780	0,4464

Campo B

ID. Animal	PPD	ELISA		
		Día 0	Día 14	Día 28
1	NEG	0,1162	0,1197	0,1214
2	NEG	0,1138	0,1132	0,1426
3	NEG	0,1519	0,1143	0,1256
4	NEG	0,1032	0,136	0,1221
5	NEG	0,1235	0,134	0,1359
6	NEG	0,1184	0,1039	0,1268
7	NEG	0,0957	0,1076	0,1256
8	NEG	0,113	0,1174	0,1123
9	NEG	0,1082	0,158	0,1199
10	NEG	0,1326	0,1296	0,1386
11	NEG	0,1098	0,122	0,142
12	NEG	0,1088	0,0954	0,1756
13	NEG	0,1214	0,1027	0,123
14	NEG	0,1031	0,0941	0,1276
15	NEG	0,0939	0,1143	0,1329
16	NEG	0,0986	0,1132	0,1113
17	NEG	0,1006	0,0948	0,1291
18	NEG	0,1098	0,1252	0,1201
19	NEG	0,1048	0,0959	0,1492
20	NEG	0,0767	0,1063	0,1542
21	NEG	0,1012	0,118	0,1428
22	NEG	0,0742	0,1136	0,1483
23	NEG	0,0904	0,1212	0,1486
24	NEG	0,1065	0,0787	0,1399
25	NEG	0,0994	0,0958	0,1374
26	NEG	0,0832	0,1123	0,1134
27	NEG	0,1243	0,1072	0,1044
29	NEG	0,0848	0,0834	0,1132
30	NEG	0,0747	0,0809	0,1165
31	NEG	0,0765	0,0874	0,1012
33	NEG	0,0889	0,0875	0,1016
34	NEG	0,0802	0,0933	0,1217
35	NEG	0,0702	0,0725	0,1012
36	NEG	0,0971	0,0906	0,1068
37	NEG	0,1077	0,079	0,12
38	NEG	0,0862	0,0818	0,0811
39	NEG	0,0847	0,1105	0,1189
40	NEG	0,103	0,0842	0,1472
41	NEG	0,0779	0,1223	0,1256
42	NEG	0,0835	0,1234	0,1145
43	NEG	0,1019	0,1171	0,1256

44	NEG	0,0889	0,1242	0,1144
45	NEG	0,1023	0,1286	0,1127
46	NEG	0,1056	0,1625	0,1016
47	NEG	0,1278	0,1369	0,1187
48	NEG	0,1079	0,1094	0,1201
49	NEG	0,0917	0,1412	0,1555
51	NEG	0,093	0,1241	0,1214
52	NEG	0,1059	0,1259	0,1329
53	NEG	0,0971	0,1242	0,1284
54	NEG	0,1211	0,1356	0,134
55	NEG	0,1229	0,1227	0,1223

