

## Validación TB FPA

Fernando Rivera<sup>1</sup>, Michael Gilsdorf<sup>2</sup>, Miladin Kostovic<sup>3</sup>

**La identificación precisa de los bovinos infectados con *Mycobacterium bovis* (BTB) constituye la base de un programa eficaz de control y erradicación de enfermedades. Identificar con precisión a los animales infectados es un desafío debido a que las pruebas de BTB actualmente disponibles no son 100 % sensibles o específicas y pueden generar resultados falsos negativos para algunos animales infectados, especialmente durante las etapas temprana y tardía de la enfermedad. Este estudio evaluó la capacidad del ensayo de fluorescencia polarizada BTB (BTB-FPA) para identificar correctamente animales no infectados con BTB y para detectar animales anérgicos BTB en comparación con la prueba de pliegue caudal (CFT), gamma-interferón (IFN- $\gamma$ ), y resultados post mortem.**

**Se compararon los resultados bovinos negativos y positivos de la prueba entre BTB-FPA, CFT, CCT e IFN- $\gamma$ . El BTB-FPA mostró una correlación del 100% para 453 animales con prueba negativa. En 100 animales analizados de un rebaño infectado con BTB, los resultados de CFT, CCT, IFN- $\gamma$  y BTB-FPA variaron significativamente. Hubo desacuerdo entre los resultados de CFT e IFN- $\gamma$  para 56 animales, y los resultados de las tres pruebas solo coincidieron en 10 animales. El BTB-FPA identificó tres animales lesionados de 93 (media de 3% positivos) que fueron negativos según CFT e IFN- $\gamma$  pero positivos según los resultados post mortem (es decir, lesiones visibles de BTB y cultivos positivos). Estos resultados indican que la BTB-FPA es adecuada para identificar animales anérgicos a la BTB en un rebaño infectado.**

### Introduction

La tuberculosis (TB) es una enfermedad zoonótica de 3 millones de años. *Mycobacterium tuberculosis* ancestral mutó en múltiples cepas, incluida *Mycobacterium bovis*, que causa la tuberculosis bovina (BTB). La BTB se puede transmitir entre animales y humanos, y los programas de control/erradicación de la BTB se han implementado desde finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Un derivado de proteína purificada (PPD) de la tuberculina se ha desarrollado y utilizado para test en animales y humanos durante muchos años. Debido a su especificidad, la prueba del pliegue caudal (CFT) es la principal prueba de PPD utilizada para diagnosticar BTB en bovinos. La CFT mide la hipersensibilidad de tipo retardado mediada por células contra la PPD bovina cuando se inyecta en un animal. El CFT no es ideal porque es largo (el tiempo de respuesta es de 72 horas) y su sensibilidad depende de varios factores que a menudo hacen que sea menos sensible. Estos factores pueden estar relacionados con la respuesta inmunológica (infección temprana, anergia o inmunosupresión concurrente), los PPD que se usan (producto expirado,

producto almacenado en condiciones inadecuadas, errores de fabricación, baja potencia, etc.) o metodología (dosis, lugar de inyección, inexperiencia, etc.) y puede dar lugar a falsos negativos. En contraste, la coinfección o la exposición previa a otras micobacterias no tuberculosas relacionadas se han informado como posibles causas de resultados falsos positivos debido a la composición antigénica similar de estas bacterias.

No todos los antígenos de la prueba de tuberculina PPD son equivalentes. La potencia biológica constante entre los ciclos de producción de tuberculina es fundamental para el resultado de esta prueba intradérmica. Se han informado diferencias significativas en el número de animales que dieron positivo usando tuberculina de alta potencia versus baja potencia. Por ello, cada gobierno regula la producción de su PPD tuberculina. Además, los países que son miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Oficina Internacional de Epidemiología (OIE) y/o la Comunidad Económica Europea (UE) han establecido estándares legales mundiales para la producción de tuberculina, el rendimiento de los ensayos de potencia, y pruebas intradérmicas para bovinos. Los países importadores y exportadores deben utilizar estas pruebas cuando comercialicen o transporten ganado a nivel local o internacional. Se han desarrollado y utilizado pruebas BTB alternativas, como la prueba PPD cervical intradérmica comparativa única (SICCT o CCT) y la prueba de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), en combinación con la CFT como

1. Zoolab Laguna, Torreon, Coahuilla, Mexico

2. International Animal Health Solutions, Grad, Maryland, U.S.A.

3. Ellie LLC, Germantown, Wisconsin, U.S.A.

Corresponding author: miladin@ellielab.com

pruebas complementarias o confirmatorias. Mientras que el CFT mide la respuesta de hipersensibilidad de un animal al PPD de los mamíferos, el CCT compara las respuestas a la tuberculina del PPD de los mamíferos (bovino) y las aves. Esto aumenta la especificidad porque la tuberculosis aviar (ATB) puede causar reacciones cruzadas CFT, y ATB no causa la enfermedad grave que *M. bovis* causa en el ganado.

El IFN- $\gamma$  se utiliza para medir la respuesta celular de un animal a la infección por *M. bovis*. La medición de IFN- $\gamma$  tiene algunas ventajas sobre la CFT y la CCT. Por ejemplo, los animales solo necesitan ser manipulados una vez, la prueba puede repetirse inmediatamente y su interpretación es menos subjetiva. Sin embargo, IFN- $\gamma$  también tiene limitaciones que incluyen menor especificidad, especialmente en animales más jóvenes; la necesidad de procesamiento de laboratorio; experiencia sustancial de laboratorio; y costos de prueba significativos.

No todos los animales infectados con BTB desarrollan una respuesta hipersensible o celular detectable. Estos animales se denominan animales anérgicos porque no se detectan con las pruebas estándar de BTB. El desarrollo de anticuerpos ocurre con mayor frecuencia en animales con un estado de enfermedad más avanzado, y es más probable que estos animales sean infecciosos y transmitan la enfermedad a sus compañeros de manada. Se ha teorizado que estos animales no logran desarrollar una respuesta de hipersensibilidad porque su cuerpo está sobrecargado con antígenos de tuberculina circulantes. Por lo tanto, CFT y CCT no detectan animales anérgicos.

Ninguna prueba de BTB o combinación de pruebas puede proporcionar una sensibilidad del 100 % (la proporción de animales infectados detectados por la prueba) y una especificidad del 100 % (la proporción de animales no infectados que se diagnostican como negativos). La sensibilidad y la especificidad estimadas entre varias pruebas de BTB pueden oscilar entre el 55 % y el 99 %.

Se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar una prueba de anticuerpos BTB altamente sensible y específica similar a las que se usan en otros programas de control y erradicación de enfermedades bacterianas, como la brucelosis. Sin embargo, la sensibilidad de tales pruebas depende de que los animales infectados desarrollen una respuesta de anticuerpos. Esto parece ocurrir sólo en las últimas etapas de la enfermedad.

Durante los últimos 20 años, Ellie ha estado investigando cómo y cuándo los bovinos infectados con BTB desarrollan respuestas de anticuerpos. Como un hito reciente en esta investigación, Ellie desarrolló un BTB-FPA, y este documento informa su desempeño preliminar en pruebas con bovinos.

## Materiales y Métodos

### Rebaños

Para detectar si el TB FPA puede detectar animales anérgicos, se tomaron muestras de sangre individuales de bovinos de dos rebaños diferentes. En un rebaño, que estaba ubicado en Serbia, se recolectaron muestras de 453 bovinos que primero se consideraron negativos por CFT y se volvieron a analizar con BTB-FPA.

Una segunda manada, conocida por estar afectada por BTB, se encontraba en México. Cien bovinos CFT-positivos fueron probados utilizando el BTB-FPA. Después de probar a los animales, se sacrificaron y se realizaron necropsias. Todos los animales exhibieron lesiones consistentes con una infección BTB.

Las pruebas de muestras se realizaron utilizando un diseño de estudio simple ciego en el que la información de la muestra (p. ej., número de rebaño, etiqueta auricular y otros resultados de pruebas de laboratorio) no se proporcionó al personal técnico.

El resultado de la prueba BTB-FPA para cada animal se comparó con los resultados de CFT, IFN- $\gamma$  y post mortem del mismo animal. La infección se definió como un resultado positivo de CFT (interpretación estándar), un resultado positivo de IFN- $\gamma$ , una lesión visible en el sacrificio y/o resultado de confirmación bacteriológica (positivo por histología y/o cultivo microbiológico).

## Resultados

Los 453 bovinos CFT negativos dieron negativo para BTB usando BTB-FPA (100 % de especificidad). En la Tabla 1 se presenta una comparación de BTB-FPA, CFT, IFN- $\gamma$  y resultados post mórtem generados a partir de los 100 animales del grupo infectado. De los 100 animales diagnosticados como positivos mediante los resultados post mórtem, 28 generaron falsos resultados negativos según CFT, y otros 28 también generaron resultados falsos negativos según las mediciones de IFN- $\gamma$ . El BTB-FPA mostró resultados falsos negativos para 85 de los 100 bovinos. Sin embargo, el BTB-FPA también detectó tres animales anérgicos lesionados e infectados con BTB que dieron negativo según CFT e IFN- $\gamma$ . Además, los resultados de BTB-FPA, CFT e IFN- $\gamma$  coincidieron en 10 animales. El BTB-FPA identificó otros dos animales positivos que se consideraron positivos solo por una de las otras pruebas.

Tabla 1. Resultados de la prueba de 100 vacas lecheras en Laguna, México. La edad se presenta en meses. Los resultados de la prueba INF- $\gamma$  (Bovigam) se etiquetan como "TB" cuando son positivos para BTB y "PTB" cuando son positivos para TB aviar.

COW	AGE	CFT	GAMMA	BTB-FPA	COW	AGE	CFT	GAMMA	BTB-FPA
1	37.1	+	-	-	51	102.3	-	-	-
2	57.7	+	TB	-	52	66.8	+	TB	-
3	27.5	+	PTB	-	53	65.8	+	-	-
4	47.1	-	-	+	54	111.3	+	TB	-
5	45.9	+	TB	-	55	48.3	-	-	-
6	71.4	+	-	-	56	66.3	+	-	-
7	44.2	-	TB	-	57	86.1	+	TB	+
8	56.2	+	-	-	58	34.9	+	TB	+
9	60	+	TB	-	59	85.9	-	PTB	-
10	66.1	+	PTB	+	60	46.5	+	TB	+
11	74	+	PTB	-	61	87.4	+	PTB	-
12	50.3	-	TB	-	62	89.7	+	TB	-
13	52.1	-	-	-	63	82.7	+	TB	-
14	51.7	-	PTB	-	64	85.3	+	TB	-
15	67.6	+	TB	-	65	48.8	+	PTB	+
16	50.9	+	TB	-	66	74.4	+	-	-
17	61.3	+	PTB	-	67	49.7	+	-	-
18	59.2	-	TB	-	68	61.5	+	TB	-
19	59.7	+	PTB	+	69	46.8	-	-	-
20	85.4	+	TB	-	70	56	-	TB	-
21	75.6	+	TB	-	71	82.4	+	-	+
22	84	+	PTB	-	72	81.7	+	-	-
23	56.8	+	TB	-	73	55.8	+	TB	-
24	79.6	+	TB	-	74	82.2	+	TB	-
25	92	-	-	-	75	44.9	-	-	-
26	59.6	+	TB	-	76	48.5	-	-	-
27	51.3	+	TB	-	77	48.5	+	-	-
28	89.7	+	TB	-	78	84.5	+	TB	-
29	84.2	+	-	-	79	84	-	-	-
30	56.3	-	PTB	-	80	47	+	TB	+
31	69.9	+	PTB	-	81	72.8	+	TB	-
32	59.2	+	TB	-	82	95.8	-	-	-
33	67.7	+	PTB	-	83	86	+	TB	-
34	37.7	-	TB	+	84	96.8	+	TB	+
35	100.5	+	TB	-	85	74.6	+	TB	-
36	75.9	-	PTB	-	86	58.1	+	TB	-
37	46.7	+	TB	-	87	72.5	+	TB	-
38	59.1	-	-	+	88	79.9	+	TB	-
39	52.6	+	PTB	+	89	45.3	+	TB	-
40	59.1	+	TB	-	90	37.5	+	TB	-
41	60.6	+	-	-	91	37.4	+	TB	-
42	74.9	+	TB	-	92	32	+	PTB	-
43	83.7	+	TB	-	93	38.6	-	TB	-
44	75.1	-	TB	-	94	71.6	+	PTB	-
45	84.5	+	TB	+	95	49.9	+	-	-
46	26.3	+	-	-	96	29.8	-	-	-
47	57.9	-	TB	-	97	43.9	-	TB	-
48	64.3	-	PTB	-	98	43.5	+	TB	-
49	67.9	-	-	-	99	35.4	+	-	-
50	86.3	+	TB	-	100	34.7	-	-	+

## Discusión

La existencia de animales anérgicos BTB dificulta el diagnóstico y control de *M. bovis*. Debido a las características particulares y complejas de BTB, existe una percepción creciente de que ningún método de prueba, por sí solo, es suficiente para detectar todos los animales reactivos en cada etapa de la infección. Por lo tanto, se debe aplicar un enfoque múltiple que utilice varios métodos actualmente disponibles. Los enfoques modernos para el diagnóstico y control de la BTB deben incluir ensayos bacteriológicos, moleculares, histopatológicos e inmunológicos debido a las indicaciones, ventajas y desventajas de cada método.

En este estudio, el número de animales positivos post mórtem que también resultaron positivos según el BTB-FPA fue muy bajo. Obviamente, esta prueba no debe usarse por sí sola para diagnosticar la infección por BTB en un rebaño. Sin embargo, si se utiliza como parte de un enfoque multidisciplinario junto con CFT e IFN- $\gamma$ , estos datos sugieren que BTB-FPA puede detectar animales adicionales infectados con BTB que, de otro modo, pasarían desapercibidos. El uso de estas pruebas en paralelo eliminaría la enfermedad de la manada más rápidamente.

No hay datos disponibles en este momento que muestren el porcentaje de animales anérgicos que detecta el BTB-FPA. Sin embargo, cada animal anérgico que se retira de la manada evita que ese animal transmita BTB a sus compañeros de manada.

## Conclusión

El diagnóstico de BTB en bovinos no es un proceso sencillo. Muchos gobiernos usan una combinación de pruebas para garantizar que se utilicen las mejores opciones viables para identificar la enfermedad y eliminar el ganado infectado de la granja. Sin embargo, la interpretación de los resultados de cada régimen de prueba puede variar dependiendo de la situación de la enfermedad en la región y en la granja. Los resultados preliminares de este estudio indican que el BTB-FPA se puede utilizar para detectar reacciones anérgicas en animales que las otras pruebas diagnósticas de BTB no pueden.

Se necesitan estudios adicionales para recopilar más datos y confirmar los resultados de estos estudios.

## Reconocimientos

Los autores desean agradecer a Megafarma S.A. de C.V. por su ayuda en la facilitación de este proyecto.

## Referencias

1. The History of In Vivo Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a "One Health" issue Margaret Good, Douwe Bakker, Anthony Duignan and Daniel M. Collins, *Frontiers in Veterinary Science*, April 9, 2018
2. Humblet, M.F. , Walravens, K. , Salandre, O. , Boschioli, M.L. , Gilbert, M. , Berkvens, D. , Fauville-Dufaux, M. , Godfroid, J. , Dufey, J. , Raskin, A. , Vanholme, L. , Saegerman, C. , 2011. Monitoring of the intra-dermal tuberculosis skin test performed by Belgian field practitioners. *Research in Veterinary Science* 91, 199-207.
3. Rua-Domenech, R. , Goodchild, A.T. , Vordermeier, H.M. , Hewinson, R.G. , Christiansen, K.H. , Clifton-Hadley, R.S. , 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res.Vet.Sci.*81, 190-210.
4. Humblet, M.F. , Walravens, K. , Salandre, O. , Boschioli, M.L. , Gilbert, M. , Berkvens, D. , Fauville-Dufaux, M. , Godfroid, J. , Dufey, J. , Raskin, A. , Vanholme, L. , Saegerman, C. , 2011. Monitoring of the intra-dermal tuberculosis skin test performed by Belgian field practitioners. *Research in Veterinary Science* 91, 199-207
5. Good, M. , Clegg, T.A. , Costello, E. , More, S.J. , 2011. The comparative performance of the single intradermal test and the single intra-dermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *Vet. J.*190, e60-e65.
6. Goodchild et al, *Veterinary Record* - 2015