

COMPARACION DEL ELISA CON LA TUBERCULINIZACION EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA. ^a

Carolina Ramírez Casillas ^b
Germán Valero Elizondo ^{b, c}
Camila Arriaga Díaz ^b

RESUMEN

La detección de bovinos infectados con tuberculosis (Tb) es de gran importancia para el control y erradicación de la Tb bovina. El objetivo de este trabajo fue evaluar una técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) y comparar los resultados con la tuberculinización simple caudal. Se utilizaron el derivado proteico purificado de origen bovino (PPD *bovis*) y aviar (PPD *avium*) como antígenos en un ELISA indirecto. Se obtuvo suero de 300 bovinos de engorda, de un hato sin reactores a la tuberculina en los últimos cinco años (libres) y suero de 132 bovinos lecheros con sospecha clínica de padecer tuberculosis (sospechosos); se incluyeron además 30 sueros de bovinos tuberculosos confirmados por cultivo (confirmados). Se aplicó tuberculina en el pliegue caudal derecho de los bovinos y se midió el aumento de grosor de piel 72 ± 3 horas después. En los animales sospechosos hubo 70 (53%) reactores a la tuberculinización (reactores), mientras que en el grupo libre no se encontró ningún reactor. Los valores de ELISA se expresaron como porcentaje del testigo positivo conocido. Los valores de corte al 99% de confiabilidad fueron de 76.57% para PPD bovino y 85.19% para PPD aviar, de modo que utilizando PPD bovino hubo un 1% de positivos en ELISA en el grupo libre, 13% en sospechosos no reactores, 17% en sospechosos reactores y 3% en confirmados; con PPD aviar hubo 1% de positivos en ELISA en el grupo libre, 10% en sospechosos no reactores, 13% en sospechosos reactores y 3% en confirmados. Si el punto de corte se sitúa al 90% en lugar del 99%, los porcentajes de positividad en ELISA serían: con PPD bovino, 9% en el grupo libre, 34% en los sospechosos no reactores, 26% en los sospechosos reactores y 20% en confirmados; para PPD aviar las proporciones al 90% de confiabilidad serían: 11% en el grupo libre, 37% en los sospechosos no reactores, 30% en los sospechosos reactores y 37% en confirmados. Se concluye que el ELISA empleado aquí no debe usarse como criterio único de diagnóstico de tuberculosis bovina, sino como prueba complementaria.

PALABRAS CLAVE: Derivado proteico purificado, Tuberculosis bovina, ELISA.

Tec. Pecu. Mex. Vol.33 No.3 (1995)

INTRODUCCION

En México, la prueba tuberculínica aplicada cada seis meses debería ser un método valioso para el diagnóstico de la enfermedad, para la detección de animales como posibles fuentes de infección, y para evaluación de tendencias epidemiológicas (1, 2). Sin embargo, el gran número de animales que presentan reacciones inespecíficas a la prueba de la tuberculina es un grave problema que ha motivado la búsqueda de nuevas alternativas en el diagnóstico de este padecimiento (3). Actualmente se encuentran en etapa experimental o de evaluación algunas pruebas *in vitro* que podrían, una vez

determinada su eficacia y operatividad en condiciones de campo, emplearse como pruebas complementarias a la prueba tuberculínica, ya sea para vigilancia epidemiológica o para confirmación diagnóstica. Una de las pruebas *in vitro* propuestas es la determinación de anticuerpos IgG anti-micobacteria específicos circulantes, empleando una técnica de inmunoensayo enzimática (ELISA) para evaluar la respuesta humoral (1, 4, 6, 7). Los métodos que se basan en esta determinación tienden a detectar enfermedad y no infección o lesiones mínimas. Se ha observado que los niveles altos de anticuerpos IgG circulantes anti-micobacteria tienen buena correlación con la presencia de lesiones tuberculosas importantes y la existencia, por lo tanto, de gran cantidad de antígeno bacilar en el organismo del animal. Esto tendría

^a Recibido para su publicación el 12 de junio de 1995.

^b Proyecto tuberculosis bovina, CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, México.

^c Depto. Patología, FMVZ, UNAM.

aplicación en situaciones de prevalencia media o elevada, en donde en una primera etapa se podrían ir seleccionando y eliminando los animales con enfermedad avanzada (1), que son la principal fuente de infección en el hato, o animales anérgicos (1, 5, 6), que pueden tener cantidades detectables de anticuerpos circulantes, y sin embargo, no manifestar reacción a las pruebas de tipo celular como la tuberculina (5). La evaluación de métodos de diagnóstico permitirá contar con una herramienta más que complementa la prueba intradérmica, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar una técnica de ensayo inmunoenzimática (ELISA), comparándola con la prueba tuberculínica.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se obtuvo suero de 132 bovinos lecheros sospechosos clínicamente de padecer la enfermedad (sospechosos), y 300 sueros de bovinos de engorda, de un hato sin evidencias clínicas de la enfermedad y con antecedentes de ser negativo a la tuberculinización por los últimos cinco años (libres). Se incluyeron además 30 sueros de bovinos tuberculosos confirmados por cultivo bacteriológico de *M. bovis* (confirmados).

Prueba intradérmica

Todos los animales se tuberculinizaron utilizando la prueba caudal (2). Antes de aplicar la tuberculina en el pliegue caudal derecho, se procedió a sangrar a los animales con tubos vacutainer sin anticoagulante para obtener las muestras de suero, las que fueron guardadas a -20C hasta su utilización en la ELISA. A las 72 h posteriores a la tuberculinización se midió el incremento en el grosor de la piel, y se

anotaron los resultados.

ELISA

El ELISA trabajado fue el descrito por Hanna, Neill y O'Brien (1989). Se utilizaron como antígenos el derivado proteico purificado de antígeno bovino (PPD *bovis*) y aviar (PPD *avium*). Estos se dializaron contra solución salina amortiguada de fosfatos (PBS) 0.01M, pH 7.2 y se almacenaron a -20C. El PPD se utilizó en la prueba diluido en una solución amortiguada de carbonatos 0.1M, pH 9.6, para obtener una concentración final de proteínas de 0.01 mg/ml. Se cubrieron las paredes de las placas de ELISA (*Nunc*) con 0.1 ml de la solución de PPD y se incubaron toda la noche a 37C en una cámara húmeda para prevenir la desecación. Posteriormente se lavaron seis veces con PBS 0.02 M con 0.02% de Tween 20; después se añadió 0.1 ml del suero problema diluido 1:100 en PBS 0.01M, pH 7.2 con 0.02% de Tween 80 y se incubaron a 37C durante una hora.

Las placas se lavaron de nuevo seis veces con la misma solución de lavado y se añadió a cada pozo 0.1 ml del inmunoconjugado (0.015 ml de IgG de conejo anti-bovino, conjugado con peroxidasa de rábano (*Sigma*), en 75 ml de PBS 0.01M conteniendo 0.02% de Tween 80 más 4% de suero de caballo); esto se incubó a 37C durante una hora. Las placas se lavaron de nuevo y se les añadió 0.1 ml de substrato compuesto por 24 mg de ortofenilenediamina (*Sigma*), más 60 ml de solución amortiguada de citrato/fosfatos, pH 5.0, más 0.024 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%. Las placas se incubaron de nuevo durante 20 minutos. El valor de absorbancia en cada pozo se determinó utilizando un lector de ELISA (*Sigma*) a 492 nm. En cada placa se incluyó un suero testigo positivo de un animal confirmado

por cultivo bacteriológico, uno negativo y un blanco. Los valores de ELISA se expresaron como porcentaje del valor positivo. Cada suero se probó por triplicado y los resultados se expresaron como valores medios.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de pruebas de t, diagramas de dispersión, estadística descriptiva y pruebas de correlación simple, utilizando el programa Statistix 3.0 en una computadora personal.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba intradérmica mostraron que hubo 70 (53%) reactores a la tuberculinización (reactores) en el grupo de animales sospechosos, mientras que en el grupo libre todos fueron negativos. Las medias y desviaciones estándar de los valores de ELISA se muestran en el cuadro 1. Los resultados del ELISA se expresaron como porcentaje (%) del testigo positivo conocido. Los valores de corte se calcularon con los percentiles de la distribución de la población de bovinos libres (figuras 1 y 2). Los valores de corte al 99% de confiabilidad fueron de 76.57% para PPD bovino y 85.19 para PPD aviar.

Considerando estos puntos de corte cuando se utilizó PPD bovino hubo un 1% de positivos a ELISA en el grupo libre, 13% en sospechosos no reactores, 17% en sospechosos reactores y 3% en confirmados; utilizando PPD aviar hubo un 1% de positivos en el grupo libre, 10% en sospechosos no reactores, 13% en sospechosos reactores y 3% en confirmados. Si el punto de corte se sitúa al 90% de confiabilidad en lugar del 99%, los porcentajes de positividad a ELISA serían: para PPD bovino 9% en el grupo libre, 34% en los sospechosos no reactores, 26% en los sospechosos reactores y 20% en confirmados; para PPD aviar las proporciones al 90% de confiabilidad serían: 11% en el grupo libre, 37% en los sospechosos no reactores, 30% en los sospechosos reactores y 37% en los confirmados.

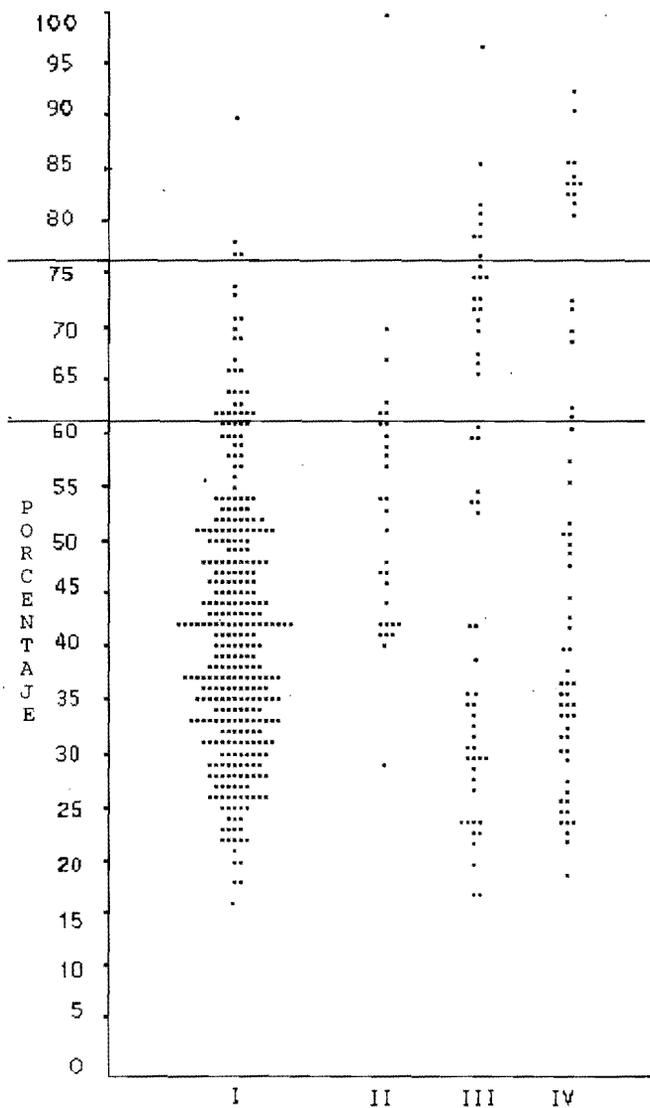
En el grupo de bovinos libres de tuberculosis, los valores de ELISA con PPD bovino no estuvieron asociados con el aumento del grosor del pliegue anocaual posterior a la inoculación de tuberculina (figura 3). Los valores de ELISA para PPD *avium* tampoco estuvieron asociados a la respuesta intradérmica (figura 4). Los valores de ELISA para PPD *bovis* y PPD *avium* (figura 5) estuvieron poco asociados ($r^2 = 0.2719$ $p < 0.001$).

En el grupo de bovinos sospechosos de

CUADRO 1
 MEDIAS Y DESVIACIONES ESTANDAR DE LOS VALORES DE ELISA PARA PPD BOVIS Y PPD AVIUM DE LOS DIFERENTES GRUPOS

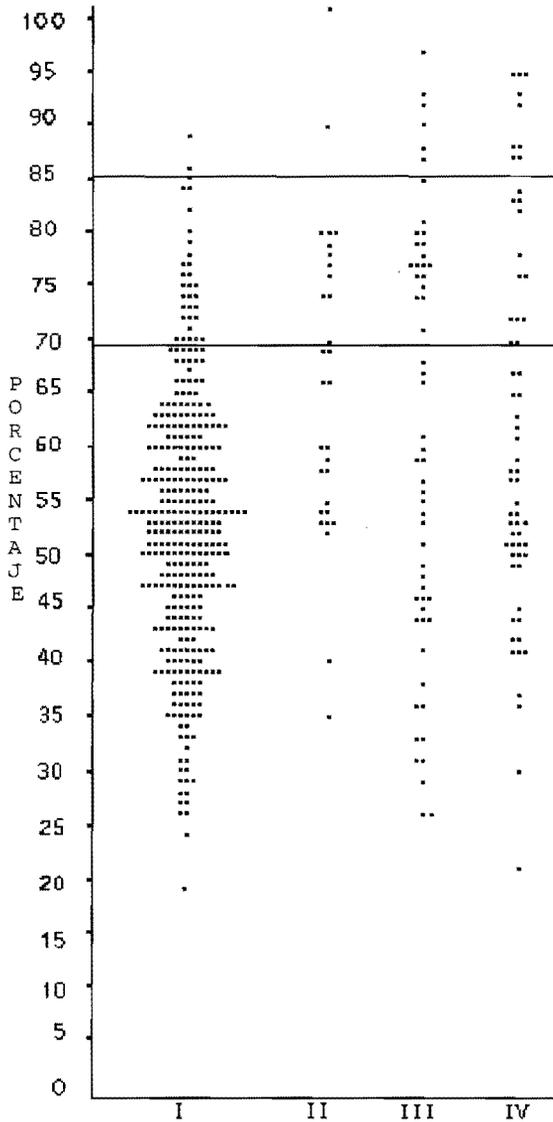
| | valores ELISA PPD <i>bovis</i> | | valores ELISA PPD <i>avium</i> | |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| | media | desviación estandard | media | desviación estandard |
| libres de TB (n=300) | 41.98 | 12.39 | 53.20 | 12.31 |
| sospechosos no reactores (n=62) | 53.01 | 24.50 | 62.53 | 20.52 |
| sospechosos reactores (n=70) | 51.09 | 22.10 | 62.70 | 17.48 |
| tuberculosos confirmados (n=30) | 52.78 | 13.22 | 65.66 | 14.37 |

FIGURA 1
DISTRIBUCION DE LOS VALORES DE ELISA PARA PPD BOVIS EN LOS
DIFERENTES GRUPOS.



El grupo I son bovinos del hato libre de tuberculosis, el grupo II son tuberculosos confirmados por cultivo, el grupo III son bovinos sospechosos no reactivos a la tuberculinización y el grupo IV son bovinos sospechosos reactivos a la tuberculinización. El punto de corte al 90% se sitúa en 60.56 unidades y el punto de corte al 99% en 76.57 unidades.

FIGURA 2
 DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES DE ELISA PARA PPD AVIUM EN LOS
 DIFERENTES GRUPOS.



El grupo I son bovinos del hato libre de tuberculosis, el grupo II son tuberculosos confirmados por cultivo, el grupo III son bovinos sospechosos no reactivos a la tuberculinización y el grupo IV son bovinos sospechosos reactivos a la tuberculinización. El punto de corte al 90% se sitúa en 69 unidades y el punto de corte al 99% en 85.19 unidades.

FIGURA 3
 AUMENTO DEL PLIEGUE ANOCAUDAL CONTRA VALORES DE ELISA
 PARA PPD *BOVIS* EN EL GRUPO DE BOVINOS LIBRES DE TUBERCULOSIS.

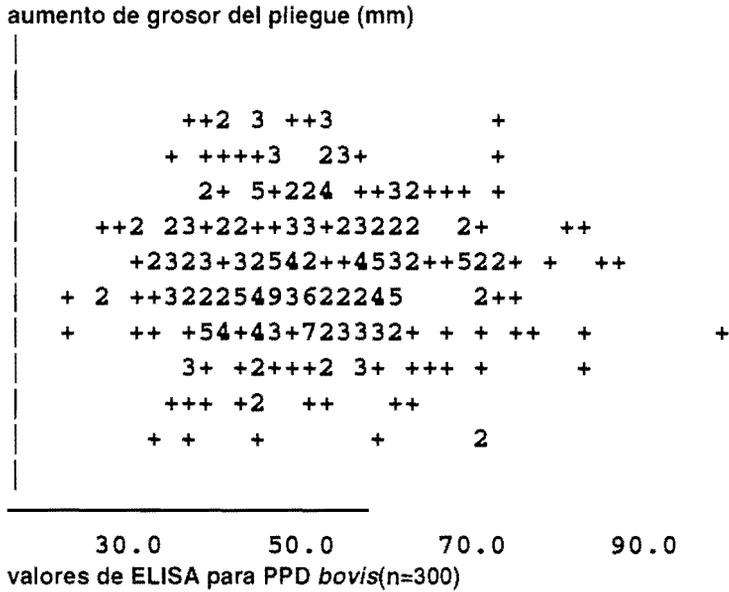


FIGURA 4
 AUMENTO DEL PLIEGUE ANOCAUDAL CONTRA VALORES DE ELISA
 PARA PPD *AVIUM* EN EL GRUPO DE BOVINOS LIBRES DE TUBERCULOSIS.

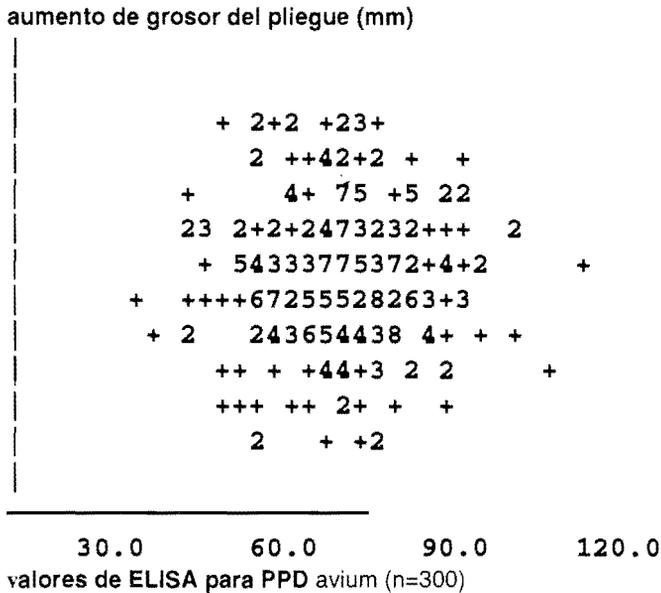
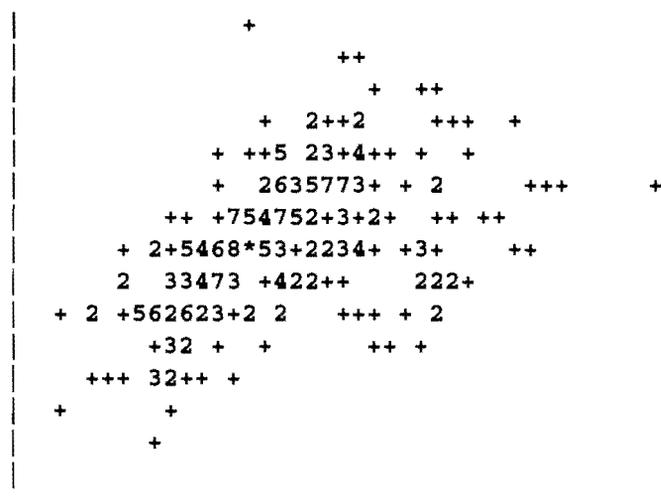


FIGURA 5. VALORES DE ELISA PARA PPD AVIUM CONTRA PPD BOVIS EN EL GRUPO DE BOVINOS LIBRES DE TUBERCULOSIS.

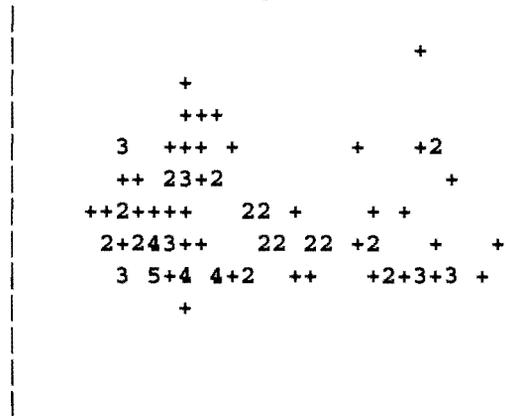
valores de ELISA para PPD *avium*



30.0 50.0 70.0 90.0
valores de ELISA para PPD *bovis*(n=300)

FIGURA 6. AUMENTO DEL PLIEGUE ANOCAUDAL CONTRA VALORES DE ELISA PARA PPD BOVIS EN EL GRUPO DE BOVINOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS.

aumento de grosor del pliegue (mm)



30.0 60.0 90.0 120.0
valores de ELISA para PPD *bovis* (n=132)

FIGURA 7. AUMENTO DEL PLIEGUE ANOCAUDAL CONTRA VALORES DE ELISA PARA PPD *AVIUM* EN EL GRUPO DE BOVINOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS.

aumento de grosor del pliegue (mm)

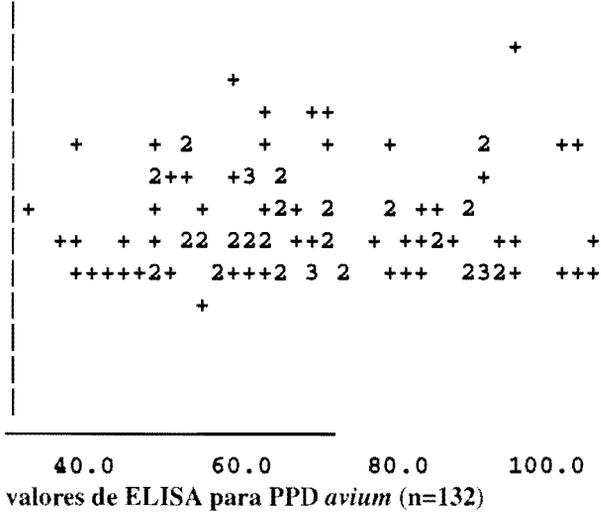


FIGURA 8. VALORES DE ELISA PARA PPD *AVIUM* CONTRA PPD *BOVIS* EN EL GRUPO DE BOVINOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS NO REACTORES A TUBERCULINA.

valores de ELISA para PPD *bovis*

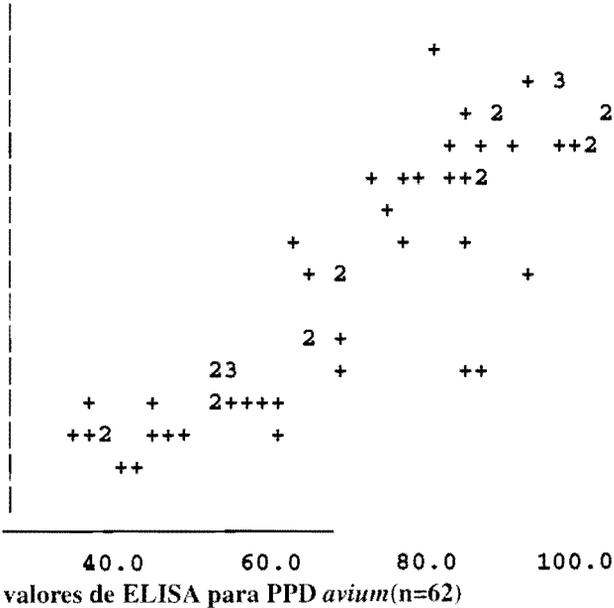
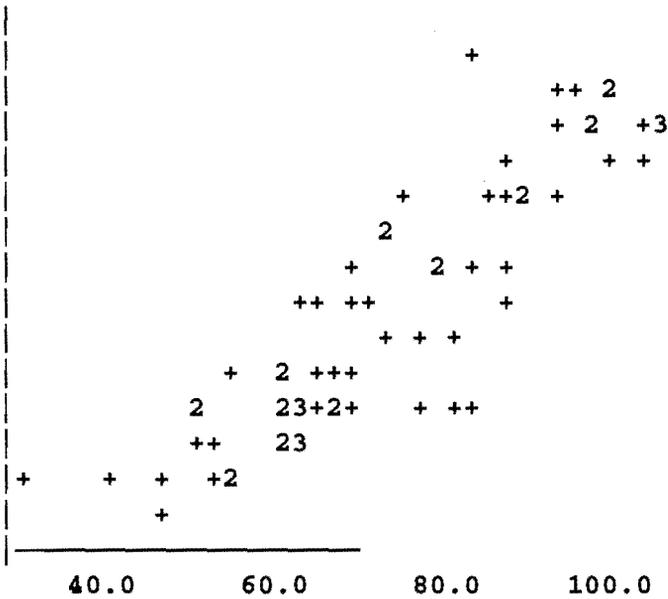


FIGURA 9. VALORES DE ELISA PARA PPD *AVIUM* CONTRA PPD *BOVIS* EN EL GRUPO DE BOVINOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS REACTORES A TUBERCULINA.

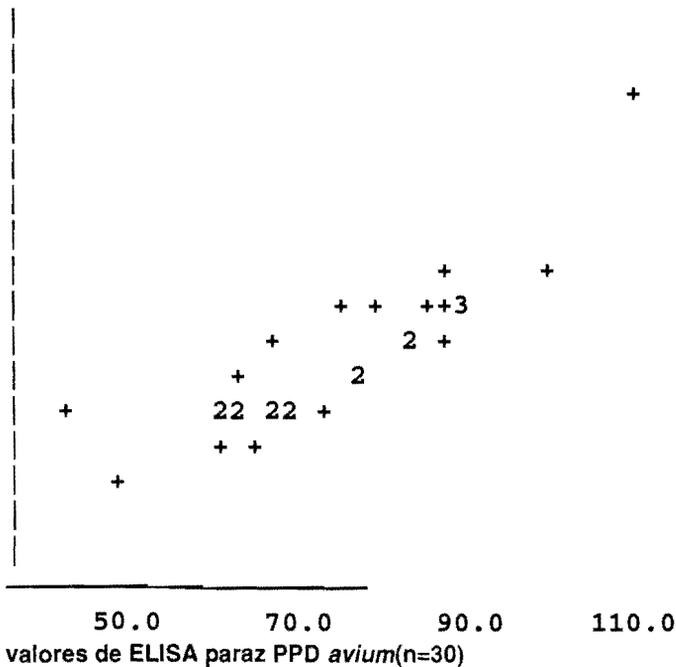
valores de ELISA para PPD *bovis*



Valores de ELISA para PPD *avium* (n=70)

FIGURA 10. VALORES DE ELISA PARA PPD *AVIUM* CONTRA PPD *BOVIS* EN EL GRUPO DE BOVINOS TUBERCULOSOS CONFIRMADOS POR CULTIVO.

valores de ELISA para PPD *bovis*



tuberculosis, tanto en los reactores a la tuberculinización intradérmica como en los no reactores, los valores de ELISA con PPD bovino no estuvieron asociados con el aumento del grosor del pliegue anocaudal posterior a la inoculación de tuberculina (figura 6). Los valores de ELISA para PPD aviar tampoco estuvieron asociados a la respuesta intradérmica (figura 7).

Los valores de ELISA para PPD bovino y PPD aviar estuvieron moderadamente asociados (figuras 8 y 9), tanto en los reactores a la tuberculinización ($r^2=0.7965$ $p<0.001$), como en los no reactores ($r^2=0.7917$ $p<0.001$). En el grupo de bovinos tuberculosos confirmados por cultivo, los valores de ELISA para PPD bovino y PPD aviar (figura 9) estuvieron moderadamente asociados ($r^2=0.7873$ $p<0.001$).

DISCUSION

Los resultados obtenidos indican la incapacidad del PPD como antígeno para detectar una respuesta humoral en la mayoría de los animales infectados, lo que concordaría con otros autores (4, 7). Por otro lado, lo anterior es bien conocido, ya que la detección de anticuerpos utilizando ELISA tiene limitado valor diagnóstico, teniendo en cuenta el significado de la respuesta mediada por células en la tuberculosis bovina (1). Sin embargo, aparentemente sí existe buena correlación con la presencia de lesiones tuberculosas importantes y la existencia de gran cantidad de antígeno bacilar en el organismo del animal (1,6,7). Estos animales podrían estar representados en el presente trabajo por el 3% de positivos a ELISA utilizando PPD bovino (99% de confiabilidad), detectados en el grupo de animales confirmados por cultivo, por el 17% en el grupo de sospechosos reactores

y el 13% de animales sospechosos no reactores, en donde probablemente hubo animales con lesiones diseminadas de tuberculosis. Sin embargo, esto no pudo confirmarse en el caso de los animales sospechosos, pues no se les dió seguimiento a rastro, y el diagnóstico presuntivo de tuberculosis se basó en la observación de los signos clínicos de los animales enfermos. Por otra parte, el hecho de poder detectar 13% de positivos en el grupo de animales que mostraron signos clínicos de la enfermedad pero fueron negativos a la prueba tuberculínica, apoya el que este ELISA se utilice como prueba complementaria en el diagnóstico de esta enfermedad.

Es interesante anotar la diferencia en los resultados considerando el 99% o el 90% de confiabilidad para calcular los puntos de corte. Tomando el primer criterio sólo 3% de los animales confirmados y 17% de los sospechosos reactores serían positivos con el PPD bovino. Sin embargo, considerando el 90% de confiabilidad es posible detectar mayor número de positivos en el grupo de animales confirmados por cultivo, y de los sospechosos reactores con este ELISA (Figura 1). Otro hallazgo interesante encontrado en el presente trabajo fue que sí se observó diferencia en la respuesta obtenida en el ELISA con PPD bovino y aviar como antígeno, en ambos puntos de corte. Este hecho no ocurrió en el trabajo presentado por Hanna *et al.* en 1989, quienes encontraron que los resultados fueron muy semejantes usando el antígeno aviar y mamífero; sin embargo, estos autores no mencionan los valores de corte que utilizaron.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que el ELISA evaluado en el presente trabajo no deberá usarse como criterio único de diagnóstico de tuberculosis bovina, pero

podría aplicarse selectivamente para disminuir la prevalencia mediante detección y eliminación de los animales enfermos con lesiones abiertas, complementando de esa manera los resultados obtenidos en la prueba intradérmica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Diana Whipple por proporcionar los sueros de los animales confirmados positivos, a E. Labrandero y B. Arellano su valiosa cooperación; y al PAIEPEME por haberles permitido muestrear el hato negativo.

COMPARISON BETWEEN THE ELISA TEST AND TUBERCULINIZATION IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

SUMMARY

The detection of tuberculosis (Tb) infected cattle is of paramount importance for the control and eradication of bovine Tb. The goal of this work was to assess the immunoenzyme assay and compare their results with a simple caudal fold tuberculinization. Bovine and avian purified protein derivatives (PPD *bovis* and PPD *avium*) were used as antigens in an indirect ELISA assay. The serum samples from 300 feedlot cattle, from a herd without tuberculin reactors in the previous five years (free) and sera from 132 dairy cattle with clinical suspicion of tuberculosis (suspect) were used. Additionally, the serum samples from 30 tuberculous cattle confirmed by culture (confirmed) were used. Tuberculin was injected in the right anocaudal skin fold, and the increase in thickness 72 ± 3 hours after injection was measured. Suspect cattle had 70 (53%) reactors to tuberculinization (reactors), while no reactors were found in the free group. The ELISA values were expressed as % of a known positive control. The threshold values at 99% confidence were 76.57 % for PPD *bovis* and 85.19 % for PPD *avium*. Thus, using PPD *bovis* there were 1% ELISA positive sera in the free group, 13% in non reactor suspects, 17% in reactor suspects and 3% in confirmed. With PPD *avium* there were 1% of ELISA positive sera in the free group, 10% in non reactor suspects, 13% in reactor suspects and 3% in confirmed. If the threshold were placed at 90% confidence instead of 99%, the percentages of ELISA positive sera would be, for ppd *bovis*: 9% in the free group, 34% in non reactor suspects; 26% in reactor suspects and 20% in confirmed; and with PPD *avium*: the 90% confidence values would be: 11% in the free group, 37% in non reactor suspects; 30 % in reactor suspects and 37% in the confirmed group. It is concluded that the ELISA

test here assessed must not be used as a sole diagnostic criterion, but as a complementary test.

KEY WORDS: Protein purified derivative, Bovine tuberculosis, ELISA test.

REFERENCIAS

1. Neill S D, Hanna J, J Pollock, *et al.* The diagnosis of bovine tuberculosis by blood testing in: Society for veterinary epidemiology and preventive medicine, Proceedings of a meeting held at the Queen's University of Belfast on the 13th, 14th and 15th of april 1994, Edit. by MV Thrusfield, p.1-8.
2. CNMVZM-SARH. Proyecto acuerdo por el cual se establece en el territorio nacional, con el carácter general obligatorio y permanente la campaña nacional contra la tuberculosis en el ganado bovino. en: Programa de acreditación de médicos veterinarios zootecnistas. ordenamientos legales en materia de sanidad animal, 1991 p. 133-136, México.
3. Rothel J S, S L Jones, L A Corner, J C Cox, P R Wood. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle, Aust Vet J, 1990, 67:134.
4. Hanna J, Neill S D, O'Brien J J. Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. Res.Vet.Sci. 1989; 47:43.
5. OPS/OMS. Apuntes de la Reunión Internacional para la Erradicación de la Tuberculosis bovina en las Américas, Saltillo, Coah, México, 1991, 18-20 de Nov.
6. Wood P R, L A Corner; J S Rothel, T Filis *et al.* A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis, Vet. Microbiol. 1992. 31:71.
7. Kalish S B, Radin R C, Phair J P, Levitz D, Zeiss C R and Metzger E. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. Jour. Infect. Dis, 1983, 147: 523