

Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México

Ciro Estrada-Chávez^{*,**}

Raúl Mancilla^{***}

Camila Arriaga Díaz^{*}

Rafael Pérez González⁺

Fernando Díaz Otero^{*,++}

Abstract

Antibody response to PPD of cattle from herds with different tuberculosis status was assessed by ELISA. Tuberculosis-free group presented significantly lower optical density values than herds in which tuberculosis had been controlled in infected herds or cattle with necropsy-proven tuberculosis. Highest antibody levels were found in serum samples from tuberculous cattle and infected herds. However, some animals from the controlled group, in which tuberculin reactors were not demonstrated in the last year, showed also high antibody levels by ELISA suggesting a residual infection present in these herds. Two tuberculous animals, tuberculin non-reactors (anergic), showed high antibody titers. These results indicate the usefulness of ELISA with PPD as an antigen to identify anergic *Mycobacterium bovis* infected animals, and for monitoring and confirming the epidemiological status of herds under-control by the tuberculosis eradication campaign.

Key words: BOVINE TUBERCULOSIS, ELISA, PPD.

Resumen

Se evaluó mediante ELISA la respuesta de anticuerpos contra el derivado proteínico purificado de *M. bovis* (PPD) en hatos con distintas prevalencias de tuberculosis. En el ganado libre de tuberculosis, los valores de densidad óptica fueron significativamente menores a los obtenidos en hatos controlados, infectados y en bovinos con tuberculosis confirmada. Los niveles más altos de anticuerpos se encontraron principalmente en sueros obtenidos del ganado tuberculoso y en los hatos infectados. Sin embargo, algunos bovinos dentro del grupo testigo, sin individuos reactores a la tuberculina por espacio de un año, mostraron valores altos en el ELISA, lo que sugiere la presencia de una infección residual en esos hatos. Dos de los títulos más altos de anticuerpos se encontraron en dos animales con tuberculosis, sin reacción a la tuberculina, confirmando la utilidad del ELISA con PPD como antígeno para identificar animales anérgicos. Los anticuerpos anti-PPD podrían ayudar a verificar la situación epidemiológica de la tuberculosis en hatos bajo control de la campaña de erradicación.

Palabras clave: TUBERCULOSIS BOVINA, ELISA, PPD.

Recibido el 2 de mayo de 2001 y aceptado el 31 de julio de 2001.

* Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca, km 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

** Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional, 2 508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360, México, D. F.

*** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

+ Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 7.5, Xhala, Cuautitlán Izcalli, 54700, Estado de México, México.

++ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Introducción

Mycobacterium bovis ocasiona tuberculosis (TB) en el ganado bovino y causa un detrimento estimado en cientos de millones de dólares al año en la ganadería.^{1,2} En México, como en gran parte del mundo, los programas gubernamentales para controlar y erradicar la TB bovina utilizan un esquema de aplicación intradérmica de la tuberculina (PPD) y el sacrificio de los animales reactivos.³ Sin embargo, se estima que hasta 19% de ganado tuberculoso no reacciona a la tuberculina.^{4,5} Por otra parte, la reincidencia de hatos previamente saneados genera problemas socioeconómicos y de credibilidad en las campañas de erradicación.⁶

La evaluación *in vitro* de la respuesta inmune es actualmente un campo que brinda buenas alternativas para complementar el diagnóstico de la TB.⁷ El ensayo inmunoenzimático (ELISA) ha sido utilizado para detectar anticuerpos en el suero contra los antígenos de *M. bovis*. Para el ELISA se han utilizado diferentes antígenos, tales como el PPD,⁸ el filtrado de cultivo,⁹ así como antígenos purificados, ya sean nativos¹⁰⁻¹² o recombinantes.¹³ Diversos estudios coinciden en concluir que esta prueba tiene una alta especificidad y una baja sensibilidad, comparada con las pruebas de tuberculina y la de interferón gamma.^{14,15} Sin embargo, el ELISA puede identificar animales infectados en etapas previas al desarrollo de hipersensibilidad retardada, así como animales en los que esta reacción está suprimida (anérgicos). La razón de dichos resultados radica en la divergencia entre la inmunidad humoral y la celular en el curso de la TB.^{16,17}

En este trabajo se describe la respuesta de anticuerpos contra el PPD, evaluados por la técnica de ELISA en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis. Los resultados sugieren que estos estudios podrían ser una fuente importante de información para la Campaña Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina en México (CANETB).

Material y métodos

Grupos de estudio

Se trabajaron hatos de bovinos lecheros Holstein Friesian de entre dos y cinco años de edad. Con el apoyo de la CANETB todos los animales fueron probados aplicando 0.1 ml (1 mg/ml) PPD de *M. bovis* AN5, vía intradérmica, en el pliegue ano-caudal.

El grupo A (n = 20) incluyó animales negativos a la tuberculina, pertenecientes a hatos en proceso de erra-

dicación, ubicados en el estado de Sonora, México. El grupo B (n = 78) estaba formado con animales de hatos en campaña, en los cuales no se detectaron animales reactivos a la tuberculina durante el último año de pruebas. Los animales de los grupos C y D, ubicados en el estado de Chiapas, México, provenían de hatos sin control, que fueron sometidos al esquema de campaña por primera ocasión. En ellos se estimó una prevalencia de 50% de TB. El grupo C (n = 79) incluyó solamente animales negativos a la tuberculina, y el grupo D (n = 70) únicamente reactivos a la tuberculina. En el grupo E (n = 23) se incluyeron 21 animales positivos a la tuberculina y dos negativos a esta prueba, todos provenientes de hatos con una prevalencia mayor a 50% de TB y con aislamiento previo de *M. bovis*, ubicados en el Estado de México, México.

Los animales de los grupos denominados testigos (A y E) fueron sacrificados después de la toma de suero y de la aplicación de la prueba de tuberculina. Durante el sacrificio se realizó una inspección *post mortem* y se tomaron muestras de tejido para el cultivo de *M. bovis* e histopatología conforme a lo recomendado por Corner.¹⁸ Las muestras enviadas para intentar el cultivo de *M. bovis* fueron procesadas y cultivadas individualmente, como se describe, por Payeur.¹⁹ Las muestras de histopatología fueron examinadas para determinar la presencia de lesiones tuberculosas y de bacilos ácido-alcohol resistentes, como se sugiere por Corner.²⁰

ELISA

Se obtuvo suero sanguíneo de los 270 bovinos incluidos en el estudio. Como antígeno para las pruebas de ELISA se utilizó PPD de *M. bovis* dializado contra solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01 M, pH 7.2 durante 24 h a 4 °C. Las concentraciones y diluciones óptimas de antígeno, suero, conjugado y sustrato se estimaron previamente.²¹ Se adsorbieron placas de 96 pozos* con 1.0 µg de PPD diluido en 100 µl de solución de carbonatos pH 9.6 toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar, se bloquearon los sitios reactivos del plástico con una solución de leche descremada al 3% en PBS-0.1% Tween 20 durante 2 h a 37° C. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron a 37° C durante 1 h con 100 µl de los sueros diluidos 1:100 por triplicado. Después de lavar, se añadieron 100 µl de proteína G marcada con peroxidasa** diluida 1:10 000 para revelar los anticuerpos IgG. La peroxidasa se reveló con 100 µl de una solución de orto-fenilendiamina en solución amortiguadora de citratos pH 4.5 y peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con 50 µl/pozo de ácido sulfúrico 2 M y las densidades ópticas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA.***

* Nunc-Immuno Plate MaxiSorp F96, Denmark.

** Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

*** Lector de ELISA, MultiScan Sigma.

Resultados

Los análisis bacteriológicos confirmaron la ausencia de infección por *M. bovis* u otras micobacterias en el grupo A. En todos los animales del grupo E se encontraron lesiones compatibles con tuberculosis a la inspección *post mortem*, las cuales se localizaban en nódulos linfáticos de cabeza y tórax. El 100% de las lesiones fueron confirmadas mediante histopatología (linfadenitis granulomatosa multifocal) y *M. bovis* fue aislado de 14 animales (60%).

Las densidades ópticas (DO) de los grupos se compararon mediante la prueba de ANOVA Kruskal-Wallis y la corrección de Dunn's para la comparación múltiple usando el software Prisma.*

Los valores $P < 0.05$ se consideraron significativos. En todos los grupos de estudio se observó una amplia variación en las DO determinadas por medio de ELISA (Figura 1). El ganado libre de tuberculosis (grupo A) mostró diferencias significativas respecto del ganado de hatos controlados (grupo B, $P < 0.05$), infectados (grupos C, $P < 0.001$ y D, $P < 0.001$) y en el ganado tuberculoso (grupo E, $P < 0.001$).

El promedio más alto de los valores de DO se observó en el grupo con tuberculosis confirmada. La respuesta inmune humoral de los grupos C y D fue similar, independientemente de la respuesta a la tuberculina. El promedio de las DO en el grupo controlado (B) tampoco mostró diferencias significativas respecto de los grupos infectados (C y D), y once animales tuvieron valores altos (> 0.6). Sin embargo, los valores bajos (< 0.3) fueron

más frecuentemente encontrados en los animales del grupo controlado (B) y el libre (A).

Dos animales con tuberculosis confirmada, sin reacción a la tuberculina, presentaron dos de los valores de DO más elevados de todo el estudio y los más altos de su grupo (Figura 1; grupo E). En uno de ellos se encontraron lesiones diseminadas en tórax y abdomen. En el otro, sólo se encontró una lesión en uno de sus nódulos linfáticos, asociada con el tracto respiratorio.

Tomando en cuenta los antecedentes epidemiológicos de los hatos, así como los análisis *antemortem* y *postmortem*, se consideró al grupo A como testigo negativo y al grupo E como testigo positivo. Con la finalidad de establecer la especificidad y sensibilidad del ELISA en este trabajo, se analizaron los grupos testigos A y E. Se calcularon distintos valores de corte agregando 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 desviaciones estándar (DS) a la DO promedio del grupo A. Con la suma de 1 DS, 82.6% (19/23) del ganado con tuberculosis fue diagnosticado (grupo E), y 85% (17/20) del ganado libre de TB (grupo A) fue descartado de una posible infección con *M. bovis*. La especificidad de la prueba llegó a 100% con la adición de 2.5 DS; de manera inversa, la sensibilidad disminuyó significativamente desde la adición de 1.5 DS (60.9%).

Discusión

En México la TB en el ganado bovino es un problema grave de sanidad animal. La prueba de tuberculina ha demostrado su gran utilidad para el control de esta enfermedad bajo un esquema de aplicación periódica. Esta estrategia, aunque presenta una buena sensibilidad y especificidad para la identificación de animales infectados, ha sido insuficiente para lograr la erradicación de la enfermedad.

En el presente estudio, al analizar los anticuerpos contra el PPD mediante ELISA se observó que los valores de DO para el grupo libre de tuberculosis fueron bajos (0.0-0.5). La especificidad del ELISA permite suponer que una alta serorreactividad en la prueba puede señalar una reacción específica contra *M. bovis* en individuos y en hatos infectados con esta especie de micobacteria.²²

La respuesta alta de anticuerpos contra el PPD en algunos de los bovinos del ganado controlado sugiere que el ELISA-PPD podría ser un método útil para determinar infecciones residuales en hatos en donde recientemente se han dejado de encontrar reactores a la tuberculina, ya que es común en todo el mundo la reaparición de nuevos casos.^{4,5,23}

En este estudio fue evidente una reactividad similar en los grupos provenientes de hatos sin control, independientemente de su reactividad a la tuberculina. Lo anterior corrobora la discrepancia entre la inmunidad



Figura 1. Valores de densidad óptica determinados mediante ELISA, usando PPD como antígeno. Distribución de la serorreactividad en los grupos de bovinos: Libres de TB (A), en control (B), infectados, negativos (C) o positivos (D) a la tuberculina y con tuberculosis confirmada (E). La línea horizontal indica la DO promedio en cada grupo. Las DO promedio \pm la desviación estándar para cada grupo se muestran en la figura.

* Versión 3.0 para windows, GraphPad, San Diego, Cal., USA.

humoral y celular en el curso de la tuberculosis bovina.²⁴ No obstante los títulos de anticuerpos más elevados se encontraron en el grupo de animales con lesiones compatibles con la tuberculosis y los más bajos en el grupo libre de tuberculosis.

El ELISA-PPD permitió identificar a dos animales con tuberculosis, sin reacción a la tuberculina o anérgicos, lo que confirma la utilidad de la prueba para identificar ese tipo de casos.¹⁶ Los orígenes de la anergia al PPD no han sido totalmente definidos, pero se atribuyen a la inmunosupresión²⁵ y al parecer se asocian con factores como el estrés en el pico de lactancia, desnutrición, tratamientos con prostaglandinas o con esteroides.^{26,27}

En resumen, la posibilidad de tener tuberculosis es mayor en los animales que muestran niveles altos de anticuerpos anti-PPD. Las observaciones realizadas apoyan lo descrito en otros países,¹⁴⁻¹⁶ donde se demuestra que la serología es útil para identificar algunos animales infectados con *M. bovis*, que no reaccionan a la tuberculina, así como para identificar hatos con la infección. Los datos obtenidos en hatos con distintas prevalencias de la TB permiten concluir que el ELISA-PPD puede ser útil en estudios epidemiológicos, para verificar la sanidad de un hato durante la campaña de erradicación de la TB bovina en México. En estudios posteriores se deberá confirmar la utilidad de la prueba para identificar la infección residual de TB en hatos previamente saneados.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de la CANETB, en particular a Orbelín Ruiz González y a José Ramón Gastellum, por su valiosa ayuda en la colección de sueros y aplicación de pruebas en campo; a la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, por la donación del PPD; y a Felicitas Vázquez Flores, por su ayuda técnica. Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología, de México, 28637-B y 29137-B.

Referencias

1. International Meeting on the Eradication of Bovine Tuberculosis in the Americas. Bull Pan Am Health Org 1992;26:279-281.
2. Gurriá TF. Situación actual de la campaña contra la tuberculosis y brucelosis en México. Méx Ganadero 1994;385:21-28.
3. González-Llamazares OR, Gutiérrez-Martin CB, Álvarez-Nistal D, de la Puente-Redondo VA, Domínguez-Rodríguez L, Rodríguez-Ferri EF. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Vet Microbiol 1999;70:55-66.
4. Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. Vet Rec 1992;131:45-47.
5. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet Rec 1994;135:134-135.
6. Wilesmith JW, Williams DR. Observations on the incidence of herds with non-visible lesioned tuberculin test reactors in south-west England. Epidemiol Infect 1987;99:173-178.
7. Díaz OF, Estrada-Chávez C, Banda RV, Arriaga C. Importancia del empleo de herramientas complementarias para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. II Congreso Nacional de la Academia Veterinaria Mexicana; 1999 junio 3-5; Veracruz, Ver. México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1999:41.
8. Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. Res Vet Sci 1989;47:43-47.
9. Estrada-Chavez C, Diaz OF, Perez GR. Comparison of three immunodiagnostic tests with necropsy examination results for diagnosis of bovine tuberculosis. International Symposium on Bovine Tuberculosis in Animals and Human Beings; 1995 Nov 14-18; Riverdale (Maryland) USA. Riverdale, MD, 1995:14.
10. Fifis T, Costopoulos C, Corner LA, Wood PR. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. Vet Microbiol 1992;30:343-354.
11. Sugden EA, Stilwell K, Rohonczy EB, Martineau P. Competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycobacterium bovis* infections based on MPB70 and lipoarabinomannan antigens. Can J Vet Res 1997;61:8-14.
12. Ostyn A, Laneelle MA, Thorel MF. Glycolipid antigen for use in diagnostic assays for bovine tuberculosis. Res Microbiol 1997;148:491-500.
13. Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. Infect Immun 1998;66:5344-5349.
14. Auer LA. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. Austr Vet J 1987;64:172-176.
15. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Ripper JL, Fifis T, McCormick BS, et al. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1992;31:71-79.
16. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, de Witte K, Melville L, et al. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. Austr Vet J 1989;66:15-19.
17. Hanna J, Neill SD, O'Brien JJ. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1992;31:243-249.
18. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol 1994;40:53-63.
19. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for isolation and identification of mycobacteria. Ames, Iowa: National Veterinary Services Laboratories, Veterinary Services, Animal Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture, 1993.

20. Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Austr Vet J* 1990;67:389-92.
21. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications. London (UK): Dynatech Laboratories, Inc., 1979.
22. Ritacco V. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Med Series B* 1990;37:19-27.
23. Denny GO, Wilesmith JW. Bovine tuberculosis in Northern Ireland: a case-control study of herd risk factors. *Vet Rec* 1999;144:305-310.
24. Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 1991;50:365-367.
25. Lepper AW, Corner LA, Pearson CW. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Austr Vet J* 1977;53:301-305.
26. Doherty ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC, Monaghan ML. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* 1995;56:1300-1306.
27. Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;49:307-320.