

## ARTÍCULOS ORIGINALES



## Comparación del ensayo de interferón gamma bovino con técnicas tradicionales para el diagnóstico de infección con

## *Mycobacterium bovis* en la Región Metropolitana de Chile



Patricio I Retamal<sup>1</sup>, MV, MS; Pedro E Abalos<sup>1</sup>, MV, MS.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile.  
pretamal@uchile.cl

(Recibido: 10 febrero, 2004; aceptado: 18 septiembre, 2004)

### Resumen

*La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de importancia económica y sanitaria en los planteles bovinos de países en desarrollo. La prueba cutánea de hipersensibilidad con derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis* ha sido la técnica más ampliamente utilizada para su diagnóstico, aunque presenta deficiencias en sensibilidad y especificidad, además de requerir una segunda inspección del animal para su interpretación. Con el fin de superar estos problemas se ha desarrollado el ensayo de IFN $\gamma$  bovino, que detecta la producción de esta citoquina por linfocitos del propio animal infectado. Diversos estudios han determinado que su eficiencia diagnóstica es similar a la prueba de tuberculina, pero ofrece la ventaja de requerir una sola manipulación del animal. El objetivo de este trabajo es comparar los resultados de un ensayo de IFN $\gamma$  bovino (Bovigam<sup>®</sup>, CSL Ltd., Melbourne, Australia) con tres técnicas tradicionales de diagnóstico, aplicadas generalmente en tejidos de animales beneficiados: examen post-mortem, tinción de Ziehl Neelsen y cultivo bacteriológico. Para ello, se eligieron un total de 142 muestras desde dos mataderos de la Región Metropolitana de Chile, consistentes en un trozo de ganglio mediastinal (20-40 gr) y sangre entera. Para confirmar el cultivo primario, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la secuencia de inserción (IS)1081, específica de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Los resultados de las comparaciones solo indicaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre las técnicas de cultivo bacteriológico y baciloscopía. En cuanto al nivel de concordancia, todas las pruebas demostraron valores significativos ( $p < 0.01$ ), aunque las mejores comparaciones se observaron entre las técnicas tradicionales. El ensayo de IFN $\gamma$  detectó a solo cinco de nueve individuos con infección confirmada por bacterias del complejo *M. tuberculosis* y mostró reactividad con otros nueve animales donde el cultivo bacteriológico no detectó infección. Además, identificó 26 reaccionantes (18%) al antígeno PPD de *M. avium*, demostrando una alta presencia de micobacterias atípicas o ambientales. A pesar de su simpleza, estandarización y mayor rapidez, la concordancia de sus mediciones con las otras pruebas de diagnóstico no es buena, requiriéndose el desarrollo de otros estudios que complementen su evaluación como prueba potencial para el diagnóstico de tuberculosis bovina en nuestro país.*

**Palabras clave:** ensayo de IFN $\gamma$ , tuberculosis bovina.

### Introducción

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa producida por *Mycobacterium bovis*, que afecta al ganado generando una infección crónica, capaz de provocar pérdidas económicas por emaciación progresiva y muerte de los animales, por

decomisos a nivel de mataderos y por una menor productividad y valoración de la leche. Además, es una zoonosis que ha adquirido mayor importancia por el desarrollo de cepas multirresistentes y la mayor incidencia de la infección por virus VIH (3).

A nivel mundial existen importantes motivaciones para instaurar programas que tiendan al control y erradicación de la tuberculosis bovina, entre las que se pueden mencionar: el riesgo que significa para la población humana, la disminución en la productividad del ganado y las posibles prohibiciones comerciales para la importación y exportación del ganado y/o subproductos (5, 6). En Chile, la enfermedad se relaciona principalmente al ganado bovino orientado a la producción de leche, con prevalencias que van desde el 5-25% de los rebaños lecheros en la zona centro-sur (V a X Regiones) (Servicio Agrícola y Ganadero, <http://www.sag.gob.cl>).

La prueba cutánea de hipersensibilidad con derivado proteico purificado (PPD) de *M. bovis*, ha permitido grandes avances en los programas de control de tuberculosis bovina en diversos países del mundo (6, 18). Sin embargo, cuando la prevalencia de la enfermedad se hace escasa (menor de un 1%), se requieren otras alternativas diagnósticas que permitan a través de una mejor sensibilidad, la detección eficaz de todos aquellos animales infectados. La aplicación de la prueba cutánea implica una doble manipulación de los animales, primero para la inoculación del antígeno PPD y 72 horas más tarde para el análisis e interpretación de las reacciones de hipersensibilidad. La existencia de predios con difíciles vías de acceso y la manipulación de animales silvestres son circunstancias que dificultan esta doble manipulación, situación que ha motivado el desarrollo y aplicación de técnicas con base en un solo muestreo (6, 15, 21), como es el caso de las pruebas de laboratorio que utilizan sangre. Entre éstas se encuentra el ensayo de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) bovino para la detección de inmunidad celular (21), que ha sido utilizado en programas de control de tuberculosis bovina debido a su simpleza y buena eficacia en el diagnóstico (1, 18, 21). Diversos trabajos han reportado una sensibilidad que fluctúa entre un 85-95%, con una especificidad entre un 88-96% (6, 11, 15). Se ha establecido que su sensibilidad es superior y su especificidad es similar o inferior a la tuberculina (20, 21, 25), por lo que se considera como una técnica complementaria a la prueba cutánea tradicional. Respecto de las otras técnicas tradicionales de diagnóstico, la prueba de IFN $\gamma$  tiene la ventaja de ser rápida, simple y fácilmente estandarizable en muestreos de gran escala. (1, 20, 26).

El objetivo de este trabajo es comparar el ensayo de IFN $\gamma$  bovino con tres técnicas tradicionales de diagnóstico, tales como el examen *post-mortem*, la tinción de Ziehl Neelsen y el cultivo bacteriológico,

para contribuir en su evaluación como prueba alternativa para la identificación de animales infectados con *M. bovis*.

## Materiales y métodos

### *Muestras*

El estudio se realizó con un muestreo de 142 bovinos beneficiados entre los meses de julio y noviembre de 2001 en dos mataderos de la Región Metropolitana de Chile. Para realizar la prueba de IFN $\gamma$ , a cada animal se le extrajeron 5 a 10 ml de sangre entera. Para realizar la tinción de Ziehl Neelsen y el cultivo bacteriológico, se extrajo un trozo de ganglio mediastinal (20-40 gr) a todos los animales, que fue depositado en una bolsa estéril, refrigerado y procesado antes de 24 horas, posteriores al muestreo. Los linfonódulos asociados con el tracto respiratorio son los órganos con mayor probabilidad de manifestar lesiones tuberculosas (2, 18). Este antecedente junto a la dificultad práctica de seleccionar, extraer y rotular más muestras de una misma canal durante su faenamiento en la línea de matadero, determinó la utilización del linfonódulo mediastinal para el desarrollo de las pruebas descritas. El tamaño muestral fue calculado considerando un nivel de confianza de 95%, con una diferencia de 20% y una potencia de 90% (9). Para el estudio se privilegiaron animales viejos y aquellos que manifestaron lesiones sospechosas de tuberculosis al examen *post-mortem*. Lamentablemente, en la fecha en que se realizó el muestreo no existía un sistema único de identificación de animales que permitiera conocer los antecedentes sanitarios de éstos, especialmente en lo que se refiere al diagnóstico de campo de tuberculosis bovina mediante la prueba de tuberculina.

### *Examen post-mortem*

Este análisis se realizó por los Médicos Veterinarios del Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (SESMA), según las indicaciones descritas en la circular N° 3G del Departamento de Programas Sobre el Ambiente del Ministerio de Salud de Chile (17). A nivel de la cabeza, la inspección se basó en la observación e incisión de los ganglios linfáticos subparotídeos, submaxilares y retrofaríngeos. Luego se examinó el resto de la canal, con mayor énfasis los ganglios mediastinales, mesentéricos e hígado.

### *Ensayo de IFN $\gamma$*

En el estudio se utilizó la prueba Bovigam® (Bovine  $\gamma$  Interferon Test Kit, CSL Ltd., Melbourne, Australia),

según Rothel *et al.* (25). En breve, la sangre fue colectada en tubos heparinizados de 10 ml y mantenida a temperatura ambiente durante un lapso no mayor a 12 horas pos-muestreo. Luego, cada muestra se aplicó en tres alícuotas de 1.5 ml a 3 pocillos de una placa de cultivo celular y se incubó por 16 a 24 horas a 37°C con 100 µl de antígenos estandarizados. Los antígenos incluyeron un control negativo (buffer fosfato salino [PBS] 0.01 M, pH 7.2), PPD de *M. avium* (PPD-A) y PPD de *M. bovis* (PPD-B). Estos dos últimos fueron preparados por CSL (Parkville, Australia) en la concentración recomendada para el ensayo (300 µg/ml). Después de la incubación, la placa se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se extrajeron 400 a 500 µl del sobrenadante, que fue almacenado a -20°C hasta su análisis posterior. Una vez obtenidas todas las muestras, se realizó el enzimo inmunoensayo (ELISA) de captura para el IFN $\gamma$  bovino. La lectura de las reacciones se realizó en un espectrofotómetro Immunoskan Plus® (BDSL), con un filtro de 450 nm. En la interpretación, el resultado se consideró positivo a infección con *M. bovis* cuando el sobrenadante del pocillo estimulado con PPD-B dio una lectura de al menos 0.05 unidades de densidad óptica más que el pocillo con PBS o con PPD-A. Así mismo, se determinó infección con *M. avium* cuando el pocillo estimulado con antígeno PPD-A superó en 0.05 unidades de densidad óptica a los pocillos con PBS o PPD-B.

#### *Tinción de Ziehl-Neelsen*

Esta técnica se realizó según el método descrito por Doetsch (7).

#### *Cultivo microbiológico*

El tratamiento del tejido linfoide para el cultivo bacteriológico se realizó según Kantor (12) y Corner (4). El tejido fue homogenizado en mortero con PBS y arena estéril. Para la descontaminación, 2 ml del homogenizado se incubaron a temperatura ambiente con 2 ml de hexadecilpiridina (HPC) al 0.5 % durante 30 minutos en agitación. Después de una centrifugación a 2000 g por 10 min, el tejido se lavó con PBS y se inoculó con una tórula estéril en 4 tubos de cultivo: 1) dos tubos en medio Agar Middlebrook 7H10 (Becton Dickinson) sin glicerol, enriquecido con ácido oleico-albumina-dextrosa-catalasa (OADC, Becton Dickinson) y piruvato de sodio. Uno fue incubado a 37°C y el otro a 25 °C. 2) dos en medio Stonebrink. Uno incubado a 37 °C y otro a 25 °C. Se realizaron

observaciones de los tubos una vez por semana, durante un período total de 12 semanas. Según Corner (4), las colonias de *M. bovis* en un medio Stonebrink son colonias pequeñas, redondas, de crecimiento lento, de color blanco o amarillo-pálido, de bordes irregulares y superficie granular. En medio Agar 7H10 las colonias son delgadas, aplastadas, con un sollevamiento en el centro, granulares y blancas. Además, el crecimiento debe ocurrir solo en los medios incubados a 37°C. El cultivo se consideró positivo cuando se verificó presencia de colonias compatibles (4), bacilos ácido alcohol resistentes a la tinción de Ziehl-Neelsen y amplificación de la secuencia de inserción (IS)1081 en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) (31).

#### *Ensayo de PCR*

Esta prueba se desarrolló sobre las cepas aisladas en los cultivos primarios y en una cepa de *M. bovis* (control positivo) y otra de *M. smegmatis* (control negativo). Se utilizaron partidores para amplificar un segmento de 306 pb de la secuencia IS1081, denominados BW6 (5' CGACACCGAGCAGCTTCTGGCTG 3') y BW7 (5' GTCGCCACCACGCTGGCTAGTG 3') (31). IS1081 corresponde a una secuencia específica de las bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (30). La extracción del DNA se realizó según el método descrito por Van Soolingen *et al.* (29), con algunas modificaciones. En breve, se suspendió una alícuota del cultivo en 200 µl de PBS. Después de una centrifugación por 20 minutos a 6000 g, se descartó el sobrenadante y se añadieron 230 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Luego se agregaron 3 µl de lisozima (10 mg/ml), se mezcló e incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 5 µl de sodio dodecilsulfato (SDS, 10%) y 1 µl de Proteinasa K (10 mg/ml). Después de mezclar e incubar por 10 minutos a 65°C, se agregó un volumen (vol) similar de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), para luego mezclar y centrifugar por 10 min a 13000 g. Se extrajo la fase acuosa y se agregaron 0.6 vol de isopropanol. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 15 minutos a 13000 g. Después de descartar el sobrenadante y lavar con etanol frío al 70% (200 µl), se realizó una centrifugación por 15 minutos a 13000 g, se eliminó el sobrenadante y dejó evaporar el etanol. Por último, el DNA se resuspendió en 20 µl de agua destilada y deionizada. La reacción de amplificación se trabajó con un volumen final de 20 µl, conteniendo buffer de reacción 1X (Promega), 1.25 U de *Taq* polimersa (Promega), 1.5

mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, y 15 pmol de cada partidor. El DNA blanco fue denaturado por una incubación de 5 minutos a 95°C, antes de la amplificación por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos, 72°C por otros 30 segundos y una última extensión a 72°C por 5 min. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador automático. Después de la amplificación, 3 µl de la mezcla fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (5 V/cm, por 20 minutos) conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Las bandas de amplificación se observaron y fotografiaron en un transiluminador con luz UV (300 nm).

### Análisis estadístico

El análisis se realizó con el programa estadístico SAS (SAS 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para determinar la presencia de diferencias significativas entre pruebas se utilizó la prueba estadística de McNemar (G). Para medir el grado de concordancia se utilizó el coeficiente kappa ( $\kappa$ ) (28), considerando valores de  $\kappa$  superiores a 0.75 como un excelente grado de concordancia; valores  $\kappa$  entre 0.4 y 0.75 se consideraron de regular a buena concordancia y valores inferiores como deficientes (9).

### Resultados

De las técnicas empleadas, la tinción de Ziehl Neelsen y el cultivo bacteriológico identificaron la mayor y menor cantidad de animales positivos a la infección con *M. bovis*, respectivamente (véase Tabla 1). Esta diferencia fue la única considerada estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) de entre todas las otras diferencias observadas para los resultados de las distintas pruebas evaluadas. El ensayo de IFN $\gamma$  detectó 14 animales (9.9%) con infección por *M. bovis*, no difiriendo significativamente con ninguna de las técnicas tradicionales ( $p > 0.01$ ) (véase Tabla 2). Además, esta misma técnica identificó 26 animales reaccionantes al PPD-A, sugiriendo una tasa de infección por *M. avium* de un 18.3%.

**Tabla 1.** Resultados de las diferentes técnicas para diagnóstico de tuberculosis bovina, desde muestras obtenidas en animales de matadero (N=142).

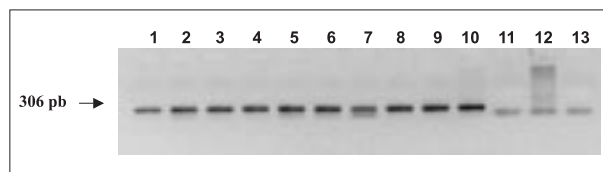
Prueba	Resultado	
	Negativo (%)	Positivo (%)
Post-mortem	126 (88.7)	16 (11.3)
Tinción Z-N	121 (85.2)	21 (14.8)
Cultivo	133 (93.7)	9 (6.3)
Ensayo IFN $\gamma$	128 (90.1)	14 (9.9)

**Tabla 2.** Resultados de la prueba de McNemar (G) e índice kappa ( $\kappa$ ) para las distintas comparaciones realizadas entre técnicas de diagnóstico de tuberculosis bovina.

Comparaciones	G	$\kappa$
Cultivo / Tinción Z-N	7.56*	0.415*
Cultivo / Pos-mortem	4.00	0.608*
Cultivo / ensayo IFN $\gamma$	1.23	0.388*
Tinción Z-N / Pos-mortem	1.78	0.721*
Tinción Z-N / ensayo IFN $\gamma$	1.71	0.319*
Post-mortem / ensayo IFN $\gamma$	0.06	0.404*

\*  $p < 0.01$

Todas las colonias compatibles con *M. bovis* y aisladas desde los tejidos mediante el cultivo bacteriológico, permitieron la amplificación de la secuencia IS1081 por PCR (véase Figura 1).



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa con DNA amplificado por PCR desde cultivos bacteriológicos. En la reacción se utilizaron los partidores BW6 y BW7 para identificar una región de 306 pb de la secuencia IS1081. En las columnas 1 a 9 se observan los resultados del PCR para los aislados de las muestras 55, 56, 71, 77, 78, 81, 82, 88 y 119 respectivamente. Las columnas 10 a 13 corresponden al control positivo (*M. bovis*) y tres controles negativos (DNA de *M. smegmatis* diluido 1:20, DNA de *M. smegmatis* sin diluir y reacción sin DNA) respectivamente.

En el análisis de concordancia todos los valores  $\kappa$  resultaron ser significativos ( $p < 0.01$ ), es decir, las coincidencias entre las distintas técnicas alcanzaron niveles mayores que lo esperado simplemente por el azar. Entre estos valores, las mejores concordancias se observaron entre las técnicas tradicionales, especialmente entre la tinción de Ziehl Neelsen y el examen post-mortem, aunque ninguna comparación alcanzó el nivel de excelente (véase Tabla 2). Respecto del ensayo de IFN $\gamma$ , sus valores de concordancia fueron los más bajos, clasificándose en niveles regulares a deficientes (véase Tabla 2).

La comparación de los resultados obtenidos entre el ensayo de IFN $\gamma$  y el cultivo bacteriológico (véase Tabla 3), considerando a esta última técnica como un "estándar de oro", determina un nivel de sensibilidad de un 55.6% para la primera.

**Tabla 3.** Comparación entre los resultados obtenidos por el ensayo de IFN $\gamma$  bovino y los métodos de tinción de Ziehl Neelsen (Z-N), examen post-mortem y cultivo bacteriológico.

	Tinción Z-N (%)		Post-mortem (%)		Cultivo (%)		
		Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Ensayo IFN $\gamma$ (%)	Pos	7 (4.9)	7 (4.9)	7 (4.9)	7 (4.9)	5 (3.5)	9 (6.3)
	Neg	14 (9.9)	114 (80.3)	9 (6.3)	119 (83.8)	4 (2.8)	124 (87.3)

En la tabla 3 se muestran las comparaciones entre los resultados del ensayo de IFN $\gamma$  y las otras pruebas, datos que permitieron los análisis detallados anteriormente.

### Discusión

Aunque el ensayo de IFN $\gamma$  no difiere significativamente con las otras técnicas evaluadas, los bajos niveles de concordancia de estas comparaciones reflejan importantes diferencias en la capacidad de las pruebas para identificar en la misma condición a los mismos individuos (véase Tabla 3). Esta situación puede deberse a las variaciones en sensibilidad y especificidad, pero fundamentalmente a las diferencias en los marcadores que cada técnica utiliza para determinar la condición de animal infectado. Es así como el ensayo de IFN $\gamma$  se basa en la detección de respuesta inmune celular contra *M. bovis*, mientras las otras técnicas se abocan a la identificación directa del agente infeccioso o de la lesión que provoca en los tejidos del animal. En teoría, la presencia de la bacteria debiera correlacionarse con la existencia de respuesta inmune, por lo que diferencias tan marcadas en la concordancia de los ensayos podrían atribuirse a deficiencias en los mismos. Sin embargo, es reconocido que en la patogenia de una infección tuberculosa existen una serie de factores, tanto del agente como del hospedero, que hacen más compleja la interpretación del diagnóstico. Por ejemplo, las micobacterias pueden inhibir la activación de los macrófagos impidiendo la fagocitosis del agente y la secreción de citoquinas claves en la respuesta celular (8, 23). Además, existen células del sistema inmune capaces de regular y modificar la respuesta frente a estos agentes (22). Este tipo de factores pueden influir en la generación de las discordancias encontradas entre los resultados del ensayo de IFN $\gamma$  con las otras tres técnicas del estudio. Considerando este mismo planteamiento, es esperable que la prueba de tuberculina, que diagnostica en base a una reacción cutánea dependiente de la respuesta inmune celular, tenga un mayor nivel de concordancia con los resultados del ensayo de IFN $\gamma$ , como ya se ha

descrito en un trabajo previo con un 90.8% de coincidencias y un valor de  $\kappa=0.63$  entre ambas pruebas (11). Este hecho resalta además la necesidad de utilizar en forma complementaria, diversas pruebas de diagnóstico para identificar correctamente la mayor cantidad de individuos infectados.

En los 9 animales en que se obtuvo aislamiento bacteriológico también se logró amplificación de la secuencia IS1081, confirmando la infección con algún agente del complejo *M. tuberculosis* y determinando con alta probabilidad que se trate de una infección por *M. bovis* (1). Se debe destacar que la aplicación del PCR permite confirmar rápidamente el resultado del cultivo primario, evitando el complejo y lento desarrollo de las pruebas bioquímicas subsecuentes.

De estos aislamientos, el ensayo de IFN $\gamma$  sólo detectó respuesta celular contra *M. bovis* en 5 de ellos (véase Tabla 3), lo que sugiere una sensibilidad de un 55.6%, muy por debajo de los niveles reportados en otros estudios, con valores de sensibilidad cercanos al 85% (11, 26). Las cuatro muestras negativas provinieron de animales en que además se verificó presencia de lesiones macroscópicas del ganglio mediastinal al examen *post-mortem*. Tales resultados pueden explicarse por una deficiencia en la sensibilidad analítica de la técnica, a un fenómeno de inmunodepresión del animal o a otros factores que se reflejen en una menor respuesta celular (10, 19, 23). En dos de las cuatro muestras referidas anteriormente, el ensayo de IFN $\gamma$  determinó reacción positiva al PPD-A, reflejando la existencia de antígenos compartidos entre las bacterias del género que pueden afectar la especificidad de la técnica. Tampoco se puede descartar una infección simultánea con más de una micobacteria, donde la consecuencia puede ser la misma. Es interesante observar que si no se hubiese incluido el antígeno PPD-A en el desarrollo de la técnica, las dos muestras en cuestión se habrían clasificado como reaccionantes positivas al PPD-B, ya que el pocillo estimulado con este antígeno entregó una diferencia diagnóstica respecto al control. Considerando estas muestras como

positivas a la infección con *M. bovis*, la sensibilidad de la técnica es de un 77.8%, por lo que en el análisis de los resultados del ensayo de IFN $\gamma$  es necesario evaluar con especial atención aquellas muestras que presenten reactividad a ambos antígenos micobacteriales, situación que se ya se ha reportado con anterioridad (16).

En nueve animales no se obtuvo aislamiento bacteriológico pero si se observó reacción a PPD-B en el ensayo de IFN $\gamma$  (véase Tabla 3). De estos, sólo tres tuvieron además lesiones compatibles y bacilos ácido alcohol resistentes al examen microscópico. Debido a que el cultivo bacteriológico sólo se intentó a partir del ganglio mediastinal, no se puede considerar esta técnica como “estándar de oro” para sugerir resultados falsos positivos del ensayo de IFN $\gamma$  o de las otras técnicas desarrolladas, requiriéndose para ello un muestreo más exhaustivo de diversos tejidos de la canal.

Del total de animales incorporados al estudio, 26 fueron identificados por el ensayo de IFN $\gamma$  como reaccionantes al PPD-A, determinando una tasa de reacción cercana al 18%. Esta situación implica una alta exposición a micobacterias ambientales, conocidas con el nombre de micobacterias del complejo *M. avium* (27), donde otras especies animales y diversos vectores ambientales juegan un importante rol en su transmisión. Además, existen antecedentes de la infección por *M. avium* subsp. *paratuberculosis* en animales de la región (datos no publicados), lo que puede explicar en parte ese hallazgo (15, 27). La presencia de este tipo de micobacterias puede afectar la interpretación del diagnóstico con determinados métodos, como en el caso del ensayo de IFN $\gamma$ , la prueba de tuberculina y la tinción de Ziehl Neelsen. En el caso de las pruebas basadas en la detección de inmunidad celular, la infección con micobacterias ambientales puede traducirse en la aparición de falsos positivos, y en una infección simultánea con *M. bovis* en la aparición de falsos negativos, según la predominancia de la reacción entre el antígeno PPD-A o PPD-B (15, 16, 24). En cuanto a la tinción de Ziehl Neelsen la consecuencia lógica de infección con micobacterias atípicas es la aparición de falsos positivos, situación que en el estudio pudo ocurrir en dos casos donde sólo se verificó baciloscopía positiva y reacción al antígeno PPD-A en el ensayo de IFN $\gamma$ . En consecuencia, es importante considerar el impacto que puede provocar la presencia de micobacterias atípicas en la eficiencia diagnóstica de las pruebas mencionadas, no existiendo hasta el momento estudios que evalúen este factor.

El cultivo bacteriológico y la tinción de Ziehl-Neelsen fueron las únicas pruebas que presentaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en la comparación de sus resultados, con una concordancia regular a deficiente (88.7%,  $\kappa = 0.4$ ) (véase Tabla 2). Esto puede estar reflejando debilidades en el método del cultivo bacteriológico, no solo por realizarse a partir de un tejido específico (el ganglio mediastinal) sino que también por el sometimiento de la muestra al proceso de descontaminación, que reduce la viabilidad de los cultivos de *M. bovis* (4). Este hecho, sumado al efecto planteado de las micobacterias del complejo *M. avium* en la tinción de Ziehl Neelsen constituyen argumentos que explican las diferencias encontradas entre estas pruebas. En un estudio anterior, Latini *et al.* (14) también determinan una baja concordancia entre la baciloscopía y el aislamiento bacteriológico (57%,  $\kappa = 0.2$ ), situación que confirma la necesidad de considerar a la tinción de Ziehl-Neelsen como una prueba complementaria, que requiere siempre de otros análisis para llegar a un diagnóstico adecuado de la infección.

En contraste, los exámenes microscópico y *post-mortem* tuvieron la mayor cantidad de resultados concordantes (93.7%,  $\kappa = 0.721$ ) de entre todas las comparaciones realizadas. Esto indica que, al menos en el ganglio mediastinal, la mayoría de las lesiones sospechosas de tuberculosis presentan bacilos ácido alcohol resistentes en su interior.

El ensayo de IFN $\gamma$  bovino ha demostrado ser una técnica simple que puede ser fácilmente estandarizada y aplicada al análisis de una gran cantidad de muestras, con una rápida obtención de resultados (6). Sin embargo, la concordancia de sus mediciones con las otras pruebas de diagnóstico incluidas en este estudio no es buena, requiriéndose el desarrollo de otros trabajos que contemplen la incorporación de un mayor número de muestras, identificando factores del animal o del predio de origen que puedan estar influyendo en la interpretación de los resultados. Es necesario desarrollar comparaciones con la prueba de tuberculina, técnica que el ensayo de IFN $\gamma$  bovino ha tratado de homologar en su utilidad para el diagnóstico de la enfermedad animal y humana (1, 13, 25). Del análisis de estas investigaciones podremos identificar el mejor momento para considerar esta técnica dentro de las alternativas que actualmente se aplican para el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

## Agradecimientos

Quisiéramos reconocer la valiosa cooperación de Patricia del Portillo, Víctor Manuel Tibatá y Juan Rodríguez, todos investigadores de la Corporación Corpogén (Bogotá, Colombia). Agradecemos también al Dr. Hugo Schenone (SESMA) y a los veterinarios que colaboraron con el trabajo de matadero.

## Summary

*Comparison of the bovine gamma-interferon assay with traditional techniques for detecting infection with Mycobacterium bovis*

*Bovine tuberculosis is an infectious disease of the great economic and sanitary importance in cattle from developing countries. The intradermal tuberculin test using purified protein derivative (PPD) from Mycobacterium bovis has been the widest used diagnostic technique, although it has some sensitivity and specificity deficiencies and requires a second inspection of the animal for its interpretation. Trying to overcome these restrictions a bovine gamma-interferon (INF $\gamma$ ) assay has been developed, which detects this cytokine produced by lymphocytes of the infected animal. Several studies have determined that its diagnostic efficiency is similar to the tuberculin test, but it gives the advantage of only one contact with the animal. In this work the bovine INF $\gamma$  assay, Bovigam® (CSL Ltd. Australia), was compared with three traditional diagnostic techniques used for tuberculosis diagnosis in slaughtered animals: post-mortem examination, Ziehl-Neelsen stain, and bacteriological culture. For this purpose, mediastinal lymph nodes (20-40g) and heparinized blood samples from 142 animals slaughtered in meat processing plants of the Región Metropolitana, Chile, were collected. To confirm the primary culture, a PCR test was performed by amplification of the insertion sequence (IS)1081, which is specific for species of the M. tuberculosis complex. Comparison of results showed significant differences ( $p < 0.01$ ) between bacteriological culture and Ziehl-Neelsen stain. In respect with the concordance level, all the techniques gave significant values ( $p < 0.01$ ), although the best concordances were obtained among the traditional tests. The bovine INF $\gamma$  assay detected only in five of nine animals with confirmed infection by culture of bacteria belonging to the M. tuberculosis complex and showed reactivity in nine animals which cultures were negative. Furthermore, identified 26 reactors (18%) to the M. avium PPD antigen, which means a high presence of atypical or environmental mycobacteria. Instead of simplicity, standardisation and celerity, the concordance with the other diagnostic tests considered in this study was poor, and more work to complete the evaluation as a potential test for bovine tuberculosis diagnosis in local epidemiological condition is required.*

**Keywords:** *diagnosis, INF $\gamma$  assay, bovine tuberculosis.*

## Referencias

- Adams L. In vivo and In vitro diagnosis of Mycobacterium bovis infection. In Mycobacterial infections in domestic and wild animals (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds). Rev sci tech Off int Epiz 2001; 20: 304-324.
- Barthel R, Piedrahita J, McMurray D, Payeur J, Baca D, *et al.* Pathologic findings and association of Mycobacterium bovis infection with the bovine NRAMP1 gene in cattle from herds with naturally occurring tuberculosis. Am J Vet Res 2000; 61:1140-1144.
- Collins C. The bovine tubercle bacillus. Br J Biomed Sci 2000; 57:234-240.
- Corner LA. Bovine Tuberculosis: Pathology and Bacteriology. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. L.A. Corner and T.J. Bagust (Eds). CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management: East Melbourne; 1993.
- Cosivi O, Grange J, Daborn C, Raviglione M, Fujikura T, *et al.* Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. Emerg Infect Dis 1998; 4: 59-70.
- Cousins D, Corner L, Tolson J, Jones S, Wood P. Eradication of bovine tuberculosis from Australia: Key management and technical aspects. Cousins O. and Corner L. Eds. CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia. 1998.
- Doetsch R. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of Methods for General Bacteriology. Gerhardt and Murray (editors). Chapter 3. 1981. pp 21-33.

8. Ehlers M, Daffé M. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol.* 1998; 6:328-335.
9. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions* 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 1981.
10. Flynn J, Chan J. Tuberculosis: Latency and reactivation. *Infect Immun* 2001; 69: 4195-4201.
11. González O, Gutiérrez C, Alvarez D, De la Puente V, Domínguez L, *et al.* 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.
12. Kantor I. *Bacteriología de la tuberculosis humana y animal. Serie de Monografías Científicas y Técnicas. Centro Panamericano de Zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Buenos Aires, Argentina. 1988.*
13. Kimura M, Converse P, Astemborski J, Rothel J, Vlahov D, *et al.* Comparison between a whole blood interferon- $\gamma$  release assay and tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection among patients at risk for tuberculosis exposure. *J Infect Dis* 1999; 179: 1297-1300.
14. Latini O, Canal A, Ferrara M, Sequeira M, Sequeira G, *et al.* Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomisos en frigoríficos. *Arch Med Vet* 1997; 29: 197-204.
15. Lauzi S, Passoto D, Amadori M, Archetti I, Poli G, *et al.* Evaluation of the specificity of the  $\gamma$ -Interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *Vet Journal* 2000; 160: 17-24.
16. Liébana E, Aranaz A, Urquía J, Mateos A, Domínguez L. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. *Aust Vet J* 1998; 76: 50-54.
17. Ministerio de Salud de Chile. Reactualización de normas de inspección sanitaria de carnes y criterios de decomiso en reses de abasto. Circular N° 3G. Departamento de Programas Sobre el Ambiente. Ministerio de Salud, Chile. 1983.
18. Morrison W, Bourne F, Cox D, Donnelly C, Gettinby G, *et al.* Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Vet Rec* 2000; 146: 236-242.
19. Murray P. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 1999; 7: 366-372.
20. Neill S, Pollock J. Testing for bovine tuberculosis – more than skin deep. *Vet Journal* 2000; 160: 3-5.
21. OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Bovine tuberculosis. Chapter 2.3.3. 5<sup>th</sup> ed. 2004. URL: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm).
22. Rhodes S, Hewinson R, Vordermeier H. Antigen recognition and immunomodulation by  $\gamma\delta$ T cells in bovine tuberculosis. *J Immunol* 2001; 166: 5604-5610.
23. Rook G, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Ann Rev Microbiol* 1996; 50: 259-284.
24. Rothel J, Jones S, Corner L, Cox J, Wood P. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Aust Vet J* 1992; 69 :1-4.
25. Rothel J, Corner L, Wood P. Immunodiagnosis. In: Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. L.A. Corner and T.J. Bagust (editors). CSIRO for the Standing Committee on Agriculture and Resource Management: East Melbourne. 1993.
26. Ryan T, Buddle B, de Lisle G. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci* 2000; 69: 57-61.
27. Thorel M, Huchzermeyer H, Michel A. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. In *Mycobacterial infections in domestic and wild animals* (E.J.B. Manning & M.T. Collins, eds). *Rev sci tech Off int Epiz* 2001; 20: 204-218.
28. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science Ltd., Cambridge, USA. 1995.
29. Van Soolingen D, Hermans P, de Haas P, Soll D, Van Embden J. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2578-2586.
30. Van Soolingen D, Hermans P, de Haas P, Van Embden J. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1772-1777.
31. Wards B, Collins D, de Lisle G. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995; 43: 227-240.