

FUNDAMENTO INMUNOLÓGICO DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS ANTE MORTEM DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS

Javier Bezos Garrido¹, Carmen Casal Comendador¹, Beatriz Romero Martínez¹, Julio Álvarez Sánchez², Lucía de Juan Ferré^{1,3}, Lucas Domínguez Rodríguez^{1,3}. 2013. PV ALBEITAR 51/2013.

1. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). UCM.
2. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM).
3. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

www.produccion-animal.com.ar

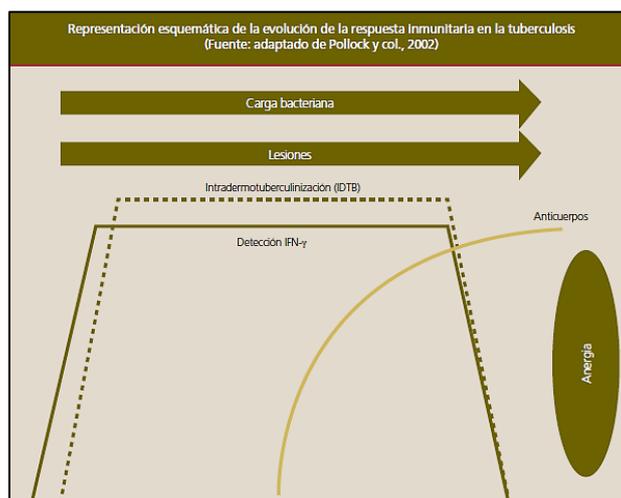
Volver a: [Enf. infecciosas de los bovinos en general](#)

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el diagnóstico ante mortem de la tuberculosis en rumiantes se realiza fundamentalmente a través de pruebas basadas en la respuesta inmunitaria celular, que es el tipo de respuesta más importante frente a la infección por *Mycobacterium*.

La tuberculosis en rumiantes domésticos está producida principalmente por *Mycobacterium bovis* y en menor medida por *M. caprae*, que es el principal agente etiológico de la tuberculosis caprina en España (Aranaz y col., 2003; Palmer, 2007; Crawshaw y col., 2008). Ambos agentes etiológicos pueden afectar también al hombre, lo que convierte a la enfermedad en una zoonosis relevante en salud pública (Rodríguez y col., 2009). La enfermedad es generalmente de curso crónico y la infección se produce principalmente por vía aerógena, por lo que las lesiones granulomatosas características aparecen en pulmón y linfonodos respiratorios asociados (Palmer y Waters, 2006; Palmer y col., 2007; Sánchez y col., 2011).

La respuesta inmunitaria de base celular (*cell mediated immunity*-CMI) mediada por linfocitos T es la más importante en el desarrollo de la tuberculosis, y la que se establece con mayor intensidad en las primeras fases de la enfermedad (Palmer y col., 2006; Pollock y col., 2006; Schiller y col., 2010). Además, también existe producción de anticuerpos específicos, aunque en condiciones normales es menos relevante y comienza a adquirir mayor intensidad en fases avanzadas de la infección, a medida que la respuesta celular va decayendo (figura). La dosis infectiva se plantea como uno de los factores que afectan a las características de la respuesta inmunitaria desarrollada frente a la bacteria, determinando su mayor o menor intensidad. De este modo, ciertos estudios observaron que dosis infectivas altas se relacionaban con el desarrollo de una CMI y la rápida aparición de anticuerpos circulantes frente a *M. bovis*. La relativa importancia de la respuesta humoral desde el punto de vista de la protección frente a la infección se debe a que *M. bovis* y *M. caprae* son patógenos intracelulares y se consideraba que en ese ambiente estaban “protegidos” de la acción neutralizante de los anticuerpos. Actualmente ese concepto está cambiando y se está sugiriendo la importancia de los linfocitos B y de los anticuerpos en el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora frente a la tuberculosis gracias a estudios desarrollados en humanos infectados con *M. tuberculosis* (Balu y col., 2011). De hecho, los anticuerpos podrían ser un buen indicador de fenómenos de latencia y desempeñar un papel importante evitando la reactivación de la enfermedad. Además, la presencia de anticuerpos frente a la tuberculina en animales anérgicos (animales que no responden a las pruebas diagnósticas a pesar de estar infectados) puede ser causa de la falta de reactividad en la prueba IDTB (Encinales y col., 2010).



Actualmente, el diagnóstico ante mortem de la tuberculosis en rumiantes domésticos se realiza fundamentalmente a través de pruebas basadas en la CMI (intradermotuberculinización [IDTB] y prueba de detección de interferón -gamma [IFN-g]), que, como se ha mencionado anteriormente, es el tipo de respuesta más importante frente a la infección. Ambas pruebas se vienen aplicando desde hace años según se establece en el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina y los programas específicos de control de la tuberculosis en ganado caprino (en aquellas comunidades autónomas en las que se aplica).

INTRADERMOTUBERCULINIZACIÓN

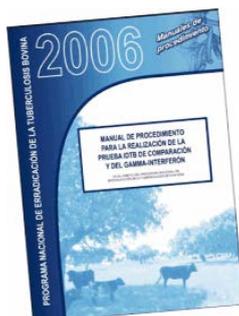
La prueba de IDTB tiene como fundamento inmunológico la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) o hipersensibilidad de tipo IV, que es una reacción inflamatoria local de base celular inducida por citoquinas (IL-2, IL-3, IFN-g y TNF-a, entre otras) secretadas por ciertas subpoblaciones de linfocitos Th1 (proinflamatorios) activados previamente por contacto con el antígeno. Se denomina retardada porque, al contrario que la inmediata, tarda dos o tres días en manifestarse. En condiciones naturales, se caracteriza por el reclutamiento al foco infeccioso de grandes cantidades de células inflamatorias, sobre todo de macrófagos. Por tanto, la prueba IDTB se basa en la DTH provocada artificialmente tras la inoculación intradérmica de antígenos específicos de micobacterias (tuberculinas o derivado proteico purificado de *M. bovis* y *M. avium* [PPD bovina y aviar respectivamente]), lo que provoca una reacción local en el punto de inoculación en caso de que el animal hubiera estado previamente en contacto con la bacteria (es decir, estuviese infectado o enfermo). La DTH tiene varias fases, con la fase efectora que ocurre en tejido extralinfoide como la reacción de hipersensibilidad en sentido estricto, detectándose los signos a partir de las 24 horas del contacto secundario con el antígeno (PPD) y alcanzando su apogeo a las 72 horas.; de ahí que se recomiende la lectura con cutímetro e interpretación de los signos clínicos en ese momento. En esta fase efectora tiene lugar (si el animal fuese rector positivo) la extravasación de fibrinógeno al tejido, convirtiéndose en fibrina, que junto con la acumulación de linfocitos T y de macrófagos hace que el tejido se inflame y endurezca (base de los signos clínicos de induración y edema) (sexta edición de *Kuby Immunology*, 2007).



Intradermotuberculinización (IDTB) empleando jeringa Dermojet en un ternero (izquierda).
Medición del pliegue cutáneo mediante cutímetro previamente a la inoculación de la tuberculina en una vaca.

DETECCIÓN DE INTERFERÓN-GAMMA

La prueba de detección del IFN-g (Bovigam, Prionics, Suiza) es una técnica *in vitro* empleada en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, que se aplica en paralelo con la IDTB con objeto de incrementar la sensibilidad y maximizar la detección de animales infectados (Álvarez y col., 2008; Coad y col., 2008). Actualmente, en la Unión Europea es considerada prueba oficial complementaria para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Decisión de la Comisión del 8 de julio de 2002 corrigiendo anexo B de la Directiva Europea 64/432). En términos generales, esta técnica ha mostrado una mayor sensibilidad que la prueba IDTB, aunque en detrimento de cierta especificidad (Schiller y col., 2010, Bezos y col., 2011a).



Manual de procedimiento para la realización de la IDTB de comparación y de la técnica de detección de INF-g del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino y el Centro VISAVET.

Esta prueba, al igual que la IDTB, también tiene como fundamento la CMI, permitiendo la detección mediante una técnica de ELISA del IFN-g específico liberado por los linfocitos de sangre periférica (principalmente linfocitos T) tras el contacto con el antígeno (PPD) añadido a una muestra de sangre del animal (Wood y col., 1991; Wood and Jones, 2001).

Resumidamente, la prueba consta de dos fases principales: la primera, y la más crítica, pues se ha visto en diversos estudios en ganado bovino y caprino que variaciones en esta fase pueden alterar sustancialmente los resultados (Gormley y col., 2004; Schiller y col., 2009 y 2010; Bezos y col., 2011b), es aquella en que la sangre es extraída de los animales y remitida al laboratorio, estimulada con los antígenos (PPDs u otros antígenos específicos) e incubada durante un periodo de 18-24 horas. En la segunda fase, el IFN-g presente en el plasma recogido mediante centrifugación es detectado y cuantificado mediante ELISA tipo sándwich comercial.

En España, se recomienda que las sangres sean conservadas a temperatura ambiente y procesadas en el laboratorio antes de transcurridas ocho horas desde que fuesen extraídas, ya que tiempos superiores pueden afectar a la viabilidad de los linfocitos alterando la sensibilidad de la técnica (Manual de procedimiento de para la realización de la prueba IDTB de comparación y del gamma-interferón del actual Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino elaborado en el año 2006, www.rasve.mapa.es). Actualmente se están probando diferentes antígenos en ganado bovino principalmente para sustituir a las PPDs con objeto de mejorar la especificidad de la técnica, así como para el desarrollo de pruebas para diferenciar entre animales vacunados e infectados (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals-DIVA test*) para el hipotético caso de que se aprobase su uso en el futuro. ESAT-6 y CFP-10 son proteínas presentes en *M. tuberculosis/M. bovis/M. caprae* que han resultado ser buenos candidatos para tal objetivo (Vordermeier y col., 2001 y 2002; Aagaard y col., 2010, Bezos y col., 2011c), por separado o en combinación con otros antígenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust. Vet. J.* 68, 286-290.
- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Guitierrez Pabello, J.A., McNair, J., Andersen, P., Guemes, F.S., Pollock, J., Espitia, C., Cataldi, A., 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Prev. Vet Med.* 96, 161-9.
- Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Reviriego-Gordejo, F.J., Briones, V., Moreno, M.A., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2008. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Vet. Microbiol.* 128, 72-80.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L., 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1785-1789.
- Balu, S., Reljic, R., Lewis, M.J., Pleass, R.J., McIntosh, R., van, K.C., van, E.M., Challacombe, S., Woof, J.M., Ivanyi, J., 2011. A Novel Human IgA Monoclonal Antibody Protects against Tuberculosis. *J Immunol.* (En prensa).
- Bezos, J., Álvarez, J., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Castellanos, E., Saéz-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez L. and Aranaz A. 2011a. Factors influencing the performance of an interferon- γ assay for diagnosis of tuberculosis in goats. *Vet. J.* 190: 131-135.
- Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L. 2011bc. Tuberculosis in goats: Assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *Vet. J.* (En prensa).
- Bezos, J., Álvarez, J., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Hewinson, R.G., Vordermeier, M., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A. 2011c. Assessment of in vivo tuberculosis diagnostic tests in *Mycobacterium caprae* naturally infected caprine flocks with different epidemiological situations. *Prev. Vet Med.* 100 (3-4): 187-192.
- Coad, M., Downs, S.H., Durr, P.A., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2008. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Vet. Rec.* 162, 382-384.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de la Rúa-Domenech, R., 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Vet. Rec.* 163, 127.
- Encinales, L., Zuniga, J., Granados-Montiel, J., Yunis, M., Granados, J., Almeciga, I., Clavijo, O., Awad, C., Collazos, V., Vargas-Rojas, M.I., Banales-Méndez, J.L., Vázquez-Castañeda, L., Stern, J.N., Romero, V., Fridkis-Hareli, M., Terremos, D., Fernández-Vina, M., Yunis, E.J., 2010. Humoral immunity in tuberculin skin test anergy and its role in high-risk persons exposed to active tuberculosis. *Mol. Immunol.* 47, 1066-1073.
- Gormley, E., Doyle, M.B., McGill, K., Costello, E., Good, M., Collins, J.D., 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 413-420.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., 2006. Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: what policy makers need to know. *Vet. Microbiol.* 112, 181-190.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Lyashchenko, K.P., 2006. Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 387-394.
- Palmer, M.V., 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315, 195-215.
- Palmer, M.V., Waters, W.R., Thacker, T.C., 2007. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Pathol.* 44, 863-874.

- Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D., McNair, J., 2006. Pathogenesis of bovine tuberculosis: the role of experimental models of infection. *Vet. Microbiol.* 112, 141-150.
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J., 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13, 1536-1541.
- Sánchez, J., Tomás, L., Ortega N., Buendía, A.J., del Río, L., Salinas, J., Bezos, J., Caro, M.R., Navarro, J.A. 2011. Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitory pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. *J. Comp. Pathol.*, 145 (2-3): 107-17.
- Schiller, I., Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Nonnecke, B., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Sigafosse, T., Stamm, C., Palmer, M., Thacker, T., Hardegger, R., Marg-Haufe, B., Raeber, A., Oesch, B., 2009. Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1196-1202.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 205-220.
- Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmer, N., Hewinson, R.G., 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 8, 571-578.
- Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., Cockle, P.J., Whelan, A.O., Simmons, J., Hewinson, R.G., 2002. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 3026-3032.
- Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweddle, N.E., 1991. Field comparison of the interferon-gamma.
- Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* 81, 147-155.

[Volver a: Enf. infecciosas de los bovinos en general](#)