

EVALUACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN LA PRUEBA DE INTERFERÓN GAMMA EN BOVINOS TUBERCULOSOS NO REACTORES A LA PRUEBA TUBERCULÍNICA

X. Ferrara Muñiz¹, S. G. Garbaccio², F. Delgado², C. Garro², P. Huertas², M. J. Marfil¹, M. J. Zumárraga¹, M. E. Eirin¹,

1-Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

2-Instituto de Patobiología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina.

eirin.maria@inta.gob.ar

Introducción

La tuberculosis se encuentra presente en rodeos bovinos de nuestro país, impactando a nivel de los sistemas de producción de cría y lecheros por disminuir la eficiencia productiva de los animales infectados e imponer restricciones al comercio internacional de productos cárnicos, lecheros y sus derivados. A su vez, constituye un problema de salud pública por tratarse de una zoonosis. A nivel internacional, se ha demostrado que la prueba intradérmica de la tuberculina es eficaz en la identificación de los animales infectados por *M. bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB), siendo la prueba oficial a nivel local que se emplea en el marco del plan de control y erradicación (SENASA, Resol. 128/12)¹. Sin embargo, existen animales que por diferentes causas si bien están infectados no reaccionan a dicha prueba, representando un problema para aquellos establecimientos que entran en etapa de saneamiento. Estos animales constituyen potenciales focos de infección ya que pueden ser excretores de la micobacteria. La determinación de liberación de interferón gamma (IFN- γ) es una técnica que puede emplearse de manera complementaria a la prueba intradérmica de la tuberculina. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la determinación de IFN- γ , utilizando como inmunógeno proteínas recombinantes de *M. bovis* con el fin de estudiar la capacidad de detección de animales no reactivos a la prueba tuberculínica en rodeos en saneamiento.

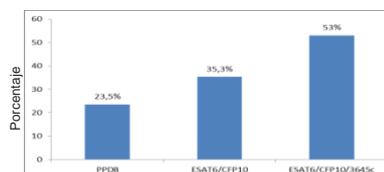
Materiales y métodos

Se estudiaron un total de 17 bovinos de la raza Holando Argentino, provenientes de diferentes explotaciones lecheras. Los animales tenían historia previa de resultado negativo a la prueba tuberculínica y provenían de rodeos en saneamiento. Sin embargo, habían resultado positivos al serodiagnóstico. La necropsia de los mismos evidenció la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis, con cultivo positivo para *M. bovis*². A partir de una muestra de sangre anticoagulada con heparina, se realizó la estimulación con diferentes antígenos: tuberculina aviar, tuberculina bovina (Thermo Fisher Ltd, Switzerland), una mezcla antigénica de las proteínas recombinantes ESAT6/CFP10 y ESAT6/CFP10/Mb3645c. Como controles se utilizó buffer fosfato salino (PBS) y un mitógeno celular (*Pokeweed mitogen*). Para la detección de IFN- γ se empleó un kit comercial (Bovigam, Thermo Fisher Ltd, Switzerland). La liberación de IFN- γ se determinó por espectrofotometría siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de los antígenos recombinantes se realizaron teniendo en cuenta la densidad óptica (DO) de un determinado antígeno menos la obtenida en presencia de PBS (basal) (Δ DO). Un valor de Δ DO \geq 0.1 fue considerado positivo. Los resultados se analizaron con el programa *GraphPad Prism* versión 5.01.

Resultados

Del total de animales estudiados, 23,5% (4/17) fueron positivos según los criterios de positividad del kit comercial. A su vez, se detectaron 35,3% (6/17) de animales positivos cuando se estimuló la sangre con la mezcla antigénica ESAT6/CFP10; 3 de ellos habían sido negativos según el criterio de positividad del kit comercial. Cuando se empleó la mezcla antigénica ESAT6/CFP10/Mb3645c 53% (9/17) de los animales resultaron positivos, 5 de ellos habían sido negativos según el criterio de positividad del kit comercial (Figura 1). De los 9 animales positivos para ESAT6/CFP10/Mb3645c, 2 bovinos reaccionaron positivamente sólo cuando se estimuló la sangre con ESAT6/CFP10/Mb3645c, mientras que los 7 restantes reaccionaron también ante la estimulación con tuberculina bovina y/o con ESAT6/CFP10. Ambas mezclas recombinantes ESAT6/CFP10 y ESAT6/CFP10/Mb3645c detectaron a los 4 bovinos que habían sido diagnosticados como positivos según la estimulación con tuberculina empleada en el kit comercial.

Fig1. Frecuencias de animales positivos para la técnica *in vitro* de liberación de IFN- γ según se estimularon con los diferentes antígenos (tuberculina o con diferentes mezclas de los antígenos).



Discusión y Conclusión

El empleo de los antígenos permitió elevar en un 50% la detección asociada a la tuberculina, indicando que los mismos podrían representar una herramienta valiosa en la optimización del diagnóstico *in vitro* para la TBB en animales no reactivos a la prueba tuberculínica.

Se confirmó la utilidad del empleo de antígenos recombinantes como ESAT6, CFP10 y Mb3645c conocidos como potentes inductores de la respuesta inmune mediada por células.

Los resultados sugieren que la mezcla ESAT6/CFP10/Mb3645c sería la indicada ya que complementaría a la tuberculina en la técnica de detección *in vitro* de liberación de IFN- γ , permitiendo detectar a una mayor cantidad de animales infectados.

Bibliografía

¹ www.senasa.gov.ar

² Tesis Doctoral. Dr. Garbaccio. Mejoramiento del diagnóstico de la tuberculosis bovina a partir de diversas muestras clínicas. Fac. Cs. Veterinarias, UBA.