sns N.º 7, enero-marzo de 2015
ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar

DESARROLLO DE UN TEST DIAGNÓSTICO PARA LA TUBERCULOSIS Y PARATUBERCULOSIS BOVINA BASADO EN LA DETECCIÓN IN VITRO DE IFNγ

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC TEST FOR BOVINE TUBERCULOSIS AND PARATUBERCULOSIS BASED ON IN VITRO DETECTION OF γIFN

Marina A. Forrellad (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA Castelar), **Osvaldo Zabal** (Instituto de Virología, Centro de Ciencias Veterinarias y Agronómicas – CICVyA / INTA Castelar), **Federico C. Blanco** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA Castelar), **Elizabeth A. García** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA), **Rosana V. Rocha** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA), **María I. Romano** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA), **Oscar A. Taboga** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA) **y Fabiana Bigi** (Instituto de Biotecnología, CICVyA / INTA) - Argentina

Resumen

La tuberculosis bovina (TBB) y la paratuberculosis bovina (PTB) son enfermedades de alta prevalencia en nuestro país. Actualmente, existe una campaña nacional para la erradicación de la TBB debido a su alta prevalencia en rodeos y en animales silvestres, y habida cuenta de que el agente causal se transmite a los seres humanos, constituye un importante problema de salud pública.

El método diagnóstico oficialmente aprobado para el control de la TBB y PTB es la intradermorreacción con PPD bovina (PPDb) o PPD aviar (PPDa), respectivamente; sin embargo, y como ocurre en otros países del mundo, se han planteado pruebas alternativas que ayudarían a mejorar el diagnóstico y, por ende, el control de estas enfermedades. Entre las pruebas paralelas a la oficial, la detección de IFNγ es una de las opciones más viables. En este contexto, nos hemos propuesto desarrollar un test diagnóstico para ambas enfermedades basado en la detección y cuantificación *in vitro* de IFNγ generado luego de la estimulación de células de sangre periférica con antígenos específicos. El abordaje de este desarrollo contribuirá significativamente a las estrategias de control de la TBB y PTB con un producto de desarrollo nacional, innovador y de un costo accesible.

Palabras clave: tuberculosis bovina, IFNγ, paratuberculosis bovina.

Abstract

This project aims to develop diagnostic tests for tuberculosis (TBB) and paratuberculosis (PTB) in cattle based on detection and quantification of the in vitro production of γIFN that is generated after stimulation of peripheral blood cells with specific antigens. The TBB and PTB are two diseases of high prevalence in our country that generate significant economic losses. Moreover, these diseases are a public health problem, as the TBB is spread from animals to humans and there is some evidence to suggest that the bacteria causing PTB is associated with Crohn's disease in humans.

The officially diagnostic test approved by Senasa is the skin test; however, alternative and parallel tests could improve the diagnosis of these diseases, being the detection of γIFN one of the most viable options. Therefore, the development and production of the tests proposed here will contribute significantly to the control strategies of TBB and PTB with a national product accessible in economic terms.

Keywords: bovine tuberculosis, γIFN, bovine paratuberculosis.

Introducción

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad endémica en la Argentina (1) causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*. El principal hospedador es el ganado bovino; y los tambos argentinos y las haciendas, los principales núcleos de infección. Se estima que en nuestro país las pérdidas económicas debidas a la TBB rondan los U$S 63.000.000 anuales, como resultado del bajo peso de los animales, en la producción y en calidad de la leche y el decomiso en frigoríficos y mataderos debido a lesiones macroscópicas compatibles con la enfermedad (2).

Además del ganado vacuno, *M. bovis* es capaz de infectar caprinos, cerdos y otros mamíferos salvajes (Lo Bue, Enarson y Thoen, 2010), como lo demuestra una cepa de *M. bovis* hipervirulenta aislada de un jabalí perteneciente a

sns N.º 7, enero-marzo de 2015
ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar

un coto de caza ubicado en la provincia de Buenos Aires (Meikle *et al.*, 2011). La existencia de estos reservorios naturales de contagio constituye un grave problema para las campañas de control de la enfermedad. *M. bovis* también es capaz de infectar al hombre y está caratulada como una de las principales zoonosis del país y, por lo tanto, se trata de una problemática de salud pública. Los principales afectados viven en áreas tamberas, son trabajadores rurales y veterinarios en contacto con animales infectados o consumen leche no pasteurizada y, en menor número, son empleados de la salud e investigadores en contacto con la bacteria. En la Argentina, el diagnóstico de animales infectados se realiza mediante la prueba de la tuberculina o intradermorreacción (PTub/IDR), que consiste en la aplicación intradérmica de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovina o tuberculina) y la detección de inmunidad celular o hipersensibilidad de tipo retardado. Si bien esta prueba ha sido usada con éxito en campañas de control de la TBB de numerosos países y actualmente es la oficial en la Argentina, otros métodos alternativos y paralelos a PTub/IDR se podrían considerar a fin de mejorar el diagnóstico.

Es posible encontrar falsos negativos a la PTub/IDR a causa de desensibilización posttuberculinización, anergia, malnutrición de los animales, lactancia y gestación o por otras causas, como el uso de tuberculinas de baja potencia, incorrecta lectura, incorrecta dosificación, etcétera. El resultado de este error implica la permanencia de animales infectados que se convierten en focos de contagio y la persistencia del patógeno en el rodeo y en reservorios silvestres.

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map) es el agente causante de la PTB y algunos investigadores postulan que, además, es el agente causante de la enfermedad de Crohn en el humano (Hermon-Taylor *et al.*, 2002).

La principal estrategia mundialmente adoptada para fortalecer las campañas de control de la TBB y PTB es reforzar el diagnóstico de la tuberculina con un test basado en la medición del interferón gamma (IFNγ) liberado en sangre frente a la estimulación *in vitro* con antígenos específicos del patógeno. El test se basa en la capacidad que tienen los linfocitos T de memoria, presentes en la sangre bovina, de proliferar y producir IFNγ frente al reconocimiento de antígenos específicos de un patógeno en particular. Solo si un animal está o estuvo infectado o sensibilizado (vacunado) con ese patógeno, tendrá los linfocitos T de memoria productores de IFNγ específicos para los antígenos del patógeno. La técnica de IFNγ sería una excelente prueba complementaria por sus características de especificidad y sensibilidad. Es ampliamente aceptado que esta técnica detecta individuos infectados que escapan al test intradérmico, ya sea por desensibilización luego de repetidas pruebas tuberculinicas o porque no reconoce etapas más tempranas de la infección (Coad *et al.*, 2008). La prueba de IFNγ sumada al test BOVIGAM™ se está usando ampliamente en Francia, España, Italia, Irlanda, el Reino Unido, EE. UU., Nueva Zelanda y Australia. En 2002, la prueba de IFNγ fue aprobada por la Unión Europea para su uso en el diagnóstico de la TBB como "prueba accesoria a la tuberculina" con el objeto de permitir la detección del máximo número de animales infectados o enfermos en un rodeo o en una región. En octubre de 2006, comenzó a utilizarse en Gran Bretaña y se ha aplicado desde entonces en circunstancias muy definidas, como en rodeos que han tenido animales *post mortem* positivos a TBB (con lesiones compatibles o cultivo positivo). Se ha demostrado en ese país que el uso adicional de la prueba IFNγ comercial (BOVIGAM™) permite identificar un 26 % más de animales con lesiones o cultivo positivo que la prueba de la tuberculina únicamente (Vordermeier *et al.*, 2006). Cabe destacar, además, que la prueba de IFNγ (BOVIGAM™) está incluida en el manual de la OIE como auxiliar a la prueba de la tuberculina y se la utiliza para negar o confirmar el resultado de una prueba intradérmica (3). La ventaja adicional del test es que posibilita la detección de animales con TBB o con PTB mediante la utilización de antígenos específicos para cada uno de los agentes causantes de estas enfermedades.

En nuestro país, el uso de la prueba de IFNγ como prueba diagnóstica aún no está contemplado en los planes de control. El Senasa trabaja desde hace muchos años en los kits diagnósticos de gama interferón, midiendo sensibilidad, especificidad y otras características aunque no se estableció todavía la sensibilidad y la especificidad adecuadas para ser incorporada al Plan Nacional.

Se ha instrumentado también una segunda herramienta diagnóstica para estudios de vigilancia epidemiológica, como es la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de *M. Bovis* en leche de tanque, en el marco del Programa Regional de Tuberculosis de la Provincia de Santa Fe.

El uso de la detección de IFNγ tiene dos limitaciones fundamentales en nuestro país: la necesidad de importación del test comercial y el elevado costo que genera cada determinación, por lo que no es usado como prueba paralela a la PTub/IDR para el diagnóstico de la TBB.

La fabricación del test de IFNγ BOVIGAM™ ha sido exclusividad de la empresa Prionics por muchos años, pero en la actualidad el vencimiento de la patente ha permitido el surgimiento de otros test con similares características. Sin embargo, la mayoría de estos test no han sido diseñados para el diagnóstico de TBB, sino como sistemas de detección y cuantificación de IFNγ en general.

sns N.º 7, enero-marzo de 2015
ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar

Por lo anteriormente descripto, nos hemos propuesto desarrollar un test de producción nacional para medir la liberación de IFNγ que se produce luego de estimular *in vitro* las células mononucleares de la sangre de ganado infectado con antígenos específicos de un patógeno, en especial *M. bovis* y *M. avium subsp. paratuberculosis*. Se pretende lograr un producto con un formato que podrá ser empleado no solo para el diagnóstico de TBB y PTB, sino de numerosas enfermedades. Además, pretendemos anexar antígenos estudiados por nuestro grupo de investigación con una potencial aplicación para el diagnóstico de TBB y PTB en cabras, ya que se ha demostrado que el IFNγ es una citoquina con alto grado de conservación entre bovinos y caprinos (Wood y Jones, 2001).

Metodología

Como se mencionó, el test hace uso de la estimulación de los linfocitos T de memoria específicos con antígenos del patógeno y la medición del IFNγ secretado. Para contar con un sistema diagnóstico de estas características, los reactivos que se necesitan desarrollar son:

1. IFNγ producido en forma recombinante (rIFNγ) para ser empleado en los procesos de generación de anticuerpos monoclonales anti IFNγ bovino y como proteína estándar, que sirva para cuantificar la cantidad de IFNγ capturado y detectado por los anticuerpos monoclonales. Estas proteínas recombinantes se producirán en *Escherichia coli* en fusión a dos etiquetas diferentes que permitan su purificación y detección. Se emplearán protocolos estándares.

2. Anticuerpos monoclonales contra diversos epitopes del IFNγ bovino que se emplearán; por un lado, para capturar el IFNγ producido *in vitro* en la sangre estimulada específicamente para cada enfermedad; y, por otro, para detectar el IFNγ capturado. Para la producción de los anticuerpos monoclonales se inoculan ratones *knockout* para IFNγ murino con la proteína IFNγ bovina obtenida de manera recombinante en *E. coli*. Para la obtención de anticuerpos monoclonales se utilizan células de mieloma humano SP2/O defectivas de la enzima HGPRT y se fusionan con esplenocitos murinos. Los hibridomas, producto de la fusión, serán evaluados mediante la técnica de ELISA indirecto y se determinará cuáles son capaces de producir anticuerpos específicos contra IFNγ bovino (Wood, Rothel, McWaters y Jones, 1990). Se determinará el título y la afinidad de los anticuerpos obtenidos (Heinrich, Tissot, Hartmann y Cohen, 2010) y se compararán los resultados con los obtenidos con el test comercial.

Un anticuerpo monoclonal seleccionado para la detección de IFNγ se conjugará con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) para contar con un sistema colorimétrico de cuantificación. El protocolo para seguir es el descripto en Wisdom (1996).

Tras la obtención de los anticuerpos monoclonales anti-IFNγ bovino se proseguirá con el desarrollo de test de diagnóstico de industria nacional para el diagnóstico de TBB y PTB en ganado lechero. Se pondrá a punto el test a campo, mediante el empleo de muestras de animales IDR+ y controles no infectados. Se evaluarán diferentes variables que afectan la liberación de IFNγ (Schiller *et al.*, 2009), como calidad de la muestra, agentes de estimulación, condiciones y duración de cultivo, uso de anticoagulante para colección de sangre, temperatura y tiempo de almacenamiento. En esta etapa, el antígeno que emplearemos para inducir la respuesta inmune específica será la PPDb (similar a la que se usa en la IDR) y la PPD aviar (PPDa) se utilizará como control de reacción cruzada a micobacterias ambientales y a paratuberculosis. Posteriormente, para mejorar la sensibilidad del kit se incluirán cócteles de nuevos antígenos obtenidos de forma recombinante en *E. coli* y en larvas de insecto (Molinari *et al.*, 2008).

Resultados preliminares

Se cuenta con un set de 30 hibridomas capaces de secretar anticuerpos monoclonales anti IFNγ bovino. En la Figura 1 se muestra la reactividad de siete de estos hibridomas frente a IFNγ bovino recombinante.

Figura 1

Anticuerpos anti IFNγ bovino: Se clonó el gen que codifica para IFNγ bovino en dos vectores de expresión. Las proteínas recombinantes IFNγ-His o IFNγ-GST bovinas purificadas (30 µgr) se inocularon cuatro veces a ratones BALBc *knockout* para IFNγ murino. Cuando el título de anticuerpos generado fue mayor a 1.10^4 se produjeron los hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti IFNγ bovino (A1-C2) se emplearon como anticuerpos primarios en el ensayo de western blot que se muestra. El suero de ratones BALBc *knockout* (suero policlonal, C+) se empleó como control positivo. Como anticuerpo secundario se utilizó Anti-IgG mouse conjugado a fosfatasa alcalina y se reveló con el sustrato NBT/BCIP.

sns N.º 7, enero-marzo de 2015
ISSN 2314-2901 / revistasns@senasa.gov.ar

Discusión

En nuestro país, la TBB es una enfermedad endémica y su control es una tarea urgente, permanente y ardua que llevan cabo diversos organismos. El plan nacional de erradicación de la tuberculosis bovina planteada por Senasa tiene como objetivo lograr el mayor número posible de rodeos libres de TBB, mediante un saneamiento exhaustivo de nuestros campos y aspira a un nivel de excelencia internacional en lo que a enfermedades infecciosas respecta. El diagnóstico de animales infectados se realiza mediante la prueba de la tuberculina o intradermorreacción; sin embargo, es relevante contar con técnicas complementarias a fin de lograr la erradicación de ambas enfermedades para disminuir las pérdidas económicas ocasionadas y, sobre todo, mejorar la salud animal y pública del país. En este sentido, se plantea observar el accionar de los países de la Unión Europea, el Reino Unido, los EE. UU. y Oceanía que aplican técnicas diagnósticas alternativas para detectar aquellos animales que se escapan al diagnóstico solo por la IDR.

La técnica diagnóstica que es considerada es la detección de IFNγ bovino liberado de sangre periférica tras estimulación con antígenos específicos. En estudios realizados por investigadores del Reino Unido en los que se aplicaron la prueba cutánea y la prueba de IFNγ en paralelo, se detectaron entre 12 a 38 % de animales enfermos que se habían escapado al diagnóstico solo por el test intradérmico. En estos estudios, se detectó de un 65 a un 80 % de los animales infectados; mientras que cuando se aplicaron las dos pruebas en paralelo, el nivel de detección fue de un 88 a un 95 % (Vordermeier *et al.*, 2006). Generalmente, se reconoce que la prueba de IFNγ presenta mayor sensibilidad y menor especificidad que la IDR. Por eso, en los últimos años, se ha intentado mejorarla utilizando los antígenos específicos del complejo *M. tuberculosis,* ESAT6 y CFP10, separadamente o en conjunto para la estimulación de linfocitos Th1, en lugar de los clásicos antígenos PPDb y PPDa (Buddle, Livingstone y de Lisle, 2009). El empleo de estos antígenos específicos permite diferenciar TBB de PTB y su aplicación permitiría aplicar vacunas contra ambas enfermedades, ya que constituirían un diagnóstico DIVA (diferencial de infectados y vacunados).

El uso de esta prueba posee un costo elevado, y por ello nos aventuramos al desarrollo de un producto nacional para mejorar el diagnóstico mediante un sistema basado en la prueba de IFNγ que complemente a la IDR. Se espera que en el corto plazo este método pueda ser incorporado como prueba paralela en el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina en la República Argentina, y nuestro objetivo es ofrecer a ese nuevo mercado un test superior a los comerciales importados, en términos de calidad (especificidad/sensibilidad) y precio. Si bien este proyecto requiere la importación de insumos, una vez desarrollado este requerimiento será prácticamente nulo y todos los reactivos utilizados para el kit serán del país.

Además, podrá emplearse en cabras y otros pequeños rumiantes ya que existen epitopes compartidos en el IFNγ de estos animales. Esta posible aplicación contribuirá al desarrollo de economías regionales en el país, a través del mejoramiento del estatus sanitario en majadas de pequeños productores o productores familiares.

Nuestro grupo tiene una vasta experiencia en el estudio de TBB y PTB, así como en la producción y purificación de proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos tras años de investigación nos han dado ¿herramientas? alas para plantear este proyecto de producción nacional, de bajo costo, innovador y accesible, con la convicción de que están sentadas las bases científicas para su realización con éxito.

Notas

(1) Véase: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion_tuberculosis_bovina_junio_2011.pdf>.

(2) Véase: <http://www.argentina.ar/_es/pais/C11574-nuevo-plan-para-erradicar-la-tuberculosis-bovina.php>.

(3) "Scientific opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis", *ESFA Journal*, 2012. Véase: <http://www.efsa.europa.eu/de/search/doc/2975.pdf>.

Bibliografía

Buddle, B. M.; Livingstone, P. G. y G. W.de Lisle (2009), "Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle", *New Zealand Veterinary Journal 57*, pp. 173-180.

Coad, M., Downs, S., Durr, P., Clifton-Hadley, RS Hewinson, R., HM, V. y A. Whelan (2008), "Blood-based assays to detect Mycobacterium bovis-infected cattle missed by tuberculin skin testing", *Veterinary Records* 162 (12), pp. 382-384.

Heinrich, L.; Tissot, N.; Hartmann, D. J. y R. Cohen (2010), "Comparison of the results obtained by ELISA and surface plasmon resonance for the determination of antibody affinity", *Journal of Immunological Methods* 352, pp. 13-22.

Hermon-Taylor, J. y T. Bull (2002), "Crohn's Disease caused by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: a Public Health tragedy whose resolution is long overdue", *Journal of Medical Microbiology* 51.

Lo Bue, P. A.; Enarson, D. A. y C. O. Thoen (2010), "Tuberculosis in humans and animals: an overview", *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease : The Official Journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 14*, pp. 1075-1078.

Meikle, V.; Bianco, M. V.; Blanco, F. C.; Gioffré, A.; Garbaccio, S.; Vagnoni, L.; Di Rienzo, J.; Canal, A.; Bigi, F. y A. Cataldi (2011), "Evaluation of pathogenesis caused in cattle and guinea pig by a Mycobacterium bovis strain isolated from wild boar", *BMC Veterinary Research 7*, .

Molinari, P.; Peralta, A. y O. Taboga (2008), "Production of rotavirus-like particles in Spodoptera frugiperda larvae", *Journal of Virological Methods* 147, pp. 364-367.

Schiller, I.; Waters, W. R.; Vordermeier, H. M.; Nonnecke, B.; Welsh, M.; Keck, N. y B. Oesch (2009), "Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of Mycobacterium bovis-infected cattle", *Clinical and Vaccine Immunology* CVI (16), pp. 1196-1202.

Vordermeier, M.; Whelan, A. O. y G. R. Hewinson (2006), "The scientific case for the gamma interferon BOVIGAM", *Government Veterinary Journal* 16 (1), pp. 38-43.

Wisdom, G. B. (1996), "Horseradish Peroxidase Labeling of Antibody Using Periodate Oxidation", *The Protein Protocols Handbook* Vol. 4, pp. 273-274 [en línea]. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/x43h2124vk5450p1.pdf>.

Wood, P. R. y S. L. Jones (2001), "BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis", *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, pp. 147-155.

Wood, P. R.; Rothel, J. S.; McWaters, P. G. y S. L. Jones (1990), "Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon", *Veterinary Immunology and Immunopathology 25*, pp. 37-46.