



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA SANGUÍNEA DIVA CON ANTÍGENOS ESAT-6, CFP-10 Y Rv3615c PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN CHILE

MARTÍN NICOLÁS VÁSQUEZ ILLANES

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Santiago-Chile

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA SANGUÍNEA DIVA CON ANTÍGENOS ESAT-6, CFP-10 Y Rv3615c PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA EN CHILE

MARTÍN NICOLÁS VÁSQUEZ ILLANES

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

DIRECTOR DE TESIS: Dr. PATRICIO RETAMAL MERINO

Santiago-Chile

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POSGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR EL CANDIDATO

MARTÍN NICOLÁS VÁSQUE ILLANES

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS EN EXÁMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 19 DE DICIEMBRE DE 2018

DIRECTOR DE TESIS

DR. PATRICIO RETAMAL MERINO

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DR. ALEJANDRO ESCOBAR A.

DR. PEDRO ÁBALOS P.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y contó con financiamiento

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG)

BIOGRAFÍA

Martín Nicolás Vásquez Illanes, nace el 15 de Julio de 1980 en Santiago de Chile, tempranamente en su niñez su familia se establece en la ciudad de Talca, en la séptima región del Maule, donde inicia y termina sus estudios de enseñanza básica y media.

Ingresa a estudiar la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad del Mar en su sede de Talca, obteniendo el título de Médico Veterinario el año 2012, graduándose dicho año con distinción y primero en su promoción. Motivado por aumentar sus capacidades profesionales, ingresa y aprueba el curso de inspección médico veterinaria de reses, aves de corral y sus carnes, dictado por FAVET, posteriormente ingresa y aprueba el Diplomado en Patología médico veterinaria, dictado por FAVET. Inmediatamente después ingresa al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de FAVET, finalizando y aprobando el programa en el mes de diciembre del año 2018.

Paralelamente al que hacer académico, Martín Vásquez Illanes, se ha desempeñado laboralmente en la práctica de la medicina y clínica de pequeños animales, en el marco de instituciones públicas y privadas.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

Mi madre Mariela Illanes Leal, por apoyar este posgrado.

Dr. Patricio Retamal Merino, por guiar el desarrollo de ésta tesis.

Dra. Paulina Zurita Urrea, por capacitarme en los métodos de laboratorio utilizados en éste estudio.

Profesores evaluadores Dr. Patricio Ábalos y Dr. Alejandro Escobar, por sus observaciones y correcciones realizadas, que permitieron perfeccionar este trabajo.

Miembros del Proyecto DIVA-BCG, Karina Saadi y María Belén Benavides por su colaboración y apoyo en el transcurso y desarrollo de este trabajo.

Gabriel Montenegro y Nicsia Meneses por su apoyo durante el proceso de muestreo y prueba DIVA.

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) por financiar y apoyar el desarrollo de este estudio.

Escuela de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile, por su calidad y apoyo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	12
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Género <i>Mycobacterium</i>	16
2.2. <i>Mycobacterium bovis</i>	17
2.3. Infección por <i>M. bovis</i> y TBB	18
2.4. Métodos de evaluación diagnóstica de tuberculosis bovina	18
2.4.1. Métodos de detección directos	19
2.4.1.1. Métodos de cultivo	19
2.4.1.2. Medios de cultivo	20
2.4.1.3. Método PCR	21
2.4.2. Métodos de detección indirectos.....	21
2.4.2.1. Prueba de Tuberculina.....	22
2.4.2.2. Prueba de Interferon Gamma	22
2.5. Control y erradicación de TBB	23
2.5.1. Programas de control y erradicación	23
2.5.2. Vacunación contra TBB	23
2.5.2.1 Vacuna BCG	24
2.5.2.2. Prueba DIVA.....	24
2.6. Plan Nacional de Control y Erradicación de TBB.....	25
3. HIPOTESIS	27

4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1. Muestras	29
5.2. Método.....	30
5.2.1. Muestras sanguíneas.....	30
5.2.1.1. Pruebas Bovigam 2G y DIVA con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c	30
5.2.1.1.1. Etapa 1	30
5.2.1.1.2. Etapa 2	31
5.2.1.1.3. Interpretación de las pruebas Bovigam 2G® y DIVA con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c.....	31
5.2.2. Muestras de tejidos.....	31
5.2.2.1. Aislamiento bacteriológico	32
5.2.2.2. Procedimiento de q-PCR Boviman	33
5.3. Análisis estadístico de resultados	34
6. RESULTADOS	37
6.1. Eficiencia diagnóstica de un ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) para el diagnóstico de la infección con <i>M. bovis</i> en Chile	37
6.2. Comparación del desempeño de la prueba DIVA con las técnicas de ELISA-IFN- γ Bovigam®, cultivo en medio Stonebrink, sistema BACTEC MGIT 960 y q-PCR-Boviman.....	41
7. DISCUSIÓN	49
8. CONCLUSIÓN	55
9. BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación del Área bajo la Curva ROC.....	35
Tabla 2. Interpretación de Índice de Kappa	35
Tabla 3. Criterio y establecimiento de grupos de referencia positivo (grupo positivo) y grupo de referencia negativo (grupo negativo)	37
Tabla 4. Análisis estadístico, rendimiento y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y la condición de infección según el criterio mencionado en la Tabla 1	41
Tabla 5. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de antígenos DIVA: PC-EC (ESAT-6 y CFP-10) y Rv3615c	43
Tabla 6. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del antígeno DIVA Rv3615 y la condición de infección mediante pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman desde lesiones granulomatosas y/o tejido linfoide.....	43
Tabla 7. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del antígeno DIVA PC-EC y la condición de infección mediante pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman desde lesiones granulomatosas y/o tejido linfoide.....	44
Tabla 8. Tabla 8: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y Bovigam 2G	44
Tabla 9. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de prueba DIVA y qPCR Boviman 2G	45
Tabla 10. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y Stonebrink	45
Tabla 11. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de prueba DIVA y Bactec MGIT-960	46

Tabla 12. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y el método de cultivo combinado de Stonebrink y sistema Bactec MGIT-960	46
Tabla 13. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de los métodos de cultivo Bactec MGIT-960 y Stonebrink	47
Tabla 14. Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del método de cultivo combinado Stonebrink y sistema Bactec MGIT-960 con qPCR Boviman	47
Tabla 15. Análisis de eficiencia de pruebas de diagnóstico tradicionales de TBB con la prueba DIVA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del análisis ROC de las OD de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba ELISA-C con antígenos PC-EC.....	38
Figura 2. Representación de la curva del análisis de Se y Es de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba de ELISA-C con antígenos PC-EC	39
Figura 3. Representación del análisis ROC de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba ELISA-C con antígeno Rv3615c.....	40
Figura 4. Representación de la curva del análisis de (Se) y (Es) de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba de ELISA-C con antígeno Rv3615c	40

RESUMEN

La tuberculosis bovina, causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, es una de las enfermedades más importantes del ganado bovino en Chile y otros países, afectando la productividad y salud de estos animales. La vacuna contra la tuberculosis humana (BCG *M. bovis*) tiene ventajas para su uso en el ganado, para lo cual se debe evaluar su eficacia mediante una prueba diagnóstica capaz de discriminar animales infectados de aquellos que han sido vacunados (DIVA). En función de lo anterior, el Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura de Chile solicitó un estudio de evaluación de la aplicación de la vacuna BCG y el test DIVA para la prevención y diagnóstico de la infección por *M. bovis* en planteles bovinos de la zona central de Chile, del cual este estudio es parte.

El propósito de este trabajo fue implementar y caracterizar un ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en Chile.

Se determinó que los puntos de corte que permiten la mejor combinación de valores de especificidad (Es) y sensibilidad (Se), priorizando la Es, es de 0,06 DO para el *pool* de antígenos PC-EC (ESAT-6 y CFP-10) y, 0,02 DO en Rv3615c; obteniendo un rendimiento diagnóstico de 61% y 45% de Se y, 82% y 90% de Es, respectivamente. Mientras el rendimiento global de la prueba DIVA en este estudio fue de 68% de Se y un 79% de Es. Adicionalmente, el área bajo la curva ROC de los antígenos fue de $0,735 \pm 0,054$ en PC-EC y un $0,731 \pm 0,054$ en Rv3615c.

Al comparar la prueba DIVA con los ensayos Bovigam 2G, qPCR-Boviman, Stonebrink y Bactec MGIT 960, se evidenciaron diferencias significativas en todas las comparaciones, una concordancia baja en relación con Bovigam 2G e, insignificante con todas las demás pruebas. Sugiriendo que las pruebas comparadas se enfocan a distintos blancos de detección que predominan en distintas fases de la infección.

Estos resultados muestran que la prueba DIVA desarrollada es eficaz pero no eficiente en el diagnóstico de la infección por *M. bovis*.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, BCG *M. bovis*, PC-EC (ESAT-6 y CFP-10), Rv3615c DIVA.

SUMMARY

Bovine tuberculosis, caused by the bacterium *Mycobacterium bovis*, is one of the most important diseases of cattle in Chile and other countries, affecting the productivity and health of these animals. The vaccine against human tuberculosis (BCG *M. bovis*) has advantages for use in livestock, for which its effectiveness must be evaluated by means of a diagnostic test able to discriminate infected animals from those that have been vaccinated (DIVA). Based on the above, the Agricultural and Livestock Service of the Ministry of Agriculture of Chile requested a study evaluating the application of the BCG vaccine and the DIVA test for the prevention and diagnosis of *M. bovis* infection in bovine farms in the central zone of Chile, of which this study is part.

The purpose of this work was to implement and characterize an-ELISA-IFN- γ assay with antigens ESAT-6, CFP-10 and Rv3615c (DIVA) for the diagnosis of *M. bovis* infection in Chile.

It was determined that the cut off that allow the best combination of specificity (Sp) and sensitivity (Se) values, prioritizing the Sp, is 0.06 OD for the PC-EC antigen pool and, 0.02 OD in Rv3615c; obtaining a diagnostic yield of 61% and 45% of Se and 82% and 90% of Sp, respectively. While the overall performance of the DIVA test in this study was 68% Se and 79% Sp. Additionally, the area under the ROC curve of the antigens was 0.735 ± 0.054 in PC-EC and 0.731 ± 0.054 in Rv3615c

When comparing the DIVA test with the Bovigam 2G, qPCR-Boviman, Stonebrink and Bactec MGIT 960 assays, showed significant differences in all comparisons, a low agreement in relation to Bovigam 2G and, insignificant among all the others. Suggesting that the comparative tests focus on different detection targets that predominate in different phases of the infection

These results show that the DIVA test developed is effective but not efficient in the diagnosis of *M. bovis* infection.

Key words: *Mycobacterium bovis*, BCG *M. bovis*, PC-EC (ESAT-6 and CFP-10), Rv3615c DIVA.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad bacteriana infectocontagiosa de carácter zoonótico, cuyo agente etiológico es *M. bovis*, el cual además tiene la capacidad de infectar otros animales domésticos y salvajes, pudiendo éstos establecer reservorios de la infección (Reyes, 2014).

En el bovino, el principal mecanismo de transmisión es a través de la excreción e inhalación del agente, por medio de las vías respiratoria. La diseminación de la bacteria al resto del organismo puede establecer diversos cuadros patológicos como tuberculosis cavitaria, miliar y perlada (Abalos y Retamal, 2004).

La importancia de TBB es resultado del daño generado en la salud pública y del alto impacto económico en el sector pecuario, en diversas regiones del mundo. La prevalencia mundial estimada de TBB es de un 9%, generando costos ascendentes a 3 billones anuales de dólares, referidos a una reducción severa de la productividad en los animales infectados, controles de movimiento, pruebas diagnósticas, sacrificio de los animales infectados y restricciones comerciales (Vordermeier *et al.*, 2016a; Machugh *et al.*, 2009).

El riesgo de infección a la población humana, la pérdida de la productividad en los animales infectados y las restricciones en el comercio internacional han gatillado la ejecución de programas de control y erradicación de TBB en el mundo; los cuales se basan en un diagnóstico oportuno y la eliminación de aquellos animales infectados, principalmente. Sin embargo, el alto costo y cuestionable eficacia de dichas medidas, requiere complementar dichos programas con nuevas estrategias de control, siendo fundamental, incluir la vacunación del ganado contra TBB. Aunque la vacuna producida a partir de la cepa *M. bovis* BCG ha mostrado en principio una eficacia cuestionable en el ganado, en las últimas décadas diversos estudios han demostrado significativos incrementos en los niveles protectivos de la vacuna BCG en el ganado, describiendo a su vez, diversos factores vinculados al incremento de su eficacia. Sin embargo, el uso de la vacuna interfiere y limita las pruebas cutáneas de tuberculina y otras pruebas inmunológicas, utilizadas para determinar si los animales, y sus planteles, están oficialmente libres de TBB. Por este motivo, tanto el potencial uso, como la evaluación de la eficacia de la vacuna

BCG en el ganado, requiere del uso de una prueba diagnóstica, capaz de diferenciar animales infectados entre los vacunados (DIVA, del inglés “*differentiating infected from vaccinated animals*”). La prueba DIVA TBB utiliza los antígenos que se expresan y/o secretan por las cepas de campo *M. bovis*, pero no por la cepa de la vacuna atenuada BCG. Entre estos se destacan las proteínas micobacterianas ESAT-6 y CFP-10, codificadas por los genes ausentes en la cepa de la vacuna BCG y; la proteína Rv3615c presente en la cepa BCG, aunque no es secretada, debido a una mutación en el sistema de secreción *esx-1* (EFSA, 2013).

En Chile, el año 2011 se inició el Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina, que pretende lograr la erradicación y control de la enfermedad, en áreas epidemiológicas de baja y alta prevalencia, respectivamente. Dicho plan, se basa en el diagnóstico de los animales infectados, saneamiento predial (eliminación de infectados para beneficio en plantas faenadoras), compartimentación o biocontención y restricciones al movimiento del ganado, tanto dentro como entre los predios. Sin embargo, la vacunación del ganado con la cepa BCG de *M. bovis* podría representar una estrategia complementaria para el avance del programa, especialmente en la zona de mayor prevalencia, que debe ser evaluada junto a una prueba diagnóstica DIVA capaz de discriminar la condición de infección con una cepa de campo o con la cepa de la vacuna.

Por lo tanto, con el fin de evaluar la eficacia de la vacuna BCG en zonas de alta prevalencia de Chile, como una potencial estrategia complementaria para el avance del Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia y eficiencia diagnóstica de una prueba DIVA, con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* entre animales vacunados con la cepa BCG en la Región Metropolitana.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium*, perteneciente al Orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*, está constituido por organismos procarióticos, entre los cuales se describen especies patógenas como aquellas agrupadas en el complejo *M. tuberculosis* (CMT) y en el complejo *M. avium* (CMA). Además, se describen numerosas especies de microorganismos micobacterianos saprófitos presentes en el suelo y el agua. Las micobacterias se caracterizan por ser bacilos delgados, aerobios obligados, inmóviles, no esporulados, con un tamaño de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 µm que se tiñen con dificultad y demuestran la propiedad de ácido resistencia, derivada de la presencia de una gruesa pared celular con un alto contenido de lípidos, los cuales son capaces de retener determinadas tinciones, después del tratamiento con ácidos y alcohol (Olsen *et al.*, 2010). Entre los aspectos fenotípicos, utilizados tradicionalmente para la clasificación de este género, se describe la temperatura y tasas de crecimiento, pigmentación de colonias cultivadas en luz u oscuridad, requisitos nutricionales, características bioquímicas, rango de patogenicidad en animales experimentales y fundamentalmente, la estructura de la pared celular. Sin embargo, dicho sistema tradicional de clasificación ha derivado en el uso cada vez mayor de técnicas moleculares de identificación de secuencias específicas de ARNr y ADN, mediante un conjunto cada vez más amplio de sondas particulares de cada especie, que permiten discriminarlas (Markey *et al.*, 2013; Ryan y Drew, 2011).

Dentro del género *Mycobacterium*, tres especies tienen fundamental importancia en salud animal: *M. avium* (*M. avium subsp. avium*), causante de tuberculosis en aves y patógena para ciertos mamíferos; *M. avium subsp. paratuberculosis*, agente etiológico de la paratuberculosis bovina y *M. bovis*, cuyo hospedador primario es el ganado bovino (de Kantor, 2007).

2.2. *Mycobacterium bovis*

M. bovis está incluido dentro del CMT, junto a *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y *M. microti* (Olsen *et al.*, 2010); constituyendo estos, un grupo cercano de agentes etiológicos causantes de tuberculosis humana y animal (Reyes, 2014). La enfermedad está caracterizada por inflamación granulomatosa (tubérculos) en la puerta de entrada y el linfonodo regional, así como el desarrollo por fases de la infección (Trautwein, 2005). Dichas especies del CMT, comparten secuencias genéticamente idénticas en el ARNr 16S, junto con poseer sobre un 99,9% de identidad en sus nucleótidos; pero, al mismo tiempo, presentan diferencias fenotípicas entre las subespecies, rango de hospederos y patogenicidad (Reyes, 2014). Sin embargo, aunque otras micobacterias como *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. aquae*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y aquellas pertenecientes al CMA, son patógenas o apatógenas para el bovino, si tienen un importante rol como causantes de reacciones inmunológicas inespecíficas a ciertas pruebas diagnósticas indirectas (Trautwein, 2005).

Además de ser el agente etiológico causal predominante de tuberculosis del ganado vacuno en el mundo, *M. bovis* tiene la gama de hospederos más amplia entre las especies incluidas en el CMT (Abalos y Retamal, 2004); todas las especies de mamíferos, entre ellas la especie humana, son susceptibles a la infección, aunque la susceptibilidad de las diferentes especies es variable (Vanderklock, 2010). Dicha capacidad de infectar a un mayor rango de hospederos y, por ende, el potencial de transmitirse entre ellos se refleja en las dificultades en algunos países para con el control de la enfermedad en el ganado (Vordermeir *et al.*, 2016a; Vanderklock, 2010; Abalos y Retamal, 2014). A lo anterior se suma, un elevado umbral de resistencia frente a influencias externas, como desinfectantes, ácidos y álcalis, en comparación al resto de las bacterias no formadoras de esporas (Dorransoro y Torroba, 2007); resistencia a la desecación, congelación, concentraciones bajas de oxígeno, lento crecimiento y alto contenido lipídico de su pared celular, le otorgan un alto potencial como reservorio ambiental de la infección (Reyes, 2014). Sin embargo, la luz

ultravioleta y el calor (>65° C durante 30 minutos) las inactivan (Dorransoro y Torroba, 2007).

2.3. Infección por *M. bovis* y TBB

Según Pollock y Neill, (2002) *M. bovis* es un patógeno que interacciona con la respuesta inmune del hospedero, describiendo que una vez ocurrido el contacto de la bacteria con el animal y, producida una infección efectiva, esta expresa mecanismos de virulencia que le permiten sobrevivir en el ambiente intracelular de macrófagos, siendo éstas las células blanco de la infección y responsables de la persistencia bacteriana, induciendo la formación de un mecanismo de contención que se conoce como “Complejo Primario”, el cual es una lesión granulomatosa avascular que incluye tanto el pulmón, que es el lugar donde predominantemente coloniza primero la bacteria y, el linfonodo regional. Esta etapa de la infección se caracteriza por una elevada respuesta celular y liberación de IFN- γ principalmente, que en un individuo sano genera protección contra la infección en curso y contra futuras exposiciones al mismo agente, sin causar lesiones adicionales y, por tanto, en una condición de infección asintomática. Sin embargo, condiciones de inmunodepresión pueden inhibir al sistema inmune, generando que este se haga incapaz de contener al patógeno, multiplicándose y, diseminándose al resto del organismo, generando la enfermedad sintomática en el animal. Adicionalmente, mecanismos de virulencia bacterianos, que promueven la estimulación de respuesta inmune humoral (no protectora), en las fases avanzadas de la enfermedad generan el decaimiento de la respuesta inmune celular, la cual puede hacerse indetectable, situación que se conoce como anergia (Pollock *et al.*, 2001).

2.4. Métodos de evaluación diagnóstica de TBB

Los métodos para el diagnóstico de TBB se agrupan en dos categorías de pruebas: directas e indirectas. Las pruebas directas, son aquellas que detectan la presencia del agente etiológico en el animal hospedero. Se desarrollan a partir de muestras obtenidas durante la etapa *post mortem*, destacando el cultivo micobacteriano y PCR, usadas para confirmar la infección. Pruebas indirectas son aquellas que

identifican la infección en el animal vivo, usando indicadores de infección o marcadores inmunológicos en el hospedero, producto de una estimulación con diversos antígenos propios de *M. bovis* (Strain *et al.*, 2011).

En las pruebas diagnósticas, la sensibilidad (Se) o probabilidad de que un animal infectado realmente tendrá un resultado positivo; como la especificidad (Es) o probabilidad de que un animal no infectado tendrá un resultado negativo, pueden ser medidas contra una prueba estándar de referencia (prueba de oro), caracterizada por un alto nivel en dichas variables. En tuberculosis bovina, el estándar de la prueba de referencia (cultivo en medio Stonebrink), en cuanto a dichas variables, es muy alta en Es (>99%), pero relativamente pobre en Se, determinando un estándar imperfecto de comparación o análisis de dichas variables, con otras pruebas potenciales (Strain *et al.*, 2011). Algunos de los métodos de evaluación diagnóstica de TBB conocidos, se mencionan a continuación:

2.4.1. Métodos de detección directos

2.4.1.1. Métodos de cultivo

El aislamiento de micobacterias, a partir de métodos de cultivo, permite un diagnóstico específico de la infección, identificación de especie y eventuales estudios de sensibilidad frente a antimicrobianos (Alcaide *et al.*, 2005). Aunque, una lenta tasa de crecimiento, baja cantidad del agente en las muestras, junto a la presencia de diversos microorganismos bacterianos y/o micóticos, dan como resultado un elevado potencial de contaminación en los distintos métodos de cultivo existentes, limitando su sensibilidad.

Como las características lipídicas de la pared celular brindan a las micobacterias de una mayor resistencia a la inactivación por medio de soluciones ácidas o alcalinas fuertes. Dicha propiedad, permite reducir considerablemente el sobrecrecimiento bacteriano indeseable por medio del contacto de la muestra con distintos agentes descontaminantes, durante un periodo controlado de tiempo, después del cual, el ácido o el álcali utilizado, es neutralizado, y la mezcla concentrada por

centrifugación a alta velocidad. Entre dichos agentes descontaminantes destacan, NaOH 4%, N-acetil-L-cisteína más NaOH al 2%, cloruro de cetilpiridio 1% más NaCl al 2%, ácido oxálico 5%, ditioneitol más NaOH al 2%, fosfato trisódico 13% más cloruro de benzalconio (Zephiran®) y fosfato trisódico 13% (Koneman *et al.*, 2006; Alcaide *et al.*, 2005).

2.4.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de micobacterias son de tres tipos distintos: los medios de huevo espesado y medios de agar semisintético son de carácter sólido; y un tercer tipo, de medios líquidos (Brooks y Carrol, 2011). Se considera como prueba de referencia para el cultivo de micobacterias, una combinación de medios de cultivo líquido y sólido (Hines *et al.*, 2006).

Los medios de huevo espesado comprenden, Lowenstein Jensen (LJ), Stonebrink (ST) y Ogawa (de Kantor, 2007; Middlebrook y Cohn, 1958). El medio más favorable para el crecimiento de *M. bovis* contiene piruvato 0,4% en ausencia de glicerol (ST), ya que éste último componente inhibe su desarrollo (Alcaide *et al.*, 2005; de Kantor, 2007). Se incluye al medio el verde de malaquita, con el objeto de inhibir la proliferación de otros microorganismos contaminantes. Dicho medio requiere, usualmente, 6 a 8 semanas para un crecimiento visible de colonias micobacterianas (Alcaide *et al.*, 2005).

Medios de agar semisintético, como Middlebrook 7H10 y 7H11, contienen albumina entre otros componentes, que neutraliza los efectos tóxicos e inhibidores de ácidos grasos presentes en la muestra o el medio de cultivo. Poseen menor Se, variable crítica para el aislamiento primario de micobacterias. Son utilizados, básicamente, para observar la morfología de colonias y su susceptibilidad (Brooks y Carrol, 2011; Koneman *et al.*, 2006).

Los medios líquidos, Middlebrook 7H9 y 7H12, poseen mayor Se y otorgan un rápido desarrollo micobacteriano (Brooks y Carrol, 2011). Sin embargo, requieren de sistemas manuales, semiautomatizados o automatizados, de mayor costo; entre ellos están MGIT (BD Diagnostic), BACTEC 460 (BD Diagnostic Systems, Sparks,

MD) y MGIT 960 (BD Diagnostic Systems), respectivamente. Usualmente, los cultivos sospechosos positivos son transferidos al medio de ST cuando son necesarias pruebas bioquímicas (Han, 2016; Koneman *et al.*, 2006). La incubación de *M. bovis* en dichos medios de cultivo, requiere temperaturas de 37° C +/- 1°C (Markey *et al.*, 2013).

2.4.1.3. Método PCR

La técnica molecular de PCR es capaz de detectar la presencia de micobacterias del CMT (OIE, 2009). La detección se lleva a cabo por medio de la replicación *in vitro* de una secuencia del ADN, limitada por un par de oligonucleótidos específicos, mediante el uso de un enzima termoestable (Taq polimerasa), entre otros reactivos. Como resultado de determinados ciclos de amplificación, se obtiene un aumento exponencial del número de copias del fragmento buscado, en este caso una secuencia del genoma, conservada o propia del CMT; para ello se han utilizado con éxito, las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*, como blanco genético. Sin embargo, su presencia y número de copias varía entre los miembros de dicho complejo y sus cepas (Quezada, 2011). Otros oligonucleotidos utilizados descritos, son aquellos que amplifican secuencias del ARNr 16S-23S y de los genes que codifican las proteínas MPB70 y el antígeno b de 38 kDa (OIE, 2009).

2.4.2. Métodos de detección indirectos

Se pueden diferenciar 2 categorías: aquellas que se basan en la detección de la respuesta inmune celular, relacionada a hospederos inmunocompetentes, comprenden la prueba cutánea intradérmica de tuberculina y la prueba de liberación de interferón-gamma. Por otra parte, están aquellas pruebas cuyo blanco es la respuesta humoral, referida a aquellos animales con alto compromiso patológico sistémico o en fase anérgica de la enfermedad, mediante pruebas de detección de anticuerpos (Strain *et al.*, 2011).

2.4.2.1. Prueba de Tuberculina (PPD)

Es la prueba de detección primaria para el diagnóstico de tuberculosis bovina (Vordermeier *et al.*, 2016a), siendo prescrita para el comercio internacional de ganado. Consiste en una prueba de campo que implica la inyección intradérmica de un derivado proteico de *M. bovis* (PPDb) y posterior detección de inflamación, en un plazo de 72 horas. Dentro de sus variantes más usadas están la prueba del pliegue ano-caudal (PAC) y la prueba cervical comparada (PCC). Esta última es utilizada para diferenciar entre animales infectados con *M. bovis*, de aquellos reactivos a PPDb debido a una sensibilización por *M. avium* (OIE, 2009); mostrando una Es de 88,8-100% y Se de 55,1-93,5%, en comparación con PAC, con 96-98.8% y 68-96,8% de Es y Se, respectivamente (Reyes, 2014).

La elección de cuál de las dos pruebas debe utilizarse en un rebaño determinado, dependerá de la prevalencia de infección por TBB. A mayor prevalencia, mayor Es de la prueba será necesaria; mientras que la existencia de exposición ambiental a otras micobacterias sensibilizadoras y/o una baja prevalencia, requerirá mayor Se del ensayo (OIE, 2009).

2.4.2.2. Prueba de Interferón Gamma

Es una prueba sanguínea, *in vitro*, que mide la liberación de la citoquina interferón-gamma (IFN- γ), por linfocitos sensibilizados, producto de un período de incubación con antígeno PPDb; comparando la producción de IFN- γ tras la estimulación con PPDb y PPDa. La cuantificación de IFN- γ producido se realiza por medio de un ensayo inmunodiagnóstico, ELISA de captura (OIE, 2009).

El uso de la prueba de IFN- γ se indica para aumentar la Es en relación con la prueba PPD, o bien para incrementar la Se de detección. El punto de corte puede adaptarse según la situación epidemiológica de donde se requiera utilizar dicho ensayo. Sin embargo, aunque un bajo punto de corte podría aumentar la Se, simultáneamente podría afectar negativamente la Es del ensayo. Una mejora más significativa en la Es de la prueba sería mediante la utilización de antígenos más

definidos (ESAT-6 y CFP-10). En la actualidad, la prueba descrita se comercializa como Bovigam® (Prionics, Suiza) (Strain *et al.*, 2011).

2.5. Control y erradicación de TBB

2.5.1. Programas de control y erradicación

La implementación de programas de control y erradicación de TBB en el mundo se debe fundamentalmente al riesgo de infección a la población humana, la pérdida de la productividad en los animales infectados y las restricciones en el comercio internacional (Machugh *et al.*, 2009); estos programas se basan en un diagnóstico oportuno y la eliminación de animales infectados, vigilancia activa, restricción del movimiento y vigilancia en plantas faenadoras (vigilancia pasiva), junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los rebaños, mediante distintas y variadas normas de bioseguridad (Reyes, 2014). Sin embargo, el amplio espectro de potenciales hospederos de la infección ha repercutido desfavorablemente en el éxito de estas medidas, permitiendo su mantención en especies animales domésticas y/o silvestres, como reservorios en distintas zonas geográficas del mundo. Éste último tipo de especies, protegidas o no según la legislación vigente de cada país, ha generado la necesidad de ampliar dichos programas, en términos epidemiológicos y legales, considerando además factores de biodiversidad (Chamber, 2009; Abalos y Retamal, 2004).

2.5.2. Vacunación contra TBB

Las vacunas disponibles para el control de TBB son aquellas desarrolladas a partir del bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Sin embargo, la vacunación con BCG no se utiliza actualmente en los programas de control y erradicación existentes a nivel internacional y, es ilegal en la Unión Europea (UE). La razón se justifica por diversos estudios que indican una eficacia variable en el ganado, además de interferir con la acción de la prueba PPD, utilizada para determinar si animales y los países están oficialmente libres de TBB (EFSA, 2013).

2.5.2.1. Vacuna BCG

Es la vacuna utilizada para la prevención de tuberculosis humana; de tipo viva atenuada, derivada de una mutación de *M. bovis*. Fue desarrollada en la primera mitad del siglo XIX, en el laboratorio Pasteur, Francia, por Calmette y Guerin. Distintas cepas de esta vacuna son utilizadas masivamente, como parte de programas de salud pública contra la tuberculosis en la especie humana, existiendo entre ellas diferencias en sus secuencias genómicas; la cepa danesa 1331 (Instituto Serum de Staten en Copenhague, Dinamarca) es la de uso en la UE (Vordermeier *et al.*, 2016b; EFSA, 2013) y, la cepa Sofia 222 en Chile¹

Entre algunas causas relacionadas con la variabilidad obtenida en la eficacia de la vacuna BCG en pruebas de campo en el ganado, se ha comprobado que el uso de distintas cepas, altas dosis administradas, exposición previa a micobacterias ambientales en los animales vacunados, falta de protección a largo plazo, altos niveles de exposición natural a micobacterias y edad de vacunación han constituido factores determinantes en los niveles protectivos alcanzados (Vordermeier *et al.*, 2016a). En consecuencia, a través de modificaciones en modelos de desafío, cepas y dosis, se ha podido incrementar significativamente la eficacia de la vacuna BCG (Ameni *et al.*, 2010). Sin embargo, el rendimiento de una prueba diagnóstica, en cuanto a Es y Se, capaz de detectar los animales infectados entre los vacunados, debe ser estimado antes de iniciar ensayos de rendimiento de la vacuna BCG en un lugar determinado, dado que, los análisis de ensayos de vacunación serian inciertos, si el rendimiento de la prueba resulta ser baja. Dicha prueba, en TBB, es denominada DIVA, por las siglas del inglés “*Detecting Infected among Vaccinated Animals*” (EFSA, 2013)

2.5.2.2. Prueba DIVA

El desarrollo de una prueba DIVA para TBB, en relación con la vacuna BCG, ha tenido un desarrollo importante durante el último tiempo. Basada en la prueba indirecta de liberación de IFN- γ y a partir de la secuenciación de los genomas de *M.*

¹ RETAMAL, P. 2018. [Comunicación Personal]. U. de Chile. FAVET.

bovis y *M. bovis* BCG, se han desarrollado diversos enfoques para identificar reactivos (antígenos) que brinden la Se y Es requerida (Vordermeier *et al.*, 2016a; Vordermeier *et al.*, 2016b); Según Conlan *et al.*, (2016), se estima que se requiere de una eficiencia de al menos 99,85% de Es y una Se de $\geq 40\%$ de la prueba. Sin embargo, al no existir una prueba de oro o de referencia capaz de definir el estado de TBB en un animal, se sugiere desarrollar un modelo múltiple, que permita corregirlo. Entre estos se describe la inclusión de inspección *post-mortem* de linfonodos, histología, bacteriología y PCR en los análisis (Conlan *et al.*, 2016; EFSA, 2013).

En cuanto a los potenciales reactivos estimuladores de dicha prueba, según estudios de análisis genómico y de transcriptoma comparativos entre *M. bovis* BCG y *M. bovis*, se han identificado genes deletéreos o mutados en BCG. Entre estos, el lociRD1, que codifica la expresión de los antígenos ESAT-6, CFP-10 y el sistema de secreción *esx-1*, permitiendo este último la secreción del antígeno Rv3615c. La capacidad inmunogénica de dichos antígenos ha sugerido un potencial para su uso combinado en una prueba DIVA (Vordermeier *et al.*, 2016a; Pym *et al.*, 2003). En cuanto a la Es, tanto ESAT-6 como CFP-10, se consideran en gran parte, específicas del complejo *M. tuberculosis* y ausentes en *M. avium* y *M. bovis* BCG, aunque conservada en *M. kansasii*. Por lo tanto, exceptuando *M. kansasii*, podrían determinar significativamente la Es de la prueba (Strain *et al.*, 2011).

2.6. Plan Nacional de Control y Erradicación de TBB

El Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina en Chile fue iniciado durante el año 2011, con el objetivo de lograr la erradicación de la enfermedad en áreas epidemiológicas de baja prevalencia y reducirla significativamente en el resto del país. La estrategia de este programa se basa en la vigilancia predial, a través del diagnóstico de campo mediante pruebas PPD y/o IFN- γ ; vigilancia en plantas faenadoras, mediante examen *post-mortem*, junto a pruebas confirmatorias de laboratorio (Cultivo bacteriológico y PCR) desde muestras de linfonodos u órganos con y sin lesiones del tipo granulomatosas visibles. El resultado de dichas pruebas, son utilizados para certificar y clasificar la

condición de infección en los animales y predios, respectivamente. Además, dicho plan implica un sistema de saneamiento predial y certificación de predio libre, los cuales apuntan a impedir la transmisión de la enfermedad dentro del rebaño, eliminar la enfermedad y mitigar el riesgo de transmisión de la infección entre rebaños, mediante la implementación de medidas de trazabilidad, biocontención e investigación epidemiológica, según sea cada caso y en distinta intensidad (SAG, 2016).

Sin embargo, la vacunación del ganado con la cepa BCG de *M. bovis* podría representar una estrategia complementaria para el avance del programa, especialmente en la zona de control, de alta prevalencia. En dicho caso, la vacunación, debe ser evaluada junto a una prueba diagnóstica, capaz de discriminar la condición de infección con una cepa de campo y, con la cepa vacuna.

3. HIPÓTESIS

El ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) es eficaz y eficiente en el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en Chile.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Implementar y caracterizar un ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en Chile.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar la eficiencia diagnóstica de un ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) para el diagnóstico de la infección con *M. bovis* en Chile.
- Comparar el desempeño de la prueba DIVA con las técnicas de ELISA-IFN- γ Bovigam 2G®, cultivo en medio Stonebrink, sistema BACTEC MGIT 960 y q-PCR Boviman®.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos, tanto de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615, como ELISA-IFN- γ Bovigam 2G® fueron implementados en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Chile (FAVET). Mientras que el desarrollo de pruebas confirmatorias, cultivo en medio Stonebrink, sistema BACTEC MGIT 960 y q-PCR Boviman® se realizaron en el Laboratorio de Micobacterias del Subdepartamento Laboratorios y Estación Cuarentenaria Pecuaria Lo Aguirre, del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), manteniendo los protocolos establecidos por dicho laboratorio.

5.1. Muestras

Se utilizaron un total de 440 muestras, de las cuales 103 muestras provinieron de bovinos de predios infectados con TBB, 165 muestras de bovinos provenientes de predios sin infección con TBB y, 172 muestras de bovinos provenientes de predios sin información predial de infección con TBB (SAG, 2016). Todas las muestras fueron obtenidas en plantas faenadoras de la Región Metropolitana. Las muestras de bovinos provenientes de predios sin infección con TBB fueron obtenidas en las plantas faenadora de carnes Camer. Mientras que las muestras de bovinos provenientes de predios con infección con TBB fueron obtenidas desde vacas adultas (categoría U), provenientes de predios con altas prevalencias de *M. bovis*, procedentes de la RM, en las plantas faenadoras Cartagena y La Pintana.

Cada muestra o unidad de estudio comprendió:

10 mL de sangre entera tomada con anticoagulante (heparina de litio)

Esta muestra se obtuvo después de la desensibilización de los animales, durante el procedimiento de sangrado.

Tejidos con lesiones sospechosas de tuberculosis y su linfonodo regional.

En los casos en que el animal no presentó lesiones sospechosas de tuberculosis, se muestrearon 2 linfonodos completos de la cabeza (submandibular y retrofaríngeo) y 2 linfonodos mediastinales.

Una vez colectadas las muestras, fueron rotuladas y almacenadas inmediatamente a 4°C hasta su arribo al laboratorio, donde fueron analizadas por las pruebas de diagnóstico de *M. bovis*.

5.2. Método

5.2.1. Muestras sanguíneas

Una vez que fue recolectada la muestra de sangre, en tubos con heparina de litio, se homogeneizaron suavemente y se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), evitando rangos extremos, para su cultivo con los antígenos propios de *M. bovis* y aquellos ausentes en BCG, en las primeras 30 horas desde que fueron obtenidas.

Todas las muestras de sangre, de los animales en estudio, fueron analizadas mediante las pruebas de ELISA-IFN- γ Bovigam 2G® y *test* DIVA con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c.

5.2.1.1. Pruebas Bovigam 2G y DIVA con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c

Se utilizó el *kit* diagnóstico Bovigam® (Prionics, Suiza), según las indicaciones del fabricante, para la detección de IFN- γ bovino, mediante los antígenos estimuladores: Tuberculina bovina PPD 3000 y Tuberculina aviar PPD 2500, de Prionic A.G, en la prueba Bovigam 2G. Mientras que, en la prueba DIVA, se utilizaron los antígenos ESAT-6 y CFP-10 (PC-EC); obtenido de Prionics A.G; y Rv3615c de Pepceuticals Limited Unit.

El procedimiento de la prueba se realizó en 2 etapas:

5.2.1.1.1. Etapa 1: Cultivo de sangre entera

Se dispensaron 6 alícuotas de 250 μL de sangre heparinizada por cada animal en una placa de cultivo de 96 pocillos.

Se añadieron, 25 μL de PBS 1X (Control Antígeno Nulo), PPD bovino, PPD aviar, PC-EC (ESAT-6 y CFP-10) y Rv3615c, usando técnicas asépticas en los 6 pocillos,

conteniendo la sangre previamente dispensada en el paso anterior; la concentración de antígenos fue 7,5 UI de PPD bovino, 6,2 UI de PPD aviar y, 1,37 μ g de Rv3615c y PC-EC, aproximadamente por cada prueba. Además, se utilizó un mitógeno liofilizado Pokeweed (Prionics A.G) para demostrar la funcionalidad de las células productoras de IFN- γ .

Las placas, conteniendo sangre y antígenos, se incubaron por 16 a 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda.

Después de la incubación, se centrifugaron las placas a 500g por 10 min a TA ambiente (22 \pm 3°C), y 100uL de plasma fueron extraídos y almacenados a -20°C hasta la siguiente etapa.

5.2.1.1.2. Etapa 2: ELISA IFN-gamma bovino

Se utilizó el *kit* diagnóstico Bovigam® (Prionics, Suiza), según el fabricante, para la detección y cuantificación de interferón gamma bovino en el plasma obtenido.

Las absorbancias de cada pocillo se leyeron mediante el espectrofotómetro de Bio Tek Instruments Inc, modelo ELx800, usando un filtro de 450nm con uno de referencia de 620-650nm.

5.2.1.1.3. Interpretación de las pruebas Bovigam 2G® y DIVAcon antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c

Para la identificación de un animal reaccionante, los resultados de la prueba Bovigam 2G® se interpretaron, según el siguiente criterio.

Reacción positiva: PPD-B - DO NIL (PBS) \geq 0,05 y DO PPD-B – PPD-A \geq 0,05.

Con la prueba DIVA, se determinó el punto de corte mediante el uso de curvas ROC, priorizando la especificidad por sobre la sensibilidad (Conlan *et al.*, 2015)

5.2.2. Muestras de tejidos

Todas las muestras de tejido fueron procesadas para su análisis con las pruebas oficiales utilizadas por el laboratorio SAG: Aislamiento bacteriológico (Stonebrink y

BACTEC MGIT960) y q-PCR Boviman®. La condición de infección fue determinada por el resultado de todas las pruebas mencionadas (excepto el test DIVA que se evaluó), de la siguiente manera:

- Muestra negativa: Sin lesiones macroscópicas sugerentes de infección y sin detección del agente. En este caso, cada muestra fue evaluada por todos los métodos diagnósticos mencionados.
- Muestra positiva: Con q-PCR Boviman® positivo o con aislamiento positivo.

5.2.2.1. Aislamiento bacteriológico

Se utilizaron linfonodos y/u órganos de bovinos con o sin lesiones del tipo granulomatosas (LTG), visibles en la inspección *post mortem* en las plantas faenadoras mencionadas.

Se utilizó el método de Petroff, estandarizado por el Laboratorio de Micobacterias del SAG, para la descontaminación de las muestras², como se describe a continuación:

Mediante el uso de un bisturí se seleccionó entre 5 y 10 g. de tejido con lesiones granulomatosas aparentes (caseo-necrosis, consistencia calcificada u otro) y/o tejido sano adyacente, que luego se cortó finamente para facilitar su homogeneización.

Para la homogeneización el tejido seleccionado se depositó dentro de una bolsa de Stomacher y se agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE). En el equipo, la muestra se homogeneizó durante 0,5 a 1 minuto a máxima velocidad.

A 2 mL del homogeneizado se agregó 2 mL de NaOH 3,5%. Se agitó en vórtex e incubó en estufa a 37°C por 20 min.

Inmediatamente después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 3000 r.p.m durante 10 min.

² ZURITA, P. 2016. [Comunicación Personal]. SAG. Lab. de Micobacterias.

Se eliminó el sobrenadante y se agregó al tubo 3 a 5 gotas de rojo fenol como indicador de pH, luego se neutralizó la muestra con H_2SO_4 , hasta que se generó el viraje desde el color rojo hasta un color amarillo-anaranjado.

Una vez neutralizada la muestra, con hisopo estéril se inoculó parte del sedimento en un tubo con medio ST y, se incubó a $37^\circ C$. Los tubos se observaron semanalmente, descartándose aquellos que a los 60 días no presentaron desarrollo de colonias sospechosas a *Mycobacterium*. Las colonias sospechosas se analizaron mediante la técnica mPCR.

Para la siembra en medio de cultivo líquido en equipo BACTEC MGIT 960 se utilizaron las muestras que ya fueron descontaminadas a través del método de Petroff estandarizado, antes mencionado. Se agregó 0,5 mL, a cada tubo, conteniendo medio PANTA-OADC, y se agitó para lograr una completa homogenización. Los tubos fueron ingresados al equipo BACTEC MGIT 960, siendo leídos cada 60 minutos durante 7 semanas. Las muestras sospechosas, que el equipo identificó como positivas, fueron retiradas y analizadas mediante la técnica mPCR, desde el inóculo.

5.2.2.2. Procedimiento de q-PCR Boviman

En el gabinete de bioseguridad se depositó la muestra de linfonodo en una placa de Petri y se seleccionó un trozo de lesión granulomatosa y/o tejido sano, del tamaño aproximado de 3 x 3 mm, éste se depositó en un tubo de tapa rosca estéril de 2mL con sello O ring, con un contenido de 0,5 mL de perlas de zirconia: 0,25 mL de 0,1 mm y 0,25 ml de 1 mm, respectivamente.

Se agregó al tubo 400 uL de Buffer de lisis del *kit* de extracción High pure PCR template preparation *kit* Roche®.

Posteriormente se agregó 50 uL de proteinasa K Roche (incluida en el *kit*).

Los tubos fueron depositados en un disruptor celular (Biospec products Inc) por 3 minutos a 3000 rpm, y luego fueron incubados por un mínimo de 1h a $55^\circ C$.

Luego se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 min y, posteriormente se extrayeron 200 uL del sobrenadante que fueron seguidamente transferidos a un tubo Eppendorf limpio de 1,6 mL.

Posteriormente se utilizó el *kit* de extracción High pure PCR template preparation *kit* Roche®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalmente, la pureza y cantidad de DNA se midió mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

Para la reacción de q-PCR, se utilizó el *kit* BoviMan® siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este *kit* contiene oligonucleótidos, sondas, control interno (CI) y control positivo, y está específicamente adaptado para qPCR con sondas de hidrólisis marcadas dualmente para la identificación de *Mycobacterium bovis*.

5.3. Análisis estadístico de resultados

Se determinó el punto de corte de la prueba DIVA utilizando el *pool* de antígenos ESAT-6 y CFP-10 (PC-EC) y Rv3615c, priorizando la especificidad por sobre la sensibilidad, mediante el uso de curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*), utilizando el programa estadístico Infostat. Los puntos de corte representaron los límites donde se consideraron los valores reaccionantes y no reaccionantes de cada prueba. Se determinó la eficiencia de la prueba DIVA, para el diagnóstico de la infección con *M. bovis* en Chile, según lo definido por Conlan *et al.*, (2015)

Se obtuvo el área bajo la curva ROC utilizando los antígenos PC-EC y Rv3615c. En ellas se representó la Se de la técnica diagnóstica frente al valor que se obtiene al restar una unidad a la Es (1-especificidad). El área bajo la curva ROC obtenida osciló entre un valor de 0,5 (no discrimina entre una muestra reaccionante y un falso positivo) y 1 (prueba diagnóstica perfecta), dicho valor se interpretó según indica la Tabla 1.

Tabla 1. Interpretación del Área bajo la Curva ROC

0,5-0,7	Baja exactitud
0.7-0.9	Útil para algunos propósitos
> 0.9	Alta exactitud
Fuente: (Swets, 1988)	

Se determinó la presencia de diferencias significativas entre ensayos mediante la prueba de McNemar y, la magnitud de las concordancias entre ensayos mediante el estadístico Kappa, interpretándose según la siguiente la Tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de Índice de Kappa.

0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy bueno
Fuente: (López de Ullibarri y Pita Fernández, 1999)	

Se utilizaron los criterios de eficiencia: costo (valor comercial de cada prueba), rapidez (tiempo requerido para la emisión del diagnóstico) y complejidad (horas dedicadas por persona), de las pruebas DIVA, Bovigam 2G, cultivo en medio Stonebrink, cultivo en sistema BACTEC MGIT960 y qPCR Boviman.

Para calificar los parámetros de costo, rapidez, y complejidad, y con el fin de mantener la mayor objetividad al asignar los valores, se asignó un puntaje entre 0 y 10, utilizando como función de asignación una recta definida por dos puntos, dada por la siguiente ecuación:

$$y = \frac{y_1 - y_2}{x_1 - x_2} (x - x_2) + y_2$$

Dónde:

y = Puntaje obtenido por el parámetro después de aplicar la fórmula

x = Valor cuantitativo del parámetro (Ej.: 8 horas persona)

x_1 = Valor menos eficiente dentro de los datos del parámetro

x_2 = Valor más eficiente dentro de los datos del parámetro

y_1 = Puntaje asignado al valor más eficiente del parámetro, en este caso corresponde a 10 puntos.

y_2 = Puntaje asignado al valor menos eficiente dentro de los datos del parámetro, en este caso corresponde a 0 puntos.

De esta manera la función asignó 10 puntos al valor más eficiente y disminuyó linealmente hasta asignar 0 puntos al valor menos eficiente. La técnica más eficiente fue aquella que tuvo el mayor puntaje combinado (Patiño, 2015).

6. RESULTADOS

6.1. Eficiencia diagnóstica de un ensayo de ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c (DIVA) para el diagnóstico de la infección con *M. bovis* en Chile.

Los resultados de eficiencia diagnóstica del ensayo DIVA, mediante el análisis del área bajo la curva ROC y el punto de corte, se obtuvieron considerando sólo aquellas muestras comprendidas en este estudio que cumplieren con las directrices recomendadas para el cálculo del rendimiento diagnóstico de una prueba (OIE, 2012), según lo cual se obtuvo un grupo de referencia positivo, infectado por TBB (n=31) y otro grupo de referencia negativo, no infectado por TBB (n=158), según se muestra a continuación en la Tabla 3, en donde se observan los requerimientos diagnósticos para el establecimiento de los grupos de referencia, resultando en un N total de 189, compuesto de un grupo positivo con 31 muestras y un grupo negativo con 158 muestras para los cálculos de eficiencia diagnóstica del ensayo DIVA.

Tabla 3: Criterio y establecimiento de grupos de referencia positivo (grupo positivo) y grupo de referencia negativo (grupo negativo)

Grupo Positivo		Grupo Negativo	
Animales procedentes de predios con infección, sin infección y sin información del predio		Animales procedentes de predios sin infección y,	
-		Bovigam 2G negativo y,	
Animales con qPCR positivo o, Aislamiento positivo		qPCR negativo y, Aislamiento negativo	
n=31		n=158	

En consecuencia, con lo señalado anteriormente, se obtuvieron los resultados del análisis de curvas ROC de las DO, de los grupos no infectados e infectados a TBB, en la prueba DIVA con los antígenos PC-EC.

La curva ROC es un gráfico que muestra todos los pares posibles de sensibilidad y especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte, en este caso de densidad óptica (DO), en todo el rango de resultados observados. La capacidad de la prueba DIVA, de detectar como positivo a un animal infectado, puede evaluarse estimando el intervalo de confianza del área bajo la curva ROC. Si el intervalo no incluye el valor 0,5 la prueba DIVA es capaz de discriminar entre enfermos y sanos (Swets, 1988). En la Figura 1 se observa el gráfico de la curva ROC de la prueba DIVA, utilizando el *pool* de antígenos PC-EC en los grupos de referencia, donde la variable analizada corresponde a los resultados de DO correspondientes. La ordenada representa el porcentaje de Se y, la abscisa el porcentaje de falsos positivos (1-Es). El resultado del área bajo la curva ROC alcanzó un $0,735 \pm 0,054$. Dicho valor significa que, un individuo seleccionado al azar del grupo infectado por TBB tendrá el 73% de las veces un valor de DO cuantitativamente mayor que la DO de un individuo elegido al azar del grupo no infectado por TBB (Hanley y McNeil, 1982).

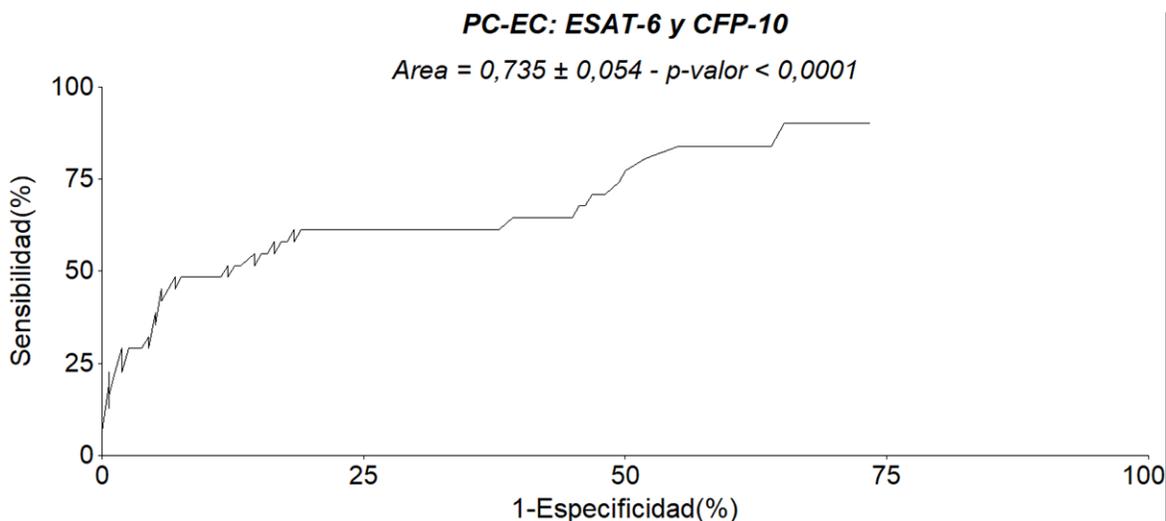


Figura 1: Representación del análisis ROC de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba ELISA-C con antígenos PC-EC

En la Figura 2 se muestra el gráfico de curvas de Se (azul) y Es (rojo) resultantes del análisis ROC de los grupos de referencia, donde la variable analizada corresponde a los resultados de DO correspondientes, estimulados con los

antígenos PC-EC. La ordenada representa el porcentaje y la abscisa la magnitud de DO. Se observa que la línea vertical, el punto 0,06 de DO, corresponde a la mejor combinación de Se y Es, priorizando un mayor porcentaje de Es, permitiendo una Es de 82% y una Se de 61%, lo cual no es eficiente según Conlan *et al.*, (2015)

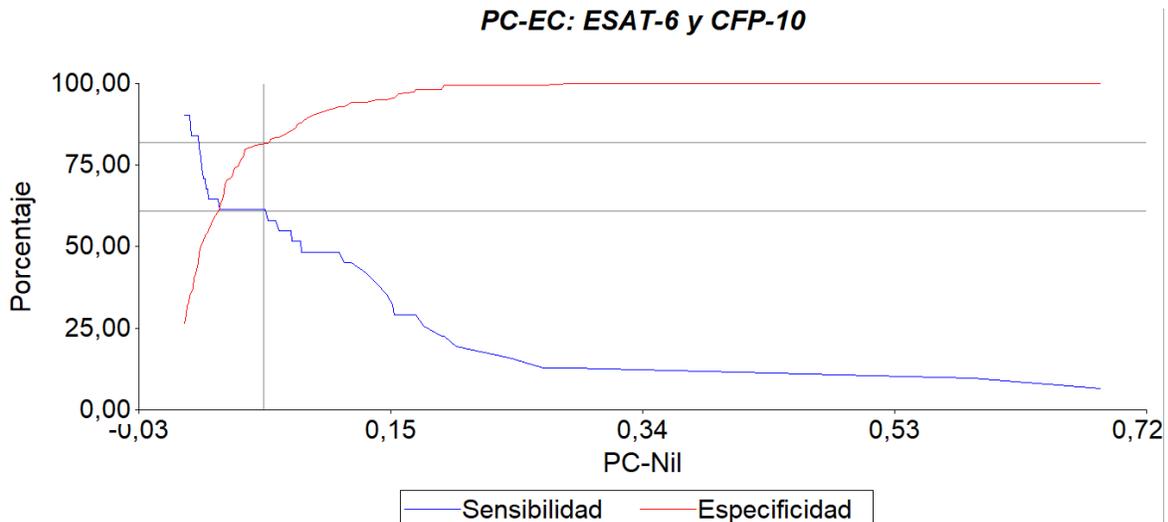


Figura 2: Representación de la curva del análisis de Se y Es de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba de ELISA-C con antígenos PC-EC

En cuanto al resultado obtenido del análisis de la curva ROC de las DO de los grupos no infectados e infectados a TBB en la prueba DIVA, con el antígeno Rv3615c, en la Figura 3 se observa el gráfico correspondiente, indicando un área bajo la curva ROC de $0,731 \pm 0,054$. Dicho valor, similar al de la curva ROC del *pool* de antígenos PC-EC, indica según el mismo criterio que, un individuo seleccionado al azar del grupo infectado por TBB tendrá el 73% de las veces un valor de DO cuantitativamente mayor que la DO de un individuo elegido al azar del grupo no infectado por TBB (Hanley y McNeill, 1982).

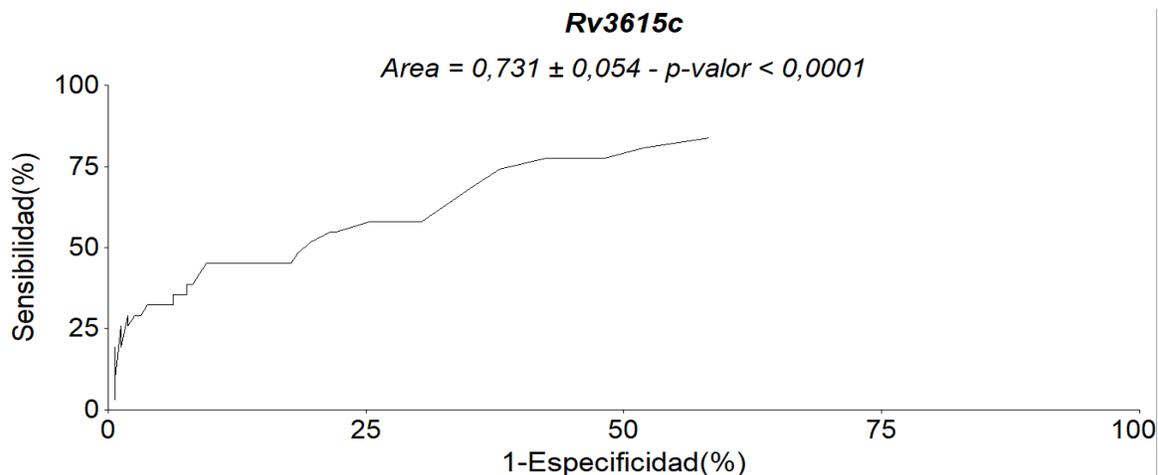


Figura 3: Representación del análisis ROC de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba ELISA-C con antígeno Rv3615c

En referencia al punto de corte de la prueba DIVA utilizando sólo el antígeno Rv3615c, en la Figura 4 se observa el gráfico de curvas de Se y Es resultantes del análisis ROC de los grupos de referencia, donde la variable analizada corresponde a los resultados de DO correspondientes, estimulados con el antígeno Rv3615c. Se observa que la línea vertical, el punto 0,02 de DO, corresponde a la mejor combinación de Se y Es, priorizando un mayor porcentaje de Es, permitiendo un 90% de Es y 45% de Se, lo cual no es eficiente según Conlan *et al.*, (2015).

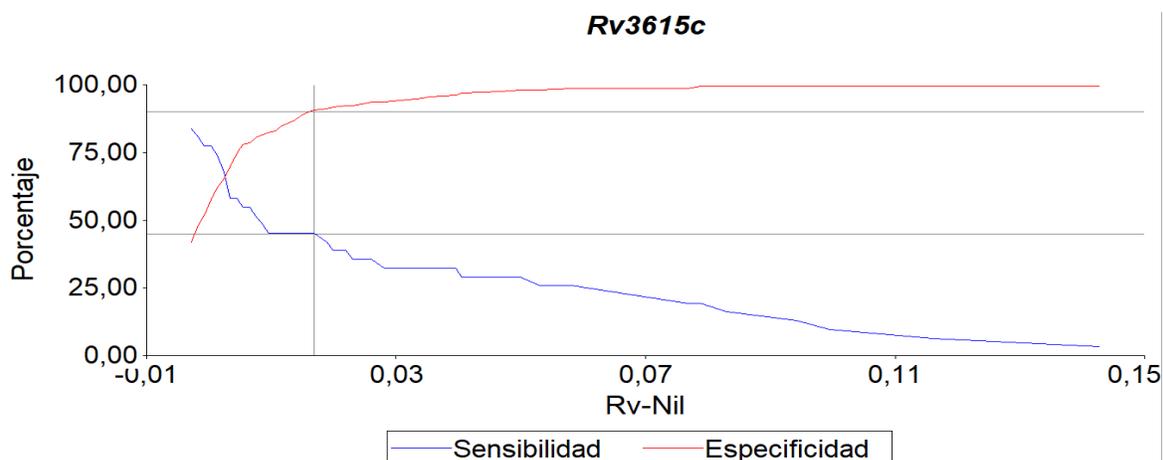


Figura 4: Representación de la curva del análisis de Se y Es de las DO de los grupos positivos y negativos a TBB a la prueba de ELISA-C con antígeno Rv3615c

Por lo tanto, y en consecuencia con los resultados indicados anteriormente, es decir, estableciendo como punto de corte una DO de 0,06 en el *pool* de antígenos PC-EC y, una DO de 0,02 en el antígeno Rv3615c, se obtuvo el rendimiento global de la prueba DIVA en este estudio. Dicho rendimiento se presenta en la Tabla 4 en donde se observa que de un total de 31 muestras confirmadas infectadas por TBB, 21 lograron ser detectadas por la prueba DIVA. Alcanzando una Se de 68% y una Es de 79%, lo cual no es eficiente según Conlan *et al.*, (2015).

Tabla 4: Análisis estadístico, rendimiento y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y la condición de infección según el criterio mencionado en la Tabla 1.

DIVA	INFECCIÓN			Se y Es DIVA
		Pos	Neg	
	Pos	21	33	54
	Neg	10	125	135
		31	158	189
				Se = (21/31) x 100=68%
				Es= (125/158) x 100=79%
				Se = Sensibilidad Es = Especificidad

6.2. Comparación del desempeño de la prueba DIVA con las técnicas de ELISA-IFN- γ Bovigam 2G, cultivo en medio Stonebrink, sistema BACTEC MGIT 960 y q-PCR-Boviman.

Se determinó la presencia de diferencias significativas entre ensayos mediante la prueba de McNemar y, la magnitud de las concordancias entre ensayos mediante el estadístico Kappa.

En el cálculo de la prueba de McNemar y el estadístico Kappa entre la prueba DIVA y los demás ensayos, se utilizó el mejor punto de corte de los antígenos PC-EC y Rv3615c obtenidos en los cálculos de eficiencia diagnóstica descritos anteriormente. Estos fueron una DO de 0,06 en PC-EC y una DO de 0,02 en Rv3615c, priorizando la especificidad sobre la sensibilidad. Adicionalmente, en cada una de las comparaciones, no se consideraron aquellas muestras que fueron rechazadas o que no incluían el resultado necesario para dicha comparación. Por

lo tanto, se obtuvo un número de muestras (n) distinto en cada una de las comparaciones que se presentan en las Tablas 5 a 12. En la Tabla 5 se observa que, de un total de 95 animales detectados infectados mediante PC-EC, 37 lograron ser detectados utilizando el antígeno Rv3615c, existiendo diferencias significativas entre ambos ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia bajo (k).

En la Tabla 6 se observa que, de un total de 55 animales detectados infectados mediante Rv3615c, 14 lograron ser confirmados utilizando pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman, existiendo diferencias significativas entre ambos métodos ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia bajo (k).

En la Tabla 7 se observa que, de un total de 95 animales detectados infectados mediante PC-EC, 19 lograron ser confirmados utilizando pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman, existiendo diferencias significativas entre ambos métodos ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia bajo (k).

En la Tabla 8 se observa que, de un total de 113 animales detectados infectados mediante la prueba DIVA, 32 lograron ser detectados utilizando Bovigam 2G, existiendo diferencias entre ambas pruebas ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia bajo (k).

En la Tabla 9 se observa que, de un total de 110 animales detectados infectados mediante la prueba DIVA, 16 lograron ser confirmados utilizando la técnica de qPCR Boviman, existiendo diferencias entre ambas pruebas ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia insignificante (k).

En la Tabla 10 se observa que, de un total de 112 animales detectados infectados mediante la prueba DIVA, 15 lograron ser confirmados mediante el método de cultivo en medio Stonebrink, existiendo diferencias entre ambas pruebas ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia insignificante (k).

En la Tabla 11 se observa que, de un total de 113 animales detectados infectados mediante la prueba DIVA, 8 lograron ser confirmados mediante el método de cultivo en sistema Bactec MGIT-960, existiendo diferencias significativas entre ambas pruebas ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia insignificante (k).

En la Tabla 12 se observa que, de un total de 113 animales detectados infectados mediante la prueba DIVA, 17 lograron ser confirmados mediante el método de cultivo combinado de Stonebrink y sistema Bactec MGIT-960, existiendo diferencias significativas entre ambas pruebas ($p > 0,05$) y, un índice de concordancia insignificante (k).

Tabla 5: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de antígenos DIVA: PC-EC y Rv3615c.

		Rv3615c			PC-EC – Rv3615c
		Neg	Pos	Total	
PC-EC	Neg	280	18	298	G = 22,11 con corrección de Yates
	Pos	58	37	95	
	Total	338	55	393	C = 80,66; k = 0,38

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 6: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del antígeno DIVA Rv3615 y la condición de infección mediante pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman desde lesiones granulomatosas y/o tejido linfoide.

		INFECCIÓN			Rv3615c - INFECCIÓN
		Neg	Pos	Total	
Rv3615c	Neg	320	17	337	G = 10,77 con corrección de Yates
	Pos	41	14	55	
	Total	361	31	392	C = 85,20; k = 0,25

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 7: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del antígeno DIVA PC-EC y la condición de infección mediante pruebas de cultivo (Stonebrink y Bactec MGIT-960) y qPCR-Boviman desde lesiones granulomatosas y/o tejido linfoide.

PC-EC	INFECCIÓN			Rv3615c - INFECCIÓN
		Neg	Pos	Total
Neg	285	12	297	G = 48,01 con corrección de Yates
Pos	76	19	95	
Total	361	31	392	Chi2 = 3,84
				C = 77,55; k = 0,20

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 8: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y Bovigam 2G.

DIVA	BOVIGAM 2G			DIVA – BOVIGAM 2G
		Neg	Pos	Total
Neg	263	14	277	G = 48,67 con corrección de Yates
Pos	81	32	113	
Total	334	46	390	Chi2 = 3,84
				C = 75,64; k = 0,28

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 9: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de prueba DIVA y qPCR Boviman.

DIVA	qPCR BOVIMAN			DIVA – qPCR BOVIMAN	
		Neg	Pos	Total	
	Neg	269	8	277	G = 74,0 con corrección de Yates Chi2 = 3,84
	Pos	94	16	110	
Total	363	24	387	C = 73,64; k = 0,15	

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 10: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y Stonebrink.

DIVA	STONEBRINK			DIVA – STONEBRINK	
		Neg	Pos	Total	
	Neg	270	9	279	G = 74,72 con corrección de Yates Chi2 = 3,84
	Pos	97	15	112	
Total	367	24	391	C = 72,89; k = 0,13	

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 11: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de prueba DIVA y Bactec MGIT-960

DIVA	BACTEC MGIT-960			DIVA – BACTEC MGIT-960	
		Neg	Pos	Total	
	Neg	271	8	279	G = 84,99 con corrección de Yates
	Pos	105	8	113	
Total	376	16	392	Chi2 = 3,84	
				C = 71,17; k = 0,05	

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 12: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de la prueba DIVA y el método de cultivo combinado de Stonebrink y sistema Bactec MGIT-960

DIVA	CULTIVO			DIVA – CULTIVO	
		Neg	Pos	Total	
	Neg	271	8	279	G = 76,16 con corrección de Yates
	Pos	96	17	113	
Total	367	25	392	Chi2 = 3,84	
				C = 73,46; k = 0,15	

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes

En las tablas antes señaladas es posible evidenciar que, al analizar diferencias entre las pruebas y las concordancias entre las mismas, los resultados obtenidos en la comparación de antígenos PC-EC con Rv3615c como en la prueba DIVA con Bovigam 2G se constataron diferencias significativas entre ellas y, un índice de concordancia bajo, 0,28 en PC-EC con Rv3615c y 0,38 en DIVA con Bovigam 2G. Mientras que, al comparar la prueba DIVA con las pruebas restantes; qPCR Boviman, Stonebrink, Bactec MGIT 60 y el método de cultivo combinado, se obtuvieron igualmente diferencias significativas en la comparación entre dichas

pruebas, aunque el índice de concordancia entre ellas fue insignificante, 0,15; 0,13; 0,05 y 0,13, respectivamente. Estas evidencias contrastan claramente al comparar los sistemas de cultivo Stonebrink con Bactec MGIT-960, como el sistema de cultivo combinado con la técnica de qPCR-Boviman, donde, aunque se obtuvieron diferencias significativas entre Bactec MGIT-960 con Stonebrink, éstas no se hallaron entre el método de cultivo combinado con qPCR-Boviman, junto a un índice de concordancia bueno (0,63) y muy bueno (0,82), respectivamente (Tabla 13 y 14).

Tabla 13: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación de los métodos de cultivo Bactec MGIT-960 y Stonebrink.

BACTEC MGIT- 960	STONEBRINK			BACTEC-MGIT-960 – STONEBRINK
	Neg	Pos	Total	
Neg	409	12	421	G = 4,26 con corrección de Yates
Pos	3	14	17	
Total	412	26	438	Chi2 = 3,84
				C = 96,57; k = 0,63

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Tabla 14: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación del método de cultivo combinado Stonebrink y sistema Bactec MGIT-960 con qPCR Boviman.

CULTIVO	qPCR- BOVIMAN			CULTIVO – qPCR BOVIMAN
	Neg	Pos	Total	
Neg	404	6	410	G = 1,12 con corrección de Yates
Pos	2	20	22	
Total	406	26	432	Chi2 = 3,84
				C = 98,14; k = 0,82

G = Prueba de McNemar; Chi2 = chi cuadrado; k = índice de concordancia; C = % de resultados concordantes.

Se comparó la eficiencia de los parámetros rapidez, complejidad y costo de las pruebas de diagnóstico tradicionales con la prueba DIVA. Para valorar la eficiencia de cada prueba, se tuvieron en cuenta: costo (valor comercial de cada prueba), rapidez (tiempo requerido para la emisión del diagnóstico) y complejidad (horas de labor dedicadas por persona). Para calificar los parámetros de costo, rapidez, y complejidad, y con el fin de mantener la mayor objetividad al asignar los valores, se asignó un puntaje entre 0 y 10; 10 puntos al valor más eficiente y, disminuyendo linealmente hasta asignar 0 puntos al valor menos eficiente. La técnica más eficiente fue aquella que tuvo el mayor puntaje combinado. En la Tabla 15 se observan los resultados de eficiencia de los parámetros mencionados de las pruebas tradicionales y la prueba DIVA. En orden descendente la eficiencia fue: qPCR-Boviman, Bovigan 2G, DIVA, Stonebrink y Bactec MGIT-960.

Tabla 15: Análisis de eficiencia de parámetros entre pruebas de diagnóstico tradicionales de TBB con la prueba DIVA

Parámetro	DIVA	Bovigan 2G	qPCR- Boviman	Stonebrink	Bactec 960	MGIT-
Rapidez	2	2	1	57	34	
Puntuación	9,82	9,82	10	0	4,1	
Complejidad	5	5	1	7	7	
Puntuación	3,3	3,3	10	0	0	
Costo	1,08	1,05	0,54	0,79	0,84	
Puntuación	0	0,6	10	5,4	4,5	
Total	13,12	13,72	30	5,4	8,6	

Rapidez = tiempo en días que demora la emisión del resultado; Complejidad = horas por persona; Costo = UF (Unidad de Fomento) = \$27.100 CLP

De los resultados señalados en la Tabla 15 se desprende que, al comparar cada uno de los parámetros señalados, de las cinco técnicas estudiadas, la prueba DIVA tuvo el segundo lugar en mayor rapidez en emitir un resultado y, en complejidad de la técnica u horas ocupadas por persona, sólo superada por qPCR-Boviman. Adicionalmente, tuvo la menor eficiencia en el análisis de costo, siendo por ello la técnica más costosa dentro de las cinco técnicas evaluadas.

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue realizar la implementación y caracterización de un ensayo DIVA, ELISA-IFN- γ con antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, para el diagnóstico de la infección por *M. bovis* en Chile. Este estudio fue formulado como parte del proyecto de evaluación de la aplicación de la vacuna BCG y el test DIVA para la prevención y diagnóstico de la infección por *M. bovis* en planteles bovinos de la zona central de Chile. El proyecto mencionado, se justifica en que, la vacunación del ganado con la cepa BCG de *M. bovis* podría representar una estrategia complementaria para el avance del Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina en Chile, para ello, la vacuna debe ser evaluada junto a una prueba diagnóstica capaz de discriminar la condición de infección con una cepa de campo o con la cepa vacuna.

Mediante el método ROC, se determinó la eficacia y eficiencia diagnóstica de la prueba DIVA. El área bajo la curva ROC de los antígenos fue $0,735 \pm 0,054$ en PC-EC y $0,731 \pm 0,054$ en Rv3615c, lo cual evidencia en este estudio, que la prueba DIVA es eficaz en el diagnóstico de la infección por TBB, dado que dichos valores pueden interpretarse según Swets, (1988) como que la prueba DIVA, utilizando PC-EC o Rv365c, puede ser útil en algunas situaciones, por ejemplo, no sería útil para realizar programas de saneamiento de la población en búsqueda de individuos infectados por TBB en la población general, dado que dichas pruebas requieren una alta Se diagnóstica asociada a una baja Es diagnóstica. Sin embargo, fijando una alta Es diagnóstica asociada a una Se diagnóstica más baja, dicha prueba podría utilizarse para una prueba confirmativa a TBB (OIE, 2012). Por lo tanto, dichos resultados constatan lo descrito por Vordermeir *et al.*, (2011), en cuanto a que ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c son eficaces en la detección de la infección por TBB. Esto es causa a que los antígenos mencionados se encuentran codificados en locis altamente conservados en el genoma de *M. bovis*, siendo secretados en el hospedero infectado, mediante el sistema de secreción micobacteriano *esx-1*, luego son procesados y presentados a Lt mediante MHC clase 2 de células dendríticas, generando memoria inmunológica mediante Lt CD4 helper.

En cuanto a la eficiencia diagnóstica de los antígenos PC-EC y Rv3615c, se determinó que los puntos de corte, que permiten la mejor combinación de valores de Es y Se, priorizando la Es, fue 0,06 DO para los antígenos PC-EC y, 0,02 DO en Rv3615c, obteniendo un rendimiento diagnóstico de 61% y 45% de Se y, 82% y 90% de Es, respectivamente. En consecuencia, utilizando los puntos de corte mencionados anteriormente, se obtuvo el rendimiento de la prueba DIVA, considerando los antígenos PC-EC y Rv3615c de forma conjunta, obteniendo un rendimiento que alcanzó una Se de 68% y Es de 79%, estos resultados contrastan con lo señalado por otros autores, siendo menores a ellos (Casal *et al.*, 2012; Vordermeier *et al.*, 2016b) y, muy inferiores a los valores de eficiencia que se señalan en la hipótesis de este trabajo, que corresponden a los definidos por Conlan *et al.*, (2015). Quien postula que, una Es diagnóstica de al menos 99,85% y una Se $\geq 40\%$ se requieren para obtener un beneficio rentable de la vacunación con *M. bovis* BCG, mediante un esquema de diagnóstico intensivo con la prueba DIVA, donde el rebaño vacunado afectado es testeado, descartando los animales positivos hasta quedar limpio de infección, ya que una alta especificidad permite dictaminar que el animal reaccionante esté verdaderamente infectado.

El bajo rendimiento diagnóstico de la prueba DIVA, alcanzado en este trabajo, en comparación a los pocos estudios que han sido publicados, puede deberse a que aquellos se basan principalmente, tanto en respuestas cinéticas de IFN- γ en el transcurso del tiempo, ante la estimulación *in vitro* con los antígenos mencionados, a partir de muestras provenientes de animales infectados experimentalmente en un tiempo cero (Vordermeier *et al.*, 2011) y/o de un grupo de animales pertenecientes a un rebaño definido, en que se ha detectado la infección mediante pruebas diagnósticas determinadas (Casal *et al.*, 2012), es decir, las características fisiopatológicas y epidemiológicas de los grupos de referencia evaluados, son de mayor homogeneidad en cuanto a la fase de infección del grupo estudiado. Mientras que, en este estudio, las muestras sanguíneas fueron obtenidas desde animales en plantas faenadoras, en el momento inmediatamente previo a su beneficio, a partir de lo cual se determinó el grupo de referencia no infectado e infectado, este último de menor número y aparentemente, de mayor heterogeneidad o dispersión en

cuanto a la fase de infección a *M. bovis* o fase de la enfermedad TBB, incluyendo animales jóvenes, adultos y viejos de variada condición en general.

La dispersión entre fases de infección dentro de un grupo de referencia infectado es relevante en la evaluación de la prueba DIVA, dado que individuos en fases avanzadas de la enfermedad y/o anergia, no podrían estar siendo detectados por la prueba evaluada, disminuyendo la Se. En este estudio, 8 animales del grupo infectado, con presencia de lesiones macroscópicas y con aislamiento micobacteriológico positivo fueron negativos a la prueba DIVA (Tabla 12). En cuanto al grupo no infectado, una baja Se del conjunto de pruebas que definen al grupo de referencia negativo, podrían generar un aumento de falsos positivos, al evaluar la prueba DIVA, disminuyendo el resultado del cálculo de especificidad de ésta. En este estudio se utilizaron las pruebas de cultivo, PCR y Bovigam 2G. La baja sensibilidad del método de cultivo y PCR se explica por la baja cantidad del agente infeccioso en las fases iniciales o tempranas de la infección, en animales jóvenes o adultos, junto con la potencial inviabilidad de los inóculos, posterior al proceso de descontaminación con NaOH 3,5%. Mientras que, las prueba Bovigam 2G, y de tuberculina con la cual se clasifican los predios, se describe que poseen una baja sensibilidad, justamente en aquellos predios de baja prevalencia (OIE, 2009). Adicionalmente, el efecto de micobacterias ambientales sensibilizadoras a ESAT-6 y CFP-10 se ha descrito debido a que estas proteínas se consideran conservadas en *M. kansasii*, pudiendo disminuir también la especificidad de la prueba evaluada (Strain *et al.*, 2011)

Otros factores que podrían repercutir en un menor rendimiento diagnóstico de la prueba DIVA en este trabajo pueden ser aquellos asociados al bajo número (n) de los grupos de referencia (OIE, 2012), lo cual se refleja en mayor medida en el grupo de referencia infectado por *M. bovis* (n=31). Y al eventual efecto inmunosupresor asociado al estrés (Fulton y Rosenquist, 1976; Hughes *et al.*, 2013), que podrían ejercer los procedimientos que involucran el manejo de los animales hacia y en las plantas faenadoras, en las cuales se obtuvieron las muestras sanguíneas de este trabajo, lo cual podría afectar la producción y posterior cuantificación de IFN- γ .

Sin embargo, los resultados que se lograron, al comparar los antígenos mediante el índice de concordancia (k) y, los resultados de rendimiento de los antígenos, de forma separada y conjunta en la prueba DIVA, mostraron que, al usarlos en forma simultánea, hubo una mayor Se que al utilizarlos de forma separada, lo cual coincide con otros autores (Vordermeier *et al.*, 2016a; Pym *et al.*, 2003).

Adicionalmente, al analizar los antígenos entre ellos, mediante el método de McNemar, se evidenciaron diferencias significativas (Tabla 5) que respaldan a su vez, aquellas diferencias observadas entre el rendimiento de los mismos obtenido mediante el análisis ROC, reflejando lo señalado por Vordermeier *et al.*, (2011), en cuanto a que Rv3615c es reconocido, predominantemente, en animales infectados con lesiones y / o cultivo de *M. bovis* positivo, es decir, en fases más tardías de la infección, en comparación con ESAT-6 y CFP-10; lo cual podría manifestarse en éste estudio, en una mayor concordancia (k) de la prueba utilizando Rv3615c, que PC-EC, en relación con el conjunto de pruebas directas (PCR y cultivo bacteriológico) a partir de muestras de tejido con lesiones granulomatosas (Tabla 6 y Tabla 7). Sin embargo, lo anterior no es concluyente en este estudio, dado que los distintos puntos de corte seleccionados (menor en Rv3615c) podrían generar un sesgo en los resultados que son comparados y extrapolados.

Respecto al segundo objetivo específico de este trabajo, que dice relación con la comparación del desempeño de la prueba DIVA con las técnicas Bovigam 2G, cultivo en medio Stonebrink, sistema BACTEC MGIT 960 y q-PCR Boviman. Al analizar la concordancia (k) del ensayo DIVA con el resto de las pruebas diagnósticas se evidenció una concordancia baja y diferencias significativas entre las pruebas DIVA y Bovigam 2G. Una posibilidad que explica este resultado es que siendo PPD_b una mezcla de proteínas pobremente definidas, estas no permitirían la sensibilidad suficiente para detectar los antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c. Sin embargo, el resultado obtenido sugiere que ambas pruebas podrían usarse de forma complementaria en el diagnóstico de TBB en animales vivos, permitiendo aumentar el rendimiento y, ajustar el punto de corte de acuerdo al contexto epidemiológico de la zona de estudio en que se requiera detectar la infección;

normalmente en una zona de alta prevalencia se utiliza un punto de corte que permita una mayor especificidad, otorgando la menor cantidad de falsos positivos. Mientras que, si se usa en zonas de baja prevalencia, se debe privilegiar una alta sensibilidad, que otorgue la menor cantidad de falsos negativos (OIE, 2009).

Adicionalmente, el resultado de concordancia (k), bajo, obtenido tras la comparación entre los ensayos indirectos, DIVA y Bovigam 2G, contrasta con aquellos obtenidos en la comparación de la prueba DIVA con los métodos directos de detección (Stonebrink, Bactec MGIT-960, aislamiento combinado y qPCR-Boviman) que mostraron una concordancia (k) insignificante. Este hallazgo confirma que los blancos de detección de los métodos diagnósticos directos e indirectos predominan en distintas fases de la infección (Pollock y Neill, 2002; Pollock *et al.*, 2001), lo cual se evidencia, además, al analizar las comparaciones entre los métodos directos de detección, que muestran un alto índice de concordancia.

Por lo tanto, el índice de concordancia (k) bajo e, insignificante, del ensayo DIVA en relación con Bovigam 2G y, los métodos directos de detección, respectivamente, señala que la prueba DIVA no sería una alternativa capaz de reemplazar a ninguno de los ensayos comparados, pero sí podría complementarlos en el diagnóstico de infección por *M. bovis*, en especial con Bovigam 2G, en animales inmunocompetentes vivos, presentando para ello ventajas en su implementación simultánea en un solo procedimiento y, ser aplicable a una gran cantidad de muestras.

Finalmente, al analizar los criterios de eficiencia: costo (valor comercial de cada prueba), rapidez (tiempo requerido para la emisión del diagnóstico) y complejidad (horas dedicadas por persona), de las pruebas DIVA, Bovigam 2G, cultivo en medio Stonebrink, cultivo en sistema BACTEC MGIT960 y qPCR Boviman. Se determinó que la prueba DIVA obtuvo el segundo lugar en los parámetros rapidez y complejidad, junto con Bovigam 2G y, último lugar de eficiencia en el análisis del parámetro costo, seguido de Bovigam 2G, que ocupó el penúltimo lugar de eficiencia en dicho parámetro. Sin embargo, desde el punto de vista de los criterios de eficiencia previamente señalados, la única diferencia entre las pruebas DIVA y

Bovigam 2G, son los antígenos adicionales PC-EC y Rv3615c de la prueba DIVA, lo cual genera un aumento marginal solamente en el costo. Por lo tanto, considerando que sólo se requieren modificaciones menores, como es la adición de 2 pocillos por cada muestra, uno para PC-EC y otro para Rv3615c, la prueba DIVA podría ser una prueba de elección en el diagnóstico de la infección en animales vivos, en forma complementaria a Bovigam 2G, para ello la implementación conjunta de ambas pruebas resulta bastante práctica, permitiendo con ello recabar más información y en consecuencia, brindar mayor calidad diagnóstica, que en forma separada.

En cuanto a la prueba qPCR-Boviman, que obtuvo la mayor eficiencia total en los criterios mencionados, dicha prueba se relaciona a la etapa *post-mortem* y tiene un carácter confirmativo, dentro del Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina en Chile, junto con los métodos de cultivo.

8. CONCLUSIÓN

A través de este estudio se logró implementar y validar la prueba DIVA como método de diagnóstico indirecto para la detección de la infección por *M. bovis*.

Utilizando los antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, en la implementación y validación de la prueba sanguínea DIVA, se determinó a partir de los valores de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva ROC, obtenidos a partir de los grupos de referencia comprendidos en este estudio, que la prueba DIVA es eficaz, aunque ineficiente en el diagnóstico de la infección por *M. bovis*, según lo postulado por Conlan *et al.*, (2015).

9. BIBLIOGRAFÍA

ABALOS, P; RETAMAL, P. 2004. Tuberculosis: ¿Una zoonosis reemergente? Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 23 (2): 583: 594.

ALCAIDE, F.; MORENO, J.; GONZALEZ, J.; PALACIOS, J.J. 2005. Micobacterias. In: Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9° Ed. 39 p.

AMENI, G; VORDERMEIER, M.; ABRAHAM, A.; YOUNG, D.B.; HEWINSON, R.G. 2010. Field Evaluation of the Efficacy of the *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin against Bovine Tuberculosis in Neonatal Calves in Ethiopia. Clinical and Vaccine Immunology. 17 (10): 1533-1538.

BROOKS, G.F.; CARROL, K.C. 2011. Micobacterias. In: Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25° edición. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. D.F. México. pp. 289-300.

CASAL, C.; BEZOS, J.; DÍEZ-GUERRIER, A.; ÁLVAREZ, J.; ROMERO, B.; DE JUAN, L.; RODRIGUEZ – CAMPOS, S.; VORDERMEIER, M.; WHELAND, A.; HEWINSON, R.J.; MATEOS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; ARANAZ, A. 2012. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. Preventive Veterinary Medicine. 105:149– 154.

CHAMBER, M.A. 2009. Review of the diagnosis and study of tuberculosis in non-bovine wildlife species using immunology methods. Transboundary and Emerging Disease. 56: 215–227.

CONLAN, A.J.; POLLOCK, E.; MCKINLEY, T. J.; MITCHELL, A.P.; JONES, G.J.; VORDERMEIER, M.; WOOD, J.L. 2015. Potential Benefits of Cattle Vaccination as a Supplementary Control for Bovine Tuberculosis. PLOS Computational Biology. 11 (2): e1004038.

DE KANTOR, I.N. 2007. Micobacterias. In: Stanchi, N.O. Microbiología Veterinaria. Ed. Inter Medica. Buenos Aires, Argentina. pp. 300-306.

DORRONSORO, I.; y TORROBA, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis
Microbiology of tuberculosis. Anales del sistema sanitario de Navarra; 30: 2: 67-85.

EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Animal Health and Welfare.
2013. Scientific opinión on field trials for bovine tuberculosis vaccination. European
Food Safety Authority (EFSA) Journal. 11(12):3475.

FULTON, R. W.; ROSENQUIST, B. D. 1976. *In vitro* interferon production by bovine
tissue: effects of hydrocortisone. American Journal Veterinary Research. 37: 1493-
1495.

HAN, X.Y. 2016. Mycobacteria. In:Truant, A.L. Manual of Commercial Methods in
Clinical Microbiology. 2° edition. Ed. Wiley Blackwell. New Jersey, USA. pp. 273-
282.

HANLEY, J.A.; MCNEIL, B.J. 1982. The meaning and use of the area under a
Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve. Radiology. 143: 29-36.

HINES, N.; PAYEUR, J.B.; HOFFMAN, J. 2006. Comparison of the recovery of
Mycobacterium bovis isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460
system, and Middlebrock 7h10 and 7h11 solid media. Journal of Veterinary
Diagnostic Investigation. 18: 243-250.

HUGHES, H. D.; CARROLL, J. A.; SANCHEZ, N. C.; RICHESON, J. T. 2013.
Natural variation in the stress and acute phase responses of cattle. Innate Immunity.
20 (8): 888-896.

**KONEMAN, E.W., S.D. ALLEN, W.M. JANDA, P.C. SCHRECKENBERGER, AND
W.C. WINN.** 2006. Mycobacteries. Color Atlas and Textbook of Diagnostic
Microbiology, 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. pp. 1016-1075.

LÓPEZ DE ULLIBARRI, G.I.; PITA FERNÁNDEZ, S. 1999. Medidas de
concordancia: el índice Kappa. Cuadernos de Atención Primaria. 6: 169-171.

**MACHUGH, D.E.; GORMLEY, E.; PARK, S.D.; BROWNE, J.A.;
TARAKTSOGLU, M.; O'FARRELLY, C.; MEADE, K.G.** 2009. Gene Expression

Profiling of the Host Response to *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 56: 204–214.

MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. 2013. *Mycobacterium* species. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. 2° edition. Ed. Elsevier. pp. 161-175.

MIDDLEBROOK O.; COHN, A.L.L. 1958. Bacteriology of tuberculosis. Laboratory Methods. *American Journal Public Health*. 48:844-853.

OLSEN, I.; BARLETTA, R.G.; THOEN, C.O. 2010. *Mycobacterium*. In: Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4° edition. Ed. Blakwell Publishing. Iowa, USA. pp. 113-126.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 2012. World Organization for Animal Health. Principle and Method of Validation of Diagnostic assay for infectious disease. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animal 2018*. Capítulo 1.1.6. [en línea] < <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> > [consulta: 20-09-2018].

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. 2009. World Organization for Animal Health. Bovine Tuberculosis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animal 2018*. Capítulo 2.4.6. [en línea] < <http://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> > [consulta: 20-09-2018].

PATIÑO, A. 2015. Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de *Mycobacterium bovis* en Chile. Tesis para optar al Grado Académico de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago, Chile. U. de Chile, FAVET. 59 p.

POLLOCK, J.M.; NEILL, S.D. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Veterinary Journal*. 163: 115-27.

POLLOCK, J.M., MCNAIR, J., WELSH, M.D., GIRVIN, R.M., KENNEDY, H.E., MACKIE, D.P., NEILL, S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81: 103–107.

PYM, A.S.; BRODIN, P.; MAJLESSI, L.; BROSCHE, R.; DEMANGEL, C.; WILLIAMS, A.; GRIFFITHS, K.E.; MARCHAL, G.; LECLERC, C.; COLE, S.T.

2003. Recombinant BCG Exporting ESAT-6 Confers Enhanced Protection Against Tuberculosis. *Nature Medicine* 9 (5): 533-9.

QUEZADA, N. 2011. Comparación de dos Secuencias Genómicas como Biomarcadores para Diagnóstico Molecular de *Mycobacterium bovis*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. de Chile, FAVET. 51 p.

REYES, P. 2014. Estimación del Riesgo de Tuberculosis Bovina en Predios Lecheros Habilitados Para Adscribirse a la Compartimentación en el Centro y Sur de Chile. Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. U. de Chile, FAVET. 84 p.

RYAN, K.J.; DREW, W.L. 2011. Micobacterias. In: Sherris. *Microbiología Médica*. 5° edición. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. D.F. México. pp. 374-386.

SAG (SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO). 2016. Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina. Norma Técnica 2016-2017. [en línea] https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/nt_tb-dic2016.pdf [consulta: 01-06-2018].

STRAIN, A.J.; MCNAIR, J.; MCDOWELL, S.W.J. 2011. Bovine tuberculosis: A review of diagnostic test for *M. bovis* infection in cattle. Bacteriology Branch Veterinary Sciences Division Agri-Food and Biosciences Institute. 45 pp.

SWETS, J.A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 240: 1.285-1.293.

TRAUTWEIN, G. 2005. Tuberculosis. In: Dirksen, G.; Gründer.; Stöber, M. *Medicina Interna y Cirugía del Bovino*. Vol. 2. 4° edición. Ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina. pp. 1110-1118.

VANDERKLOK, M.S. 2010. Tuberculosis Bovina. In: Smith, B.P. *Medicina Interna de Grandes Animales*. 4° edición. Ed. Elsevier. Barcelona, España. pp. 661-664.

VORDERMEIER, M.; GORDON, V.S.; HEWINSON, R.G. 2011. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. *Veterinary Microbiology*. 151: 8–13.

VORDERMEIER, M.; JONES, G.J.; BUDDLE, M.B.; HEWINSON, R.J.; VILLARREAL-RAMOS, B.; 2016a. Bovine Tuberculosis in Cattle Vaccine, DIVA Tests, and Host Biomarker Discovery. *Annual Review of Animal Biosciences*. 4:87–109.

VORDERMEIER, M.; JONES, G.J.; BUDDLE, B.M.; HEWINSON, R.G. 2016b. Development of immune diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 181: 10–14.