

## Estandarización de la tuberculina bovina en el ganado

### Standardization of bovine tuberculin in cattle

Bernardelli, Amelia; Martino, Fernando; Reynalds, Victoria; Martino, Carlos; Rui, Javier; Briggiler, Augusto; Baima, Andrés; Costamagna, Pablo; Buraschi, Pablo; Tonini, Florencia; Martino, Tomás; Villosio, Luciano; Miotti, Camila; Signorini, Marcelo

 **Amelia Bernardelli** amelia.bernardelli-external@ceva.com

Ceva Salud Animal, Argentina

**Fernando Martino**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Victoria Reynalds**

Ceva Salud Animal, Argentina

**Carlos Martino**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Javier Rui**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Augusto Briggiler**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Andrés Baima**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Pablo Costamagna**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Pablo Buraschi**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Florencia Tonini**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Tomás Martino**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

**Luciano Villosio**

Estudio Veterinario A.V.I.S., Argentina

 **Camila Miotti**

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA – CONICET), Argentina

 **Marcelo Signorini**

Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (INTA – CONICET), Argentina

**Ab intus FAV-UNRC**

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

ISSN-e: 2618-2734

Periodicidad: Semestral

vol. 6, núm. 12, 2023

abintus@ayv.unrc.edu.ar

**Resumen:** La tuberculosis bovina es una zoonosis bacteriana crónica infecciosa producida por el *Mycobacterium bovis*. La infección en el animal vivo se diagnostica mediante la reacción de hipersensibilidad retardada mediante la inoculación intradérmica del PPD de Tuberculina Bovina. La evaluación continua de las tuberculinas PPD Bovina y Aviar involucradas en el diagnóstico es esencial para mantener la eficacia y asegurar el sostenimiento a los estándares requeridos. El control de laboratorio de la potencia biológica del PPD Bovino se realiza en cobayas sensibilizadas, aunque se recomienda complementar estos controles con ensayos realizados en bovinos enfermos de tuberculosis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencia biológica del PPD Bovino aplicado en bovinos con tuberculosis adquirida naturalmente. Se analizaron tres series de tuberculinas PPD Bovina de Ceva Salud Animal en comparación con el estándar de referencia en un diseño de cuadrado latino para nueve bovinos tuberculosos y con ocho sitios de inoculación en ambos lados de la tabla del cuello del animal. Fueron aplicadas en las dosis de fabricación y diluidas 1/5 según protocolo de trabajo, registrándose las respuestas en el espesor de la piel 72 h post aplicación. Las reacciones generadas por las series de PPD Bovina de Ceva fueron superiores a las producidas por la PPD estándar. Los valores de la potencia de las tuberculinas se mantuvieron luego de 13, 14 y 15 meses de aprobadas, por lo cual se concluye la manifiesta estabilidad del formulado y, por ende, la calidad de este reactivo diagnóstico comercial de la tuberculosis animal.

**Palabras clave:** Control de calidad, tuberculosis bovina, PPD Bovino, potencia, estabilidad, Argentina.

**Abstract:** Bovine tuberculosis is a chronic infectious bacterial disease produced by *Mycobacterium bovis*. Infection in a live animal is diagnosed by a hypersensitivity reaction delayed by intradermal immunization of bovine PPD. Laboratory control of the biological potency of Bovine PPD is carried out on nine guinea pigs sensitized with the homologous strain. World Health Organization (WHO) Technical Report Series Protocol N°384 recommends complementing these controls with tests performed on sick bovines. The objective of this study was to evaluate the biological potency and stability of PPD applied in bovines with naturally acquired tuberculosis under the conditions in which

Recepción: 02 Agosto 2023  
Aprobación: 11 Diciembre 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/820/8204548010/>

DOI: <https://doi.org/10.2581/zenodo.10403297>

**Financiamiento**

Fuente: Ceva

Autor de correspondencia: [amelia.bernardelli-external@ceva.com](mailto:amelia.bernardelli-external@ceva.com)

the reagent will be used. Three series of Bovine PPD tuberculin from Ceva Animal Health were analyzed in comparison with the reference standard (using a Latin square design) for nine naturally tuberculous bovines and on eight inoculations sites on both sides of the animal's neck. They were applied in commercial doses and 1/5 dilutions, registering the skin thickness reactions 72 h post-inoculation. The reactions produced by the Ceva Bovine PPD series were higher than those produced by the standard PPD. The tuberculin potency and stability values were maintained for 13, 14, and 15 months after approval, thus concluding the stability and potency of the formulation and quality of this commercial diagnostic reagent for animal tuberculosis.

**Keywords:** Quality control, tuberculosis bovine, tuberculin PPD, potency, stability, Argentina.

La Tuberculosis bovina es una enfermedad zoonótica, considerada de riesgo profesional, que puede afectar a veterinarios (Molineri *et al.*, 2013), trabajadores rurales, de la industria frigorífica y tamberos (Haagsma *et al.*, 1981). Además, origina importantes pérdidas en la producción animal por el descarte de los bovinos reaccionantes positivos y por los decomisos que se producen a partir de la observación en faena de lesiones tuberculosas (Haagsma *et al.*, 1981). La respuesta inmune a la infección por parte de *Mycobacterium bovis*, depende de la activación de una reacción mediada por células, produciendo como resultado la formación de granulomas nodulares denominados tubérculos, observados en los ganglios linfáticos, bronquiales, mediastínicos, craneales y portales (Bakker y Good, 2018). Esta respuesta intenta focalizar la infección y limitar la enfermedad. No obstante, cuando el animal padece eventos estresantes, especialmente por deficiente alimentación, los bacilos se liberan y originan lesiones visibles y/o ocultas de forma diseminada (Bakker y Good, 2018). La infección en el animal vivo se diagnostica mediante la reacción de hipersensibilidad retardada. Esta prueba es el método estándar, mundialmente empleado en la comercialización de bovinos y consiste en la inoculación intradérmica del derivado proteico purificado (PPD) de tuberculina bovina en la zona anocaudal o en la tabla del cuello. Luego de 72 h se observa la aparición de pápulas, eritema e induración y se mide el grosor de la piel del animal con calibre (Bakker y Good, 2018). En la República Argentina, se aplica el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, por Resolución del Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA) N°128/2012, vigente en el país para tambos, genética y para todos los establecimientos donde se observen bovinos con lesiones compatibles con tuberculosis en la faena (SENASA, 2012). La evaluación continua de las tuberculinas PPD bovina y aviar involucradas en el Programa Nacional de control/ erradicación de la tuberculosis animal, es esencial para mantener la eficacia y asegurar que se alcancen los estándares de eficiencia más altos posibles (SENASA, 2012). El diagnóstico de la tuberculosis animal está estrechamente vinculado a la concentración proteica y por ende a la potencia biológica de la PPD a utilizar. El control de cada serie de tuberculina PPD bovina se realiza rutinariamente en los laboratorios de producción y en el SENASA. La potencia esperada para este reactivo debe rondar entre el 66% y 150% de la

potencia con respecto al Estándar internacional de Weybridge. Si la potencia disminuye, se verá afectada la sensibilidad de la técnica diagnóstica y, por ende, el conocimiento real del estado sanitario del rodeo (European Pharmacopoeia, 2008). La potencia de cada serie de tuberculinas se determina por métodos biológicos en cobayas sensibilizadas con la cepa homóloga (Ciuca *et al.*, 2015). La potencia de una tuberculina es la medida de la actividad biológica en animales previamente sensibilizados con un organismo específico y valorada de acuerdo con patrones y un estándar internacional establecido, la cual debe encontrarse entre el 66 y el 150% con respecto al estándar (Bakker *et al.*, 2006; European Pharmacopoeia, 2008). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA, 2018) y la Unión Europea (World Health Organization (1987) recomiendan, además, la realización de la prueba de potencia en el animal de destino y en las condiciones en que ha de realizarse en los establecimientos. Ello implica que las tuberculinas bovinas deberían controlarse periódicamente en el ganado tuberculoso infectado en forma natural. Esta actividad es compleja de realizar en la práctica, por lo cual habitualmente las pruebas de potencia de las tuberculinas en control se realizan a nivel de laboratorio en cobayos hembras sensibilizados con la cepa homóloga *Mycobacterium bovis* AN5 (European Pharmacopoeia, 2008). A pesar de ello y con el fin de cumplir con los requisitos de control de calidad, se aconseja la realización periódica de la prueba de potencia, en el campo, para asegurar la actividad del inmunógeno en el animal de destino (Haagsma *et al.*, 1981). El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencia biológica y la estabilidad (mantenimiento de las características del formulado durante 24 meses, conservado entre 4 y 8°C) del PPD Bovino aplicado en la especie animal de interés (bovinos) con tuberculosis adquirida naturalmente bajo las condiciones en que se usará el reactivo.

El ensayo se realizó entre el 20 y 23 de abril de 2022. Se utilizaron nueve bovinos tuberculosos naturalmente infectados, pertenecientes a un tambo sanitario del Distrito Monte Oscuridad, departamento San Cristóbal, provincia de Santa Fe, los cuales fueron previamente diagnosticados con sucesivas pruebas tuberculínicas realizadas con series de PPD Bovino del Laboratorio Ceva Salud Animal. En el diseño del ensayo de estandarización en el ganado, no se utilizaron animales negativos a la tuberculosis, ya que el motivo del trabajo no fue realizar un diagnóstico de tuberculosis a nivel de rodeo sino determinar la estabilidad a través del tiempo de las series de tuberculinas PPD bovina. Para este fin se seleccionaron animales tuberculosos que se expresaran apropiadamente como reaccionantes positivos a las lecturas a las 72 horas post inoculación. Las tuberculinas evaluadas fueron producidas por Ceva Salud Animal y correspondieron a las series N°001/21, 002/21 y 003/21. Por su parte, el estándar utilizado fue la serie N°90 SENASA-Dilab. La dosis a inocular de manera intradérmica fue de 0,1 ml en ambos lados de la tabla del cuello de cada animal. Por lo tanto, se probaron ocho preparaciones de tuberculina, cuatro sin diluir y cuatro diluidas (empleando el diluyente de tuberculina PPD bovina) que se inocularon en cada animal en cuatro sitios diferentes (Imagen 1A) con una distancia entre inyección de 10 a 12 cm. Posteriormente, se procedió a medir el espesor de la piel en los diferentes sitios de inoculación empleando un calibre digital. Aunque el protocolo indica que deben emplearse ocho animales, en este estudio se evaluaron nueve bovinos, contemplando la eventualidad de que surgieran problemas en la realización del

trabajo en el campo y faltaran las repuestas cuantitativas correspondientes para rotar las ocho inyecciones. Este diseño experimental permitió evaluar las PPD Bovino en sus dos concentraciones y en diferentes sitios de la tabla del cuello, teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades en cada uno de los sitios de inyección en el bovino (Duignan *et al.*, 2019). Las diluciones se realizaron para concretar el ensayo según lo indicado en el Manual de la OMSA sobre Animales Terrestres. Al trabajar con menores cantidades de proteína al diluir el formulado, se expresará una mayor dispersión en las lecturas. Se reitera que el ensayo no es una tuberculinización habitual sino un trabajo especial para comparar la estabilidad de las series comerciales de tuberculina PPD bovina con el estándar del país a lo largo del tiempo (Maes *et al.*, 2011). No hay ninguna duda acerca de que las tuberculinas PPD no se diluyen para su uso diagnóstico ya que es un reactivo biológico estéril que se utiliza de acuerdo con el prospecto de producción del fabricante. La ubicación de los puntos de inoculación de las tuberculinas PPD se distribuyó de manera aleatoria, previamente establecida en las hojas del trabajo que se confeccionaron. Transcurridas 72 h de la inoculación se repitieron las mediciones del espesor cutáneo con calibre digital. Adicionalmente, se procedió a la observación de las reacciones (pápulas e induración). Todo el procedimiento del ensayo, la medición de la piel inicial y posterior administración de las tuberculinas en cada animal incluido en el trabajo fueron realizados por el mismo Médico Veterinario. Inicialmente, se realizó la comprobación de los supuestos de Normalidad (Kolmogorov-Smimov y Shapiro-Wilk) y Homocedasticidad (Test de Levene) para la variable de la respuesta espesor de la piel en la tabla del cuello expresada en milímetros (Daniels, 1991). Comprobado los supuestos, se realizó un ANOVA, considerando como efectos principales el punto de inoculación y tuberculina empleada. El efecto del animal se consideró como un factor aleatorio.

Las lecturas de las pápulas con calibre digital (Imagen 1B) correspondientes a los animales reaccionantes positivos presentaron valores desde 7,5 mm hasta 20,2 mm. La tuberculina PPD Bovina estándar serie N° 90 SENASA-Dilab presentó los menores espesores en la piel ( $P < 0,001$ ). Los animales incluidos en el estudio ofrecieron respuestas diferentes a las aplicaciones de las tuberculinas. Los bovinos 2 y 9 presentaron las mayores respuestas medias a las tuberculinas independientemente de la serie inoculada y concentración de la PPD, mientras que los bovinos 3 y 6 mostraron los menores valores promedios de espesor final de la piel ( $P < 0,001$ ) (Figura 1). Cuando se analizaron las respuestas obtenidas para cada uno de los tratamientos evaluados, se observó que las PPD Bovina Series 001/21, 002/21 y 003/21 sin diluir fueron las que presentaron lecturas finales más elevadas, aunque con mayor variabilidad, mientras que las diluidas mostraron valores de respuestas intermedias, siendo la PPD bovina Serie N° 90 diluida (SENASA-Dilab) la que presentó lecturas finales promedio más bajas (Figura 2). La PPD bovina N°90 (SENASA-Dilab) presentó los menores valores de respuesta ( $P < 0,001$ ) al compararlas con las demás series de tuberculinas evaluadas sin considerar si las mismas se aplicaron diluidas o no (Figura 3).

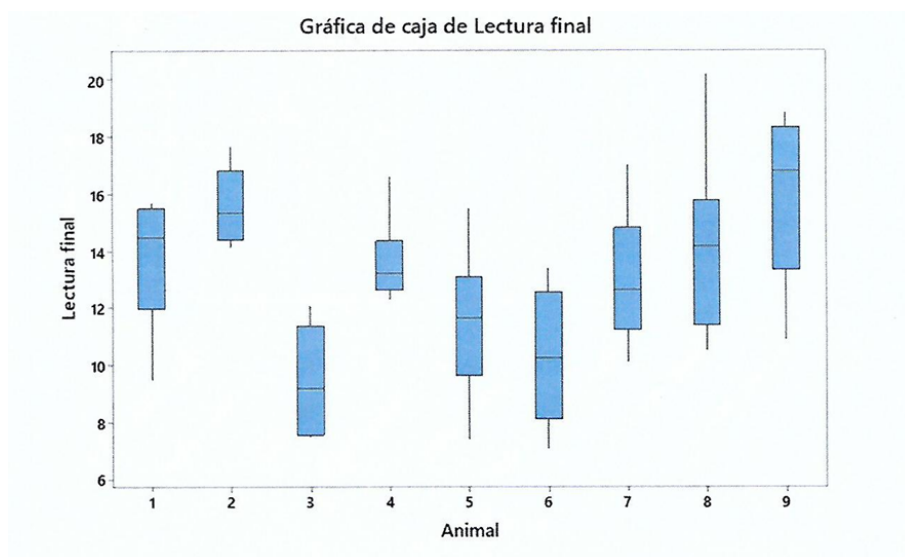
La calidad del formulado PPD Bovino deberá mantenerse a lo largo de su utilización en el diagnóstico durante el período de dos años que es el vencimiento del reactivo a partir del último control oficial realizado por el SENASA (SENASA, 2012). No obstante, se ha observado que la potencia biológica podría disminuir conforme pasa el tiempo. Esta es una de las razones

por las que se recomienda realizar periódicamente un plan de inoculaciones del reactivo en los bovinos (Goodchild *et al.*, 2015; Duignan *et al.*, 2012; Good *et al.*, 2011; Bakker *et al.*, 2006). La realización de controles de potencia de PPD en bovinos implica las dificultades de trabajar en el campo, de proveerse de animales certificados realmente tuberculosos por pruebas previas que incluyen la realización de necropsias a los convivientes del rodeo seleccionado, aislamiento del *Mycobacterium bovis* en medios de cultivo especiales para micobacterias, pruebas diagnósticas de inmunidad mediada por células con tuberculina PPD bovina, por lo cual se suelen utilizar bovinos provenientes de tambos sanitarios (OMSA, 2018; Yang *et al.*, 2012). Por estas razones este tipo de controles de potencia de los reactivos empleados en el diagnóstico de la tuberculosis bovina no se realizan con la frecuencia deseada tanto por los laboratorios comerciales como los de referencia en Latinoamérica (SENASA, 2012). La certeza en los controles que certifiquen y reconozcan la estabilidad de la potencia de las tuberculinas es un requisito que algunos laboratorios se autoimponen. Esta actividad no es acompañada por la actitud de los laboratorios de PPD Bovino que consideran que el control en cobayas sensibilizadas en el momento del envasado de la serie es suficiente para garantizar la potencia del reactivo (OMSA, 2018). Las tuberculinas PPD bovina series N°001/21, 002/21 y 003/21 de Ceva Salud Animal aplicadas a su dosis comercial o diluidas 1/5 (Según protocolo de trabajo) registraron respuestas por parte de los bovinos (expresadas en el espesor de la piel 72 h pos aplicación) que fueron, en todos los casos, superior a la registrada por la serie de referencia PPD Bovino N°90 SENASA. Este estudio no pretendió evaluar si se trataban de tuberculinas mejores o peores con referencia al estándar, sino que se confirmó la estabilidad a través del tiempo y la potencia del PPD comercial con respecto al estándar oficial.

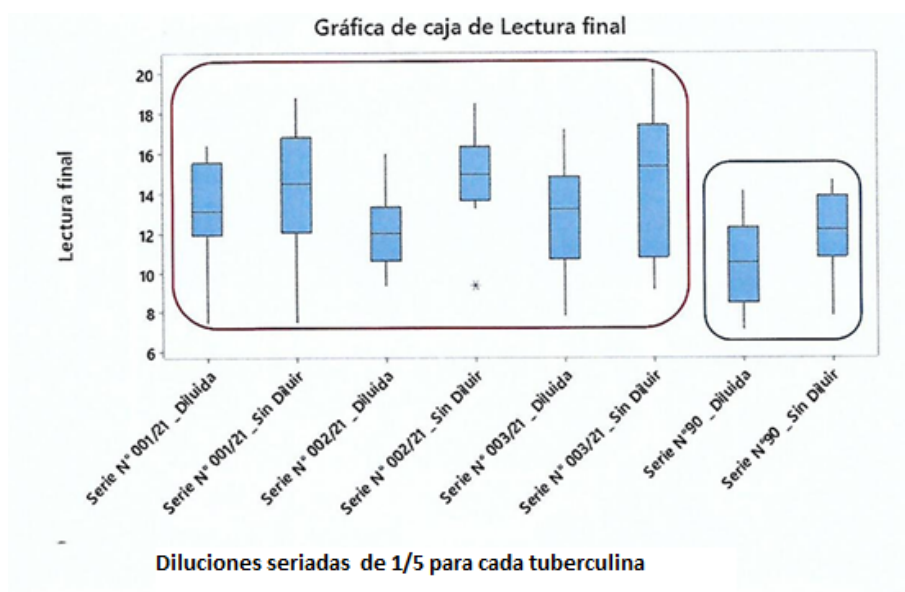


**Imagen 1**

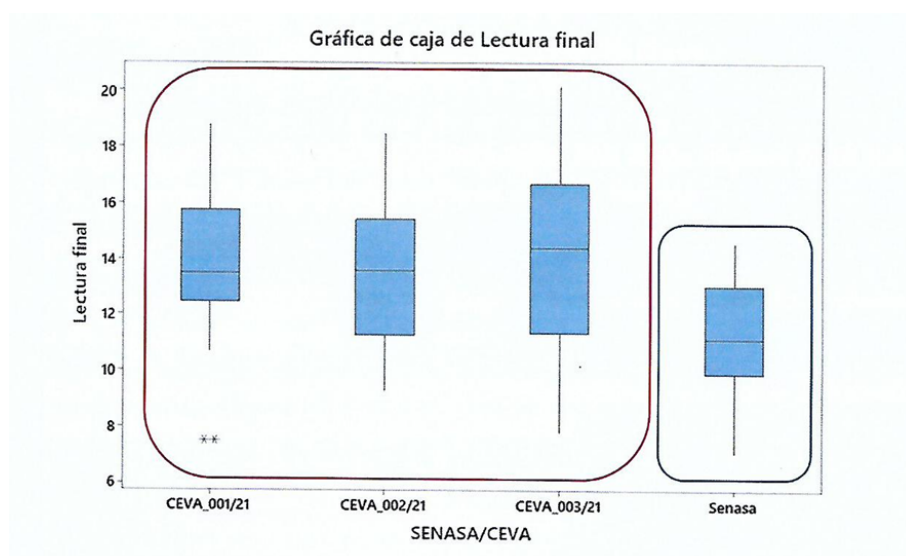
Sitios de inoculación de las PPD bovino (A) y lecturas de las pruebas tuberculínicas intradérmicas con calibre digital en la tabla del cuello de bovinos transcurridas 72 h de la inoculación en la tabla del cuello de los animales (B).



**Figura 1**  
Variabilidad en las respuestas a las tuberculinas según el bovino tratado



**Figura 2**  
Variabilidad en las respuestas a las tuberculinas aplicadas diluidas y sin diluir



**Figura 3**  
Variabilidad en las respuestas según las series de las tuberculinas utilizadas

## Agradecimientos

Ceva

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bakker, D. Good, M. (2018) Quality control of Purified Protein Derivative tuberculins: essential for effective bovine tuberculosis control and eradication programmes. In International Symposium of Veterinary Epidemiology and Economics. Chiang Mai.
- Bakker, D, Eger, A, MacNair, J, Riepema, J.; Willense, P.T.J.; Haagsma, J.; van Ziderveld, F.G.; Pollock, J.M. (2006) Comparison of commercially available PPD 's: practical considerations for diagnosis and control of bovine tuberculosis. CIDC-LELYSTAD, Department of Agriculture Rural Development,1.
- Ciucu, V, Burghilea, Danes, M ,Safta, V,V, Casu, O, Niculiciolu, R, (2015) Mathematical modeling for determining the potency of bovine tuberculin purified protein derivative (P.P.D.). *Medicamental Veterinar/Veterinary Drug*, 9 (2): 71-75.
- Daniels, W, (1991) Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la Salud. Ed. Limusa Noriega, Ciudad de México (México). ISBN 0-471-09753-5.
- Duignan, A, Good, M, More, S,J, (2012) Quality control in the national bovine tuberculosis eradication programme in Ireland. *Review Science Technology*, 31:845-60. doi:10.20506/rs/31.3.2166, 845-860.
- Duignan, A, Kenny, K, Bakker, D, Good, M.(2019) Tuberculin PPD Potency Assay in Naturally Infected Tuberculous Cattle as a Quality Control Measure in the Irish Bovine Tuberculous Erradication Programme. *Frontiers in Veterinary Science*, October,6 (326). doi=10.3389/fvets.2019.00328.,11-12.
- European Pharmacopoeia 9.0. (2008) Tuberculin Purified Protein Derivative, Bovine 01/2008:0536,3863-3864.

- Good, M, Clegg, T.A, Costello, E, Ore, S.J. (2011) The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculosis test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *The Veterinary Journal* 190:e60-5. doi:10.1016/j.tvjl.2011.01.005.
- Goodchild, A,V,Downs, S,H, Upton, P, Wood, J,L,N, de la Rua-Domenech, R. (2015) Specificity of the comparative tests for bovine tuberculosis in Great Britain. *Veterinary Record*, 177:258. doi:10.1136/vr.102961.
- Haagsma, J, O'Reilly, L,M, Dobbelaer, R, Murphy, T,M, (1982) A comparison of the relative potency of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle. *Journal Biological Standard*, 10:273-84.
- Maes, M., Giménez, J,F, D'Alessandro, A, de Waard, J,H, (2011) The stability of human bovine and avian tuberculin purified protein derivative (PPD) *The Journal of Infection Developing Countries*, 58119:781-785.
- Molineri, A.I., Signorini, M.L., Pérez, L., Tarabla, H.D. (2013) Zoonoses in rural veterinarians in the central region of Argentina. *Australian Journal of Rural Health*, 21(5): 285-290.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) Ex(OIE). (2018) Chapter 2.4.6. Bovine tuberculosis. In: *Manual of Diagnostic tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (p.1-17. Available on line at (<http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/acces-online> (accessed June 8, 2019 ) 1-17.
- SENASA, Programa Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, Resolución N°128/2012.
- World Health Organization (WHO). (1987) Requirements for Biological Substances N° 16. Annex 1: *Requirements for Tuberculins*. *Technical Report Series* N° 745, WHO, Geneva, Switzerland,31-59.
- Yang, H. Kruh-García, N,A, Dobos, K,M, (2012) Purified Protein Derivatives of Tuberculin-Past, Present, and Future. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 66 (3):273-280. doi:101111/j.1574-695X.2012.01002x.

## Notas de autor

amelia.bernardelli-external@ceva.com