

AHOH-175 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 225-226, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc084>

Experimental use of mycobacterial antigens in tuberculin skin test on water buffalo

**Alessandra Martucciello¹, Federica Signorelli²,
Piera Mazzone³, Francesco Grandoni²,
Giovanna Cappelli^{1*}, Lucia Boccia⁴, Giuseppe Parente⁴,
Monica Cagiola³, Maria Beatrice Boniotti⁵,
Esterina De Carlo¹, Francesco Napolitano²,
Giorgio Galiero¹**

¹ National Reference Centre for Hygiene and Technology of Breeding and Buffalo Production, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Salerno, Italy.

² Council for Agricultural Research and Economics - Animal Production and Aquaculture, Monterotondo, Italy.

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italy.

⁴ Azienda Sanitaria Locale Salerno, Salerno, Italy.

⁵ National Reference Centre for Bovine Tuberculosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy.

*Corresponding author: Giovanna Cappelli
(giovanna.cappelli@izsmportici.it).

ABSTRACT

In Italy, bovine tuberculosis (TB) control in the water buffalo population is mainly carried out using the tuberculin skin test (TST). The test measures the increase in skin thickness 72 hours (h) after the intradermal injection of mycobacterial purified protein derivatives (PPD). The TST can involve the single intradermal test with bovine PPD (PPDB), or the comparative test adding a second injection with avian tuberculin (PPDA), using the couple of PPDs reduces false positives caused by non-tuberculosis mycobacteria. This pilot study aimed to evaluate the potential use of PPDB, PPDA, along with 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6), 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10), and Early Secretory Proteins (ESP) in the TST, in healthy and naturally TB infected buffaloes. Twenty-one buffaloes, gamma-interferon (IFN- γ) test positive, from a TB-outbreak herd and 11 buffaloes from a TB-free herd were selected. All subjects were also submitted to the IFN- γ test using the same antigens (Ag) as the TST to verify the cellular response *in vitro* and to exclude anaergic animals that did not respond to *in vitro* stimulation with the mitogen. The TST was performed according to the TB Italian National eradication program, and to Reg. EU 2020/689. Eight intradermal injection sites were used on each animal shoulder (4 on the right and 4 on the left side). Three concentrations of the ESAT6-CFP10 protein cocktail (10, 20 and 30 μ g) and two of ESP (50 and 100 μ g) were inoculated. PPDB and PPDA were always included in the TST, along with PBS as negative control. Skin reactions were measured with

Uso experimental de antígenos micobacterianos en la prueba cutánea de tuberculina en búfalos de agua

**Alessandra Martucciello¹, Federica Signorelli²,
Piera Mazzone³, Francesco Grandoni²,
Giovanna Cappelli^{1*}, Lucia Boccia⁴, Giuseppe Parente⁴,
Monica Cagiola³, Maria Beatrice Boniotti⁵,
Esterina De Carlo¹, Francesco Napolitano²,
Giorgio Galiero¹**

¹ Centro Nacional de Referencia para la Higiene y Tecnología de la Cría y Producción del Búfalo, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Salerno, Italia.

² Consejo de Investigación y Economía Agrícola - Producción Animal y Acuicultura, Monterotondo, Italia.

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Perugia, Italia.

⁴ Azienda Sanitaria Locale Salerno, Salerno, Italia.

⁵ Centro Nacional de Referencia para la Tuberculosis Bovina, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia.

*Autor de correspondencia: Giovanna Cappelli
(giovanna.cappelli@izsmportici.it).

RESUMEN

En Italia, el control de la tuberculosis bovina (TB) en la población de búfalos de agua se lleva a cabo principalmente mediante la prueba cutánea de la tuberculina (PT). La prueba mide el aumento del grosor de la piel 72 horas (h) después de la inyección intradérmica de derivados proteicos purificados (PPD) de micobacterias. La PT puede implicar la prueba intradérmica única con PPD bovino (PPDB), o la prueba comparativa añadiendo una segunda inyección con tuberculina aviar (PPDA). El uso de un par de PPD reduce los falsos positivos causados por micobacterias no tuberculosas. Este estudio piloto tuvo como objetivo evaluar el uso potencial de PPDB, PPDA, junto con un objetivo antigénico secretorio temprano de 6 kDa (ESAT-6), una proteína filtrada de cultivo de 10 kDa (CFP-10) y proteínas secretoras tempranas (ESP) en la TST, en búfalos sanos y naturalmente infectados con tuberculosis. Se seleccionaron veintinueve búfalos con resultados positivos para interferón gamma (IFN- γ) de un rebaño con brote de tuberculosis y 11 búfalos de un rebaño libre de tuberculosis. Todos los sujetos también fueron sometidos a la prueba de IFN- γ utilizando los mismos antígenos (Ag) que la TST para verificar la respuesta celular *in vitro* y excluir animales anaérgicos que no respondieron a la estimulación *in vitro* con el mitógeno. La PT se realizó según el programa nacional italiano de erradicación de la tuberculosis y el Reg. UE 2020/689. Se utilizaron ocho sitios de inyección intradérmica en cada hombro de animal (4 en el lado

calipers before the test and every 24 h for 4 days. The TST was considered positive in animals with an increase in skin thickness between post and pre-dermal test readings of > 4 mm, doubtful if between 2 and 4 mm, negative <2 mm. Negative subjects also exhibited a skin response to PPDB at 24 and 48 h, but it became completely negative at 72 h, the prescribed reading time. In the positive buffaloes, the kinetics of skin responses showed that the strongest response was to PPDB at 24h, with some subjects becoming doubtful at 72 and 96 h. A peak response was observed at 48 hours to PPDA and to 20 µg of the ESAT6-CFP10 protein cocktail, followed by a decrease. The response to ESP-100 µg remained high at 24 and 48 h and then decreased, remaining positive at 72 h. ESP showed the best performance with higher reactivity in positive animals and no reactivity in negative animals at 72 h. Therefore, ESP could be an excellent candidate for further extensive studies in the buffalo species to improve TST Sensitivity and Specificity.

Keywords: water buffalo, tuberculosis, diagnosis, tuberculin skin test.

Funding: This work was supported by RC IZSME 09/19 Financed by the Italian Ministry of Health.

derecho y 4 en el lado izquierdo). Se inocularon tres concentraciones del cóctel proteico ESAT6-CFP10 (10, 20 y 30 µg) y dos de ESP (50 y 100 µg). PPDB y PPDA siempre se incluyeron en la TST, junto con PBS como control negativo. Las reacciones cutáneas se midieron con calibradores antes de la prueba y cada 24 h durante 4 días. La PT se consideró positiva en animales con un aumento del espesor de la piel entre las lecturas de la prueba post y predérmica de > 4 mm, dudoso si entre 2 y 4 mm, negativo < 2 mm. Los sujetos negativos también mostraron una respuesta cutánea al PPDB a las 24 y 48 h, pero se volvió completamente negativa a las 72 h, el tiempo de lectura prescrito. En los búfalos positivos, la cinética de las respuestas de la piel mostró que la respuesta más fuerte fue al PPDB a las 24 h, y algunos sujetos se volvieron dudosos a las 72 y 96 h. Se observó una respuesta máxima a las 48 horas con PPDA y con 20 µg del cóctel de proteínas ESAT6-CFP10, seguida de una disminución. La respuesta a ESP-100 µg se mantuvo alta a las 24 y 48 h y luego disminuyó, permaneciendo positiva a las 72 h. ESP mostró el mejor desempeño con mayor reactividad en animales positivos y ninguna reactividad en animales negativos a las 72 h. Por lo tanto, ESP podría ser un excelente candidato para estudios más extensos en la especie de búfalo para mejorar la sensibilidad y especificidad de la TST.

Palabras clave: búfalo de agua, tuberculosis, diagnóstico, prueba cutánea de tuberculina.

Financiamiento: Este trabajo fue apoyado por RC IZSME 09/19 Financiado por el Ministerio de Salud italiano.