

Assessment tuberculin skin test specificity in water buffalo using five different antigens

**Alessandra Martucciello¹, Francesco Napolitano²,
Piera Mazzone³, Francesco Grandoni²,
Maria Beatrice Boniotti⁴, Monica Cagiola³,
Gabriele Di Vuolo^{1*}, Felice Gerardo Giglio⁵,
Francesco Grippa⁵, Giorgio Galiero¹, Federica Signorelli²,
Esterina De Carlo¹**

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 Tuberculosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy, (5) Azienda Sanitaria Locale Salerno, Salerno, Italy.

*Corresponding author: gabriele.divuolo@izsmportici.it

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) control involves "test and cull strategies". The primary diagnostic test is the tuberculin skin test (TST) which requires intradermal inoculation with specific *Mycobacterium bovis* antigens, bovine tuberculin (PPDB) in the single intradermal reaction test (SIT) and avian tuberculin (PPDA) in the comparative intradermal reaction test (SICT). Using other antigens such as 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6), 10 kDa culture filtrate protein (CFP-10) and Early Secretory Proteins (ESP) could increase test specificity. Therefore, this study aims to evaluate the specificity of TST using five different antigens. A total of 100 buffaloes from 3 TB free Italian herds were enrolled. Five intradermal injection sites on the animal's shoulder (three on the right and two on the left side) were used on each animal, with a volume of 0.1 mL for all antigens (ESAT-6 and CFP-10 at 20 µg/mL, ESP at 100 µg/mL, PPDA and PPDB at 100 µg/mL), and PBS as negative control. Skin reactions were measured using calipers. Results were expressed in millimeters as the difference between the two measurements, i.e., before and 72h after the inoculation of tuberculin. The reaction was considered positive if skin thickness increased by ≥ 4 mm, doubtful if >2 and <4 mm, and negative if ≤ 2 mm. All 100 buffaloes were also submitted to the gamma-interferon (IFN- γ) test to confirm TB negativity. Of the 100 negative subjects, 31 gave doubtful SIT results to PPDB while the number of doubtful subjects decreased to 11 with the SICT. The number of doubtful results with ESP stimulation was 26 and with the ESAT-6 and CFP-10 protein cocktail, it was 21. If we introduce the responses to stimulation with ESP and ESAT-

Evaluación de la especificidad de la prueba cutánea de tuberculina en búfalos de agua utilizando cinco antígenos diferentes

**Alessandra Martucciello¹, Francesco Napolitano²,
Piera Mazzone³, Francesco Grandoni²,
Maria Beatrice Boniotti⁴, Monica Cagiola³,
Gabriele Di Vuolo^{1*}, Felice Gerardo Giglio⁵,
Francesco Grippa⁵, Giorgio Galiero¹, Federica Signorelli²,
Esterina De Carlo¹**

¹ Centro Nacional de Referencia para Higiene y Tecnología de la Cría y Producción de Búfalos, 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 Tuberculosis, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia, (5) Azienda Sanitaria Locale Salerno, Salerno, Italia.

*Autor de correspondencia: gabriele.divuolo@izsmportici.it

RESUMEN

El control de la tuberculosis (TB) implica "estrategias de prueba y eliminación". La prueba de diagnóstico primaria es la prueba cutánea de la tuberculina (TST), que requiere la inoculación intradérmica con antígenos específicos de *Mycobacterium bovis*, la tuberculina bovina (PPDB) en la prueba de reacción intradérmica única (SIT) y la tuberculina aviar (PPDA) en la prueba de reacción intradérmica comparativa (SICT). El uso de otros antígenos como prueba antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT-6), proteína filtrada de cultivo de 10 kDa (CFP-10) y proteínas secretoras tempranas (ESP) podría aumentar la especificidad de la prueba. Por tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la especificidad de la TST utilizando cinco antígenos diferentes. Se inscribieron un total de 100 búfalos de 3 rebaños italianos libres de tuberculosis. En cada animal se utilizaron cinco sitios de inyección intradérmica en el hombro del animal (tres en el lado derecho y dos en el lado izquierdo), con un volumen de 0,1 ml para todos los antígenos (ESAT-6 y CFP-10 a 20 µg/ml, ESP a 100 µg/mL, PPDA y PPDB a 100 µg/mL) y PBS como control negativo. Las reacciones cutáneas se midieron utilizando calibradores. Los resultados se expresaron en milímetros como la diferencia entre las dos mediciones, es decir, antes y 72 h después de la inoculación de tuberculina. La reacción se consideró positiva si el espesor de la piel aumentaba ≥ 4 mm, dudosa si > 2 y < 4 mm, y negativa si ≤ 2 mm. Los 100 búfalos también fueron sometidos a la prueba de interferón gamma (IFN- γ) para confirmar la negatividad de la tuberculosis. De los 100 sujetos negativos, 31 dieron resultados dudosos del SIT al

6 and CFP-10 protein cocktail combined with the interpretation of SICT, the 11 doubtful results would be reduced to 5 and 4, respectively. The doubtful outcomes of SIT and SICT found in negative animals with PPDB and PPDA stimulation, could be due to non-specific responses. In buffalo, this non-specificity could be due to atypical mycobacterial infections as well as to the peculiarities of buffalo skin structure compared to bovine skin (e.g., dermis thickness). Regarding ESAT-6 and CFP-10 protein cocktail and ESP, they induced fewer non-specific reactions, and thus, they could be used in SICT in association with traditional PPDs. Due to the IFN- γ test, we excluded the presence of anergic subjects, since all 100 subjects reacted to stimulus with the mitogen. Furthermore, the IFN- γ test in the same animals gave negative results according to the interpretation criteria of the official EU IFN- γ test, even if with slight non-specific reactions, but excluding false-positive results.

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

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

PPDB mientras que el número de sujetos dudosos disminuyó a 11 con el SICT. El número de resultados dudosos con estimulación ESP fue de 26 y con cóctel de proteínas ESAT-6 y CFP-10 fue de 21. Si introducimos las respuestas a la estimulación con ESP y cóctel de proteínas ESAT-6 y CFP-10 combinado con la interpretación de SICT, los 11 resultados dudosos se reducirían a 5 y 4, respectivamente. Los resultados dudosos de SIT y SICT encontrados en animales negativos con estimulación PPDB y PPDA, podrían deberse a respuestas no específicas. En búfalo, esta inespecificidad podría deberse a infecciones micobacterianas atípicas, así como a las peculiaridades de la estructura de la piel del búfalo en comparación con la del bovino (por ejemplo, grosor de la dermis). En cuanto al cóctel de proteínas ESAT-6 y CFP-10 y ESP, indujeron menos reacciones no específicas y, por lo tanto, podrían usarse en SICT en asociación con los PPD tradicionales. Debido a la prueba de IFN- γ excluimos la presencia de sujetos anérgicos, ya que los 100 sujetos reaccionaron al estímulo con el mitógeno. Además, la prueba de IFN- γ en los mismos animales arrojó resultados negativos según los criterios de interpretación de la prueba oficial de IFN- γ de la UE, aunque con ligeras reacciones inespecíficas, pero excluyendo los resultados falsos positivos.

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

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