



Procedimiento de la OMSA para registrar los kits de diagnóstico Resumen de los estudios de validación

Nombre del kit de diagnóstico: BOVIGAM® - Kit de detección de interferón gamma frente a *Mycobacterium bovis* para ganado bovino

Fabricante: Prionics Lelystad B.V.

Número de aprobación por la OMSA: 20150110

Fecha de registro: May 2015

Número de nuevo procedimiento/aprobación: 051319

Fecha de registro de la extensión: May 2023

Enfermedad: Tuberculosis bovina

Agente patógeno: *Mycobacterium bovis* y otras micobacterias del complejo tuberculoso (por ejemplo, *M. caprae*)

Tipo de prueba: ELISA indirecto

Objetivo de la prueba: Detección de la respuesta inmunitaria celular a la infección por *Mycobacterium bovis* y otras micobacterias pertenecientes al complejo tuberculoso a partir del análisis de muestras de sangre total de ganado bovino, búfalos (*Syncerus caffer*), caprinos, búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y, provisionalmente, ovinos, con los siguientes fines:

1. Probar la ausencia histórica de la enfermedad
2. Probar el restablecimiento de la ausencia tras los brotes
3. Certificar la ausencia de infección o de agente patógeno en animales individuales o productos a los efectos del comercio o los desplazamientos
4. Probar la erradicación de la infección de poblaciones definidas
5. Confirmar el diagnóstico en casos sospechosos o clínicos (incluye la confirmación de una prueba de detección positiva)
6. Estimar la prevalencia de la infección para facilitar el análisis de riesgos (estudios/programas de sanidad pecuaria/control de enfermedades)
7. Como prueba auxiliar para la erradicación de la tuberculosis

Especies y muestras: Ganado bovino, búfalos (*Syncerus caffer*), caprinos, búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y provisionalmente, ovinos - prueba de laboratorio *in vitro* con sangre.

Esta prueba se ha validado, además, para la detección de IFN γ en plasma obtenido a partir de muestras de sangre estimuladas de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) presuntamente infectados. En 2021, se propuso solicitar la ampliación del registro de BOVIGAM® - Kit de detección de interferón gamma frente a *Mycobacterium bovis* para ganado bovino, en lo sucesivo BOVIGAM, al búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), registrado en la OMSA (número de aprobación: 20150110).

Este resumen se actualiza para incluir los datos pertinentes obtenidos con muestras de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) con el fin de respaldar las reivindicaciones sobre las características de la prueba de diagnóstico respecto a las directrices de la OMSA.

1. Información sobre el kit

Por favor, consúltese el prospecto del kit, disponible en el apartado de registros de la página web de la OMSA o contactando con el fabricante en:

Enlace a la página web: thermofisher.com

Dirección de correo electrónico: info.nl.prionics@thermofisher.com

2. Resumen de los estudios de validación

Características analíticas

Sensibilidad analítica

BOVIGAM llega a detectar 80 pg/ml de IFN- γ recombinante bovino.

Estimulación de sangre total: La sensibilidad analítica de la parte de estimulación no puede evaluarse, ya que el límite de detección depende de si el animal analizado tiene o no TBb. Se han analizado muestras de sangre total de entre 1,5 ml y 250 μ l y se han considerado adecuadas para el diagnóstico de TB bovina. Se desconoce tanto el efecto del recuento de linfocitos sobre la fiabilidad como el límite de detección. El recuento de linfocitos puede variar entre reses. No se ha establecido el número mínimo necesario para obtener un resultado fiable.

Especificidad analítica

Se intentó detectar IFN- γ , α y β bovinos recombinantes mediante BOVIGAM a concentraciones biológicamente activas de 1, 10 y 1000 ng/ml, respectivamente. BOVIGAM no detectó interferón- α ni interferón - β . La reactividad del derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPDB) y del derivado proteico purificado de *Mycobacterium avium* (PPDA) estimuló muestras de sangre total de reses infectadas con *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedi* o *M. caprae*, que son bacterias del complejo tuberculoso, dan lugar a verdaderos positivos en BOVIGAM y no pueden ser fruto de una reacción cruzada ni falsos positivos.

Datos de repetibilidad:

Datos de repetibilidad intra-ejecución 1 (2015):

Objetivo: Mostrar que el kit ELISA BOVIGAM presenta muy poca variación entre pocillos.

Métodos: La repetibilidad intra-ejecución del kit ELISA BOVIGAM se estimó utilizando 5 concentraciones diferentes de IFN- γ recombinante bovino en 16 réplicas empleando un único lote de kit de diagnóstico (número de lote 633261701). Cada muestra de IFN- γ tenía una concentración de analito dentro del rango operativo de la prueba.

Resultados: La Figura 1 muestra las lecturas de densidad óptica de las 16 réplicas para cada una de las cinco concentraciones de IFN- γ recombinante bovino. Las líneas horizontales y las barras de error representan la media y la desviación estándar, respectivamente. Como se detalla en la Tabla 1, el coeficiente de variación fue inferior al 10% para las cinco muestras.

Conclusiones: El ELISA BOVIGAM muestra una excelente repetibilidad entre pocillos para detectar IFN- γ bovino a diferentes concentraciones en todo el rango operativo del ensayo.

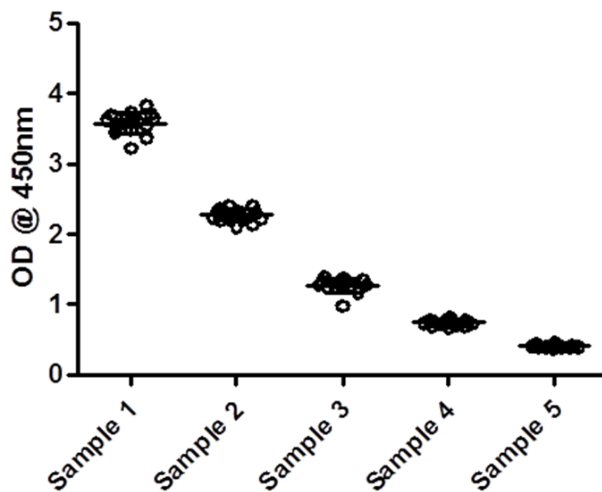
Datos de repetibilidad intra-ejecución 2 (2021):

Objetivo: Mostrar que el kit ELISA BOVIGAM presenta muy poca variación entre pocillos al usar muestras de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*).

Métodos: La repetibilidad se estimó entre 4 muestras de plasma, seleccionadas de un panel de 3 muestras de campo de diferentes animales que cubrían el rango operativo del ensayo, una fuerte, una media y una débil, y luego una muestra de campo negativa; cada muestra se analizó por triplicado: la variación intra-ensayo se evaluó a partir de las tres réplicas de cada muestra analizadas en una sola ejecución de la prueba (un técnico);

Resultados: El experimento se llevó a cabo con muestras estimuladas con tampón fosfato salino (TFS, PPDA y PPDB).

Figura 1:



Estimulación con PBS:

Muestra	Técnico	Día	Nº Observ.	Media de DO	CV%
muestra 1	técnico 1	día 1	4	0,051	2,773
		día 2	4	0,058	3,539
		día 3	4	0,057	5,165
	técnico 2	día 1	4	0,055	4,855
		día 2	4	0,053	1,541
		día 3	4	0,059	4,523
muestra 2	técnico 1	día 1	4	0,045	1,297
		día 2	4	0,049	3,844
		día 3	4	0,053	6,715
	técnico 2	día 1	4	0,044	4,402
		día 2	4	0,049	1,944
		día 3	4	0,052	1,850
muestra 3	técnico 1	día 1	4	0,069	3,225
		día 2	4	0,077	3,353
		día 3	4	0,084	3,972
	técnico 2	día 1	4	0,069	1,393
		día 2	4	0,074	8,049
		día 3	4	0,091	3,836
muestra 4	técnico 1	día 1	4	0,040	6,027
		día 2	4	0,041	7,180

Muestra	Técnico	Día	Nº Observ.	Media de DO	CV%
	técnico 2	día 3	4	0,041	3,050
		día 1	4	0,039	5,252
		día 2	4	0,043	7,316
		día 3	4	0,044	8,089

Estimulación con PPD bovino:

Muestra	Técnico	Día	Nº Observ.	Media de DO	CV%
muestra 1	técnico 1	día 1	4	0,073	1,118
		día 2	4	0,092	3,733
		día 3	4	0,081	1,558
	técnico 2	día 1	4	0,073	0,687
		día 2	4	0,087	2,816
		día 3	4	0,095	1,328
muestra 2	técnico 1	día 1	4	0,239	0,714
		día 2	4	0,229	0,549
		día 3	4	0,231	0,903
	técnico 2	día 1	4	0,235	1,120
		día 2	4	0,231	0,740
		día 3	4	0,234	0,642
muestra 3	técnico 1	día 1	4	1,121	0,263
		día 2	4	1,122	0,223
		día 3	4	1,118	0,231
	técnico 2	día 1	4	1,109	0,725
		día 2	4	1,117	0,267
		día 3	4	1,107	0,585
muestra 4	técnico 1	día 1	4	3,210	0,256
		día 2	4	3,227	0,882
		día 3	4	3,228	0,399
	técnico 2	día 1	4	3,210	0,275
		día 2	4	3,228	0,456
		día 3	4	3,218	0,222

Estimulación con PPD aviar:

Muestra	Técnico	Día	Nº Observ.	Media de DO	CV%
muestra 1	técnico 1	día 1	4	0,084	2,572
		día 2	4	0,084	2,632

Muestra	Técnico	Día	Nº Observ.	Media de DO	CV%
	técnico 2	día 3	4	0,100	2,160
		día 1	4	0,098	2,961
		día 2	4	0,105	2,333
		día 3	4	0,121	2,338
muestra 2	técnico 1	día 1	4	0,102	2,531
		día 2	4	0,090	1,442
		día 3	4	0,091	2,374
	técnico 2	día 1	4	0,097	2,280
		día 2	4	0,091	1,427
		día 3	4	0,092	1,411
muestra 3	técnico 1	día 1	4	0,720	0,593
		día 2	4	0,708	0,960
		día 3	4	0,729	0,453
	técnico 2	día 1	4	0,718	0,927
		día 2	4	0,713	0,380
		día 3	4	0,719	0,309
muestra 4	técnico 1	día 1	4	0,999	1,193
		día 2	4	1,001	1,756
		día 3	4	0,988	0,486
	técnico 2	día 1	4	0,990	1,610
		día 2	4	1,002	1,019
		día 3	4	1,010	2,454

Todos los CV% (coeficiente de variación, en %) observados tras las pruebas y mostrados en las tablas anteriores son inferiores al 10%.

Conclusiones: El ELISA BOVIGAM muestra una excelente repetibilidad entre pocillos para la detección de IFN- γ bovino a diferentes concentraciones en todo el rango operativo del ensayo cuando se utilizan muestras de plasma de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) estimuladas.

Datos de repetibilidad entre ejecuciones 1 (2015):

Objetivo: Demostrar que el ELISA BOVIGAM presenta muy poca variación entre ejecuciones.

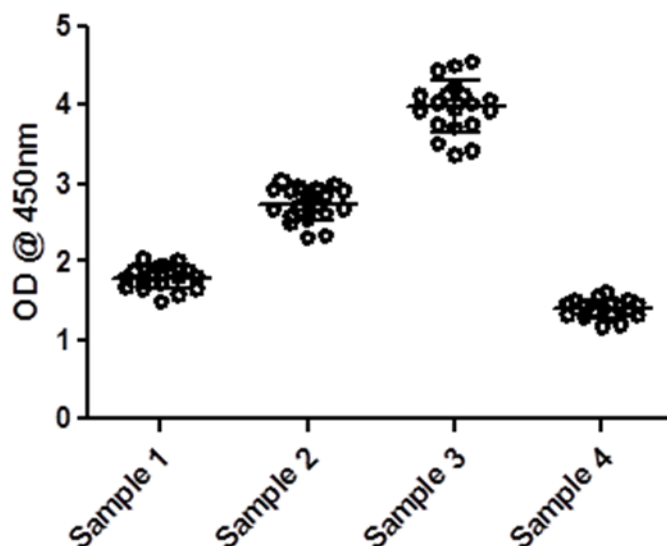
Métodos: Se tomaron alícuotas de cuatro muestras de sobrenadantes de cultivos de sangre entera bovina y se congelaron a -80°C . Los antígenos utilizados para la estimulación de las muestras 1, 2, 3 y 4 generadas a partir de sangre bovina fueron el derivado proteico purificado de la tuberculina aviar (PPDA), la enterotoxina estafilocócica B (EEB), el cóctel de péptidos formado por la diana antigénica secretora temprana de 6kD (ESAT-6)/ la proteína del filtrado del cultivo de 10 kDa (CFP-10), y el cóctel de péptidos Rv3615c, respectivamente. A continuación, estas muestras se utilizaron para evaluar la repetibilidad entre ejecuciones del ELISA BOVIGAM. Cada muestra se analizó por triplicado en un total de 19 ejecuciones, realizadas en 5 días distintos y empleando a 2 técnicos.

Resultados: La Figura 2 muestra las lecturas de densidad óptica de los cuatro sobrenadantes de los cultivos de sangre total bovina analizados en 19 ocasiones. Las líneas horizontales y las barras de error representan la media y la desviación

estándar, respectivamente. Como se detalla en la Tabla 2, el coeficiente de variación fue inferior al 10% para las cuatro muestras.

Conclusiones: El ELISA BOVIGAM muestra una excelente repetibilidad entre muestras para la detección de IFN- γ bovino en sobrenadantes procedentes de ensayos de sangre total bovina.

Figura 2: El ELISA BOVIGAM presenta muy poca variación entre ejecuciones.



Variaciones de la repetibilidad al utilizar muestras de sangre total bovina de reactores estimulada: la variación entre días es inferior al 20%

Variaciones en la repetibilidad al utilizar muestras de sangre total bovina estimulada con *Phytolacca*: la variación entre días es inferior al 6%.

Datos de repetibilidad entre ejecuciones 2 (2021):

Objetivo: Demostrar que el ELISA BOVIGAM presenta muy poca variación entre ensayos al utilizar muestras de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*).

Métodos: La repetibilidad se estimó en 4 muestras de plasma, seleccionadas de un panel de 3 muestras de campo de diferentes animales que cubrían el rango operativo del ensayo, una fuerte, una media y una débil, y luego una muestra de campo negativa; cada muestra se analizó por triplicado: la variación entre (inter) ensayos se evaluó comparando los resultados de 2 técnicos que analizaron el panel de muestras (cada uno por triplicado) a lo largo de 3 días.

Resultados: El experimento se llevó a cabo con muestras estimuladas con TFS, PPDA y PPDB.

Estimulación con PBS:

Muestra	Nº Observ.	Media	CV%
muestra 1	24	0.055	6.229
muestra 2	24	0.049	8.127
muestra 3	24	0.077	11.428
muestra 4	24	0.041	7.013

Estimulación con PPD bovino entre ensayos

Muestra	Nº Observ.	Media	CV%
muestra 1	24	0.083	10.648
muestra 2	24	0.233	1.638
muestra 3	24	1.116	0.641
muestra 4	24	3.220	0.486

Estimulación con PPD aviar entre ensayos

Muestra	Nº Observ.	Media	CV%
muestra 1	24	0.099	13.321
muestra 2	24	0.094	5.221
muestra 3	24	0.718	1.089
muestra 4	24	0.998	1.574

Todos los CV observados son inferiores al 15%.

Conclusión: El ELISA BOVIGAM presenta una excelente repetibilidad entre ensayos para detectar IFN- γ bovino a diferentes concentraciones en todo el rango operativo del ensayo al utilizar muestras de plasma de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) de sangre estimulada.

Características diagnósticas

Determinación del umbral

Cada país debe determinar su propio valor de corte adaptado a la situación regional de la TB bovina.

Estimaciones de la sensibilidad diagnóstica (SD) y de la especificidad diagnóstica (ED)

BOVIGAM		Especie de destino				Búfalo de agua (<i>Bubalus bubalis</i>)
		Ganado bovino	Búfalo (<i>Syncerus caffer</i>)	Caprino	Ovino	
Sensibilidad diagnóstica*¹ (pruebas estadísticas clásicas con PPD)	N DSe CI	8879 84,6% (IC 95% = 73,0-95,5%)	2514 81,6-91,9%	472 58-100%	4 100%	458 94,7% (IC 95%: = 92,3-96,5%)
Especificidad diagnóstica*² (pruebas estadísticas clásicas con PPD)	N DEs CI	10966 97,4% (IC 95% = 87,5-99,6%)	608 86,2-99,4%	140 96-100%	3 100%	489 98,5% (IC 95% = 98,5-96,9%)
Sensibilidad diagnóstica*³ (Análisis bayesiano con PPD)	N DSe CI	4937 33,9-68,8% ⁺ n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

BOVIGAM		Especie de destino				Búfalo de agua (<i>Bubalus bubalis</i>)
		Ganado bovino	Búfalo (<i>Syncerus caffer</i>)	Caprino	Ovino	
Especificidad diagnóstica*⁴ (Análisis bayesiano con PPD)	N DEs CI	4937 87,9-99,8% ⁺ n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Sensibilidad diagnóstica*⁵ (Esat-6/CFP10)	N DSe CI	771 52,2%-85% n.a. [§]	n.a.	n.a.	4 100% n.a.	n.a.
Especificidad diagnóstica* (Esat-6/CFP10)	N DEs CI	2039 94%-98,9% n.a. [§]	n.a.	n.a.	3 100% n.a.	n.a.

* Se pueden aplicar distintos puntos de corte; § las estimaciones de la especificidad y de la sensibilidad se basan en varios estudios, por lo tanto, aquí no se da un IC del 95%; ⁺dependiendo del supuesto de la prueba

*1-2 ganado bovino → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Nº de criterio	Criterio
Criterio 1:	BOD_COD > 0 y BOD_AOD > 0;
Criterio 2:	BOD/COD > 1.25 y BOD_AOD > 0;
Criterio 3:	BOD/COD > 1.5 y BOD_AOD > 0;
Criterio 4:	BOD_COD P0.05 y BOD_AOD > 0;
Criterio 5:	Si BOD = 0.1, entonces BOD/COD > 1.5 y BOD_AOD > 0. Si BOD > 0.1, entonces BOD_COD > 0.05 y BOD_AOD > 0;
Criterio 6:	BOD_AODP0.1;
Criterio 7:	BOD_COD P0.1 y BOD/AODP 1.8;
Criterio 8:	BOD_COD P0.1 y BOD/AODP 1.25;
Criterio 9:	BOD/AODP1.8;
Criterio 10:	BOD_COD P0.05 y BOD/AODP 1.8 ("criterio 4 si BOD/AODP1.0);
Criterio 11:	BOVIGAM: BOD_COD P0.1 y BOD_AOD > 0;
Criterio 12:	BOD_COD P2(COD) y BOD_AODP0.05;
Criterio 13:	BOD_COD P0.1 y BOD_AODP 0.1;
Criterio 14:	BOD_AODP0.04.

- **BOD:** Valor medio de densidad óptica del plasma de sangre estimulada con PPD bovino
- **AOD:** Valor medio de densidad óptica del plasma de sangre estimulada con PPD aviar
- **COD:** Valor medio de densidad óptica del plasma de sangre estimulada con suero salino tamponado con fosfato (control antígeno negativo - nulo).

*1-2 búfalo → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Criterio No.	Criterio
Criterio C1:	BOD-AOD P0.05 y BOD-AOD > 0;

Criterio C4:	Lectura de DO bovina < 0,385 se interpreta como negativa, y Lectura de DO bovina \geq 0,385 interpreta como positiva.
Criterio 5:	DObovina – DOaviar > 0,20 y si DOfortuita – ODnula < 0.15, siempre que DO nula <0,25. En los casos en los que DOfortuita – DONula > 0,15 el búfalo se clasificaba como reactor múltiple (MR).

*1-2 caprino → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Criterio No.	Criterio
Criterio C2:	Ensayo IFN- γ . Interpretación estándar: Caprino positivo si la DO de PPD bovino menos la OD de la muestra sin antígeno es 0,1 y la DO de PPD bovino > DO de PPD aviar. Interpretación severa: Caprino positivo si la DO de PPD bovino menos la DO de la muestra sin antígeno es 0,05 y la DO de PPD bovino > DO de PPD aviar.

*1-2 ganado bovino → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Criterio No.	Criterio
Criterio C3:	Índices de DO (IDO): ratio de la DO para cultivos estimulados comparada con la DO de cultivos control. Un IDO>2 se considera positivo.

*3-4 ganado bovino, análisis bayesiano → no fue aplicable un punto de corte específico porque es un análisis bayesiano; consúltese el artículo de Tracy A. Clegg, Anthony Duignan, Clare Whelan, Eamonn Gormley, Margaret Good, John Clarke, Nils Toft, Simon J. *Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test y a multiplex immunoassay under Irish conditions*. *More Veterinary Microbiology* 151 (2011) 68–76.

*5-6 ganado bovino, ESAT6/CFP10 → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Criterio No.	Criterio
Criterio 1:	Esat6/CFP10 > 0,1
Criterio 2:	PPDB-PPDA > 0,1 y PPDB - Nil > 0,1
Criterio 3:	PPDB-PPDA > 0,1 y Esat6/CFP10 > 0,1 (confirmatorio)
Criterio 4:	bPPD - PBS \geq 0,05 y bPPD mayor que aPPD
Criterio 5:	Prionics PC-EC- Nulo > 0,1 (confirmatorio)

*5-6 Ovino, ESAT6/CFP10 → En estos estudios, se han aplicado los siguientes puntos de corte

Criterio No.	Criterio
Criterio C3:	Un IDO >2 se considera positivo.

Rendimiento comparativo 1 (2015)

	Sensibilidad diagnóstica	Especificidad diagnóstica
Prueba cutánea - CCT	80%*	96,8%*
Prueba cutánea – CFT/SCT	84%*	99,50%*

Rendimiento comparativo 2 (2021), en búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)

El estudio comparativo se llevó a cabo con 489 muestras positivas aplicando la prueba intradérmica SICCT y usando el kit Bovigam.

Prueba	Sensibilidad diagnóstica
SICCT	88,3%
Bovigam	94,7%

Concordancias y discrepancias

Se observó una concordancia alta entre la BOVIGAM y el bioensayo convencional para IFN- γ bovino. BOVIGAM muestra una mayor sensibilidad que el bioensayo. Comparación de pruebas: tuberculina cervical /tuberculina del pliegue caudal/tuberculina cervical simple. Pruebas cutáneas: Los PPD de tuberculina bovina y/o aviar se administran por vía intradérmica y son, por tanto, diagnósticos *in vivo*. En el ganado bovino tuberculoso, la inyección de PPD de tuberculina bovina provoca una reacción inmunitaria en el punto de inyección que se denomina reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y constituye una inflamación local e hinchazón de la piel (lesión). El grosor de la piel se mide con calibradores 72 horas después de la inyección. El PPD de tuberculina aviar se utiliza para controlar las reacciones inespecíficas. Se puede estimular un conjunto completo de células T. BOVIGAM es una prueba *in vitro* para estimular muestras de sangre total con PPD u otros antígenos específicos. Se mide la concentración de un marcador, IFN- γ . Se estimulan principalmente las células CD4+. La proporción de concordancia es de alrededor del 70%, ya que la reacción inmunitaria detrás del sistema de prueba es diferente y en cada prueba se puede reconocer otra subpoblación de animales positivos a TB. En la tabla siguiente se muestran varios estudios que resumen la proporción de concordancia entre las pruebas cutáneas y BOVIGAM.

Proporción de concordancia entre las diferentes pruebas cutáneas y BOVIGAM.

Autor	Especie	Prueba cutánea	BOVIGAM®	Proporción de concordancia	Kappa (k)
Lopes <i>et al.</i> , 2012	Ganado bovino N= 350	CCT	De acuerdo con PI	79,4% a 85,3%	0,546 to 0,663
Antognoli <i>et al.</i> , 2010	Ganado bovino N= 900	CCT	De acuerdo con PI	n,a,	0,45 (IC 95% 0,28 – 0,62)
Goosen <i>et al.</i> , 2013	Búfalo N= 82	SCT	De acuerdo con PI o específico de Sudáfrica para los búfalos	63% 64%	n.a. n.a.
Kalis <i>et al.</i> , 2003	Ganado bovino N= 1631	SCT	De acuerdo con PI**	85,7%	0,41
Schroeder, 2014	Ganado bovino N=541	CCT	De acuerdo con PI	95,1%	0,501

Reproducibilidad

Experimento 1 (2015):

Investigación de la reproducibilidad de la prueba ELISA BOVIGAM cuando se realiza en diferentes laboratorios.

Métodos: Dado que técnicamente es poco práctico enviar muestras de sangre recién extraídas a laboratorios de otros países para realizar las estimulaciones de sangre total, hemos limitado el análisis de la reproducibilidad a la detección de IFN- γ mediante el ELISA BOVIGAM. Se incubaron muestras de sangre total de 21 animales (16 rectores de campo naturales positivos a la prueba cutánea SICCT, 3 vacunados con BCG/infectados con *M. bovis* y 2 controles no vacunados/no infectados) con PPDA, PPDB, cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10 y cóctel de péptidos Rv3615c. Estas estimulaciones se realizaron en múltiples pocillos, lo cual permitió la agrupación de muestras replicadas para crear un panel de alícuotas idénticas, que posteriormente se analizaron con el ELISA BOVIGAM en los laboratorios mencionados anteriormente. En cada laboratorio se utilizó un lote diferente del kit ELISA BOVIGAM (kit VISAVET nº 6632600201, kit Luddington nº 6332601801 y kit Weybridge nº 6332601701). A continuación, se calificó a cada animal como positivo o negativo utilizando tres sistemas de lectura diferentes: (i) la lectura comparativa estándar de PPD bovina menos PPD aviar (B-A), (ii) las reacciones al cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10 (E/C), o (iii) las reacciones al cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10 y/o al cóctel de péptidos Rv3615c (E/C \pm Rv).

Resultados: Los resultados de las pruebas generados por tres laboratorios independientes correspondientes a 21 animales aplicando los criterios (i) B-A, (ii) E/C o (iii) E/C \pm Rv3615c se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Concordancia entre los resultados de la prueba obtenidos en tres laboratorios distintos.

I.D.	B-A			E/C			E/C y/o Rv3615c		
	VISAVET	Luddington	Weybridge	VISAVET	Luddington	Weybridge	VISAVET	Luddington	Weybridge
S1	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S4	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N
S5	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S8	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N	Y
S9	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S10	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S12	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S13	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y
S14	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S15	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S16	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S17	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
S20	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S21	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S23	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S24	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N
S25	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N

Tabla 18: Y = reacción positiva a la prueba, N = reacción negativa a la prueba, B-A = lectura comparativa estándar de PPD bovino menos PPD aviar, E/C = reacciones al cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10, E/C y/o Rv3615c = reacciones al cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10 y/o al cóctel de péptidos Rv3615c.

Se observó una concordancia total (100%) entre los tres laboratorios al utilizar B-A o E/C como lecturas. Además, también se observó una concordancia del 100% entre los laboratorios Weybridge y VISAVET al utilizar E/C \pm Rv3615c como lectura. La única discrepancia entre los resultados de las pruebas se produjo al comparar los resultados de E/C \pm Rv3615c del laboratorio Luddington con los de Weybridge o VISAVET (resaltados en rojo), donde la muestra S8 dio negativo en el primer laboratorio, pero positivo en los dos últimos. El resultado fue una concordancia del 95,24% (valor kappa de 0,8966, interpretado como muy buena concordancia) entre Luddington y Weybridge o VISAVET al comparar los resultados de E/C \pm Rv3615c.

Conclusiones:

Estos resultados demuestran una reproducibilidad alta del kit de ELISA BOVIGAM cuando se utiliza en diferentes laboratorios, con diferentes lotes de kits y con varios sistemas de lectura.

Experimento 2 (2015):

Investigación de la variabilidad de los resultados obtenidos en distintos laboratorios utilizando tubos de muestras del mismo animal extraídas al mismo tiempo.

Métodos: Se enviaron 316 muestras de sangre en paralelo a AHVLA Luddington y también a un segundo laboratorio (AHVLA Weybridge o AHVLA Sutton Bonnington) para estimulaciones sanguíneas y detección de IFN- γ mediante ELISA. Se trataba de 285 muestras del ensayo de especificidad IFN- γ y 31 muestras de animales positivos a la prueba cutánea SICCT. Se analizó la producción en IFN- γ de cada muestra frente a un control medio (negativo), PPDA, PPDB y SEB (control positivo) de acuerdo con los PNT pertinentes.

Resultados: Todos los controles estaban dentro de los rangos especificados por el PNT. Para la lectura B-A, los resultados positivos se determinaron restando la reacción a la tuberculina aviar de la reacción a la tuberculina bovina; se consideraron positivos los de 0,1 o más. La concordancia entre los dos sitios fue del 96,52% (resultados resumidos en la tabla siguiente).

Resumen de la concordancia entre las pruebas respecto a las reacciones B-A.

		Segundo laboratorio		
		Negativo	Positivo	Total
Luddington	Negativo	275	5	280
	Positivo	6	30	36
	Total	281	35	316

Se llevó a cabo un análisis similar para las reacciones al cóctel de péptidos ESAT-6/CFP-10, en el que se enviaron un total de 287 muestras de sangre en paralelo a AHVLA Luddington y a AHVLA Weybridge. Éstas consistían en 284 muestras del ensayo de especificidad del IFN- γ y 3 muestras de animales positivos en la prueba cutánea SICCT. Los resultados positivos se determinaron restando la reacción al control negativo de la reacción al cóctel de péptidos; los de 0,1 o más se consideraron positivos. La concordancia entre los dos sitios fue del 94,43% (resultados resumidos en la tabla siguiente).

Resumen de la concordancia de la prueba respecto a las reacciones a ESAT-6/CFP-10

		Weybridge		
		Negativo	Positivo	Total
Luddington	Negativo	268	6	274
	Positivo	10	3	13
	Total	278	9	287

Experimento 3 (2015)

En otro ensayo realizado en Francia, se comprobó la reproducibilidad entre laboratorios (tabla siguiente).

	<i>Laboratoire Départemental de l'Hérault, Montpellier, Carmargues</i>		<i>Laboratoire Départemental D'Analyses Agriculture et Vétérinaire; Coulounieix-Chamiers Dordogne</i>	<i>Laboratoire Départemental de la Côte-d'Or, Dijon</i>	
N° de lote	6332603001	6332604201	6332603701	6332602701	6332603401
Media del material de referencia	19,65%	19%	20,43%	22,56%	20,05%
Desviación estándar	1,82	2,71	2,69	1,97	1,47
%CV	9,23%	14,56%	13,17%	9,0%	7,0%

Estos resultados muestran una reproducibilidad alta del ELISA BOVIGAM cuando se utiliza en diferentes laboratorios, con diferentes lotes de kits y con varios sistemas de lectura en diferentes días.

Experimento 4 [2021, en búfalo acuático (*Bubalus bubalis*)]

Métodos

Para estimar la reproducibilidad, se seleccionaron 32 muestras de suero de 32 cabezas de búfalo, de las cuales 16 eran positivas y 16 negativas. Las pruebas fueron realizadas por dos laboratorios diferentes (IZSME-Salerno y IZSUM-Perugia).

Para trabajar con resultados expresados en una escala nominal (negativo, positivo) se puede utilizar el índice estadístico Kappa para cuantificar el grado de concordancia, más allá del caso, entre los resultados de una prueba. El kappa varía de 0 (nada de concordancia) a 1 (concordancia perfecta) (Fleiss, 1981; Landis & Koch 1977). Para la evaluación cualitativa, la reproducibilidad se ha definido como el grado de concordancia entre laboratorios diferentes respecto a la misma muestra. Se calculó con 32 muestras analizadas en dos laboratorios diferentes con el Kappa de Fleiss.

Resultados

	Criterio Bovigam		
id_muestras	Esperado	lab 1	lab 2
1	NEG	NEG	NEG
2	NEG	NEG	NEG
3	NEG	NEG	NEG
4	NEG	NEG	NEG
5	NEG	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG
7	NEG	NEG	NEG
8	NEG	NEG	NEG
9	NEG	NEG	NEG
10	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	NEG
12	NEG	NEG	NEG

13	NEG	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG
15	NEG	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NEG
17	POS	POS	POS
18	POS	POS	POS
19	POS	POS	POS
20	POS	POS	POS
21	POS	POS	POS
22	POS	POS	POS
23	POS	NEG	POS
24	POS	POS	POS
25	POS	NEG	POS
26	POS	POS	POS
27	POS	NEG	POS
28	POS	POS	POS
29	POS	POS	POS
30	POS	POS	POS
31	POS	POS	POS
32	POS	POS	POS

Para el criterio Bovigam, el kappa fue igual a 0,81 (IC del 95% 0,61-1,00), lo cual indica una concordancia casi perfecta entre los laboratorios; se observaron 3 discrepancias en 32 muestras. La proporción de concordancia observada fue del 90%. La hipótesis nula de que este valor es igual a 0 (nada de correlación) devolvió un valor $p < 0,001$, lo que indica que el valor de K obtenido es significativamente diferente de 0.

Conclusiones: El ELISA BOVIGAM presenta una excelente reproducibilidad entre laboratorios en muestras de plasma estimuladas de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*).

Aplicación

Algunos laboratorios de referencia utilizan BOVIGAM como prueba auxiliar para los animales que han dado negativo en la prueba cutánea dentro de un rebaño que ha presentado algunas pruebas cutáneas positivas (por ejemplo, Irlanda, Reino Unido). Algunos laboratorios de referencia utilizan BOVIGAM como prueba confirmatoria de animales que han dado positivo en la prueba cutánea (por ejemplo, Baviera). Un laboratorio mexicano y uno de Francia (para rebaños de toros de lidia) utilizan BOVIGAM como prueba principal para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado bovino.

BOVIGAM se ha utilizado varios millones de veces desde su introducción en 1988, principalmente en laboratorios de rutina. Los laboratorios de análisis de siempre han utilizado esta prueba para analizar varios cientos de muestras al día. El tiempo mínimo de realización de la prueba es de 4 horas para el ELISA y de 16-24 horas para la estimulación de muestras de sangre total.

Bibliografía

Wood, P. R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Baldock, C., Jones, S.L., Cousins, D.B., McCormick, B.S., Francis, B.R., Creeper, J., Tweddle, N.E. (1991) Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis." Aust Vet J 68: 286-90.

R. de la Rúa-Domenech , A.T. Goodchild , H.M. Vordermeier , R.G. Hewinson ,K.H. Christiansen , R.S. Clifton-Hadley Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, c-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques; Research in Veterinary Science 81 (2006) 190–210).

Vordermeier; M. and Ewer, K; Specificity Trial of the BOVIGAM® IFN-Gamma Test in GB Cattle; TB Research Group, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB Funded by Defra under surveillance project SB4021 April 2006.

Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the g-interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions Tracy A. Clegg, Anthony Duignan, Clare Whelan, Eamonn Gormley, Margaret Good, John Clarke, Nils Toft, Simon J. More Veterinary Microbiology 151 (2011) 68–76.